

00377
4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

COUMARINAS Y XANTONAS DE *Calophyllum brasiliense*:
EVALUACION DE SU ACTIVIDAD ANTIVIRAL, CITOTOXICA Y
ANTIBACTERIANA.

296528

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A :

BIOL. ELIZABET ESTRADA MUÑIZ



COORDINACION
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS



DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO REYES CHILPA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2-10 del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Ricardo Reyes Chilpa y asesoría del Dr. Manuel Jiménez Estrada. Durante su elaboración se contó con el apoyo de la beca No. 130057 otorgada por el CONACyT.

Dedico este Trabajo

A mi Madre Rosa Ma. Muñiz O.

Por todo el apoyo que siempre me has
dado. Gracias.

A Raymundo Cruz P.

Por la historia que estamos
construyendo juntos.

AGRADECIMIENTOS

Al Maestro en Ciencias Javier Antonio Taboada Ramírez, quien formó parte de mi comité tutorial, y compartió conmigo su experiencia y anécdotas. GRACIAS donde quiera que se encuentre.

A los Dres. Ricardo Reyes Chilpa y Manuel Jiménez Estrada por enseñarme a descubrir los secretos del *Calophyllum*.

Al Dr. Carlos Alberto Eslava Campos, por el apoyo brindado para la realización de las pruebas antimicrobianas.

A los miembros del Jurado: Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dra. Angelina Quintero Ruíz, Dr. Carlos Alberto Eslava Campos y al Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero, por sus valiosas sugerencias, comentarios y críticas que enriquecieron de manera significativa el trabajo escrito.

A la M. en C. Teresa Ramírez Apan, de la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, por las pruebas de citotoxicidad realizadas, por su amistad y por sus valiosas sugerencias al trabajo escrito.

Al Biól. Carlos Torres Sosa, por ser mucho más que un compañero de laboratorio.

A mis amiguitas Bióls. Pilar Mendoza y Gabriela Sánchez, así como al resto de la banda del Laboratorio 2-10 por todos los momentos tan amenos que compartimos.

A la M. en C. Rosario Ruíz por la ayuda en las pruebas de actividad antimicrobiana y amistad desinteresada.

A los técnicos del Instituto de Química: Quím. Rocío Patiño (Espectroscopía de Infrarrojo), I.Q. Luis Velasco (Espectroscopía de Masas), así como a todos los técnicos de departamento de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.

A todos aquellos que de manera directa o indirecta contribuyeron en la realización de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMEN | 1 |
| I INTRODUCCIÓN | 3 |
| II ANTECEDENTES | 5 |
| 1. El género <i>Calophyllum</i> | 5 |
| 1.1 <i>Calophyllum brasiliense</i> | 5 |
| 1.1 Composición química | 5 |
| 1.1.1 Coumarinas | 6 |
| 1.1.1.1 Clasificación de coumarinas | 6 |
| 1.1.1.1.1 Coumarinas de <i>Calophyllum spp</i> | 6 |
| 1.1.1.1.2 Coumarinas de <i>Mammea spp</i> | 7 |
| 1.1.2 Xantonas | 8 |
| 1. Actividad Biológica de coumarinas y xantonas | 9 |
| 2.1 El virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) | 9 |
| 2.1.1 Coumarinas | 10 |
| 2.1.1.1 Relación estructura-actividad | 13 |
| 2.1.1.2 Interacción del (+)-Calanólido A con la RT | 14 |
| 2.1.2 Xantonas | 15 |
| 2.2 Actividad Citotóxica | 16 |
| 2.2.1 Coumarinas | 17 |
| 2.2.2 Xantonas | 18 |
| 2.3 Actividad antibacteriana | 18 |
| 2.3.1 Coumarinas | 19 |
| 2.3.2 Xantonas | 20 |
| III OBJETIVOS | 21 |
| IV MATERIALES Y METODOS | 22 |
| 1. Estudio Fitoquímico | 22 |
| 1.1 Material Biológico | 22 |
| 1.2 Cromatografía e Instrumentación | 22 |
| 1.3 Aislamiento e identificación de los compuestos | 22 |
| 1.3.1 Extracto Hexánico | 23 |
| 1.3.2 Extracto Acetónico | 24 |
| 1.3.3 Extracto Metanólico | 25 |
| 2. Actividad Biológica | 30 |
| 2.1 Actividad sobre la RT | 30 |
| 2.2 Actividad Citotóxica | 32 |
| 2.3 Actividad Antibacteriana | 35 |
| V RESULTADOS | 37 |
| 1. Estudio Fitoquímico | 37 |
| 1.1 Rendimiento de los extractos | 37 |
| 1.2 Composición química de las hojas | 37 |
| 1.3 Compuestos obtenidos del extracto hexánico | 38 |
| 1.3.1 Friedelina y Canofilol | 38 |
| 1.3.2 Mezcla 1)Mammea A/BA + A/BB + epi-A/BB | 38 |
| 1.3.3 Mezcla 2)Mammea B/BA + B/BB | 39 |

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1.3.4 Mezcla 3)Mammea C/OA + C/OB | 40 |
| 1.3.5 Mezcla 4)Mammea B/BA ciclo F + B/BB ciclo F | 41 |
| 1.4 Compuestos obtenidos del extracto acetónico | 42 |
| 1.4.1 Isomammeigina | 43 |
| 1.4.2 Ácido Protocatechuico | 44 |
| 1.4.3 Artefacto | 44 |
| 1.5 Compuestos obtenidos del extracto metanólico | 45 |
| 2. Estudio Biológico | 47 |
| 2.1 Actividad sobre la RT | 49 |
| 2.2 Actividad citotóxica | 50 |
| 2.3 Actividad antibacteriana | 52 |
| VI DISCUSIÓN | 54 |
| VII CONCLUSIONES | 58 |
| VIII PERSPECTIVAS | 59 |
| IX BIBLIOGRAFÍA | 60 |
| ANEXO | 66 |

RESUMEN

Coumarinas y Xantonas de *Calophyllum brasiliense*: Evaluación de su Actividad Antiviral, Citotóxica y Antibacteriana.

Algunas enfermedades humanas, tales como el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (VIH), cáncer e infecciones causadas por bacterias, se han convertido en problemas de salud pública mundial para los cuales es urgente contar con nuevos fármacos para su control y/o tratamiento. Entre las estrategias que se han seguido para lograr este objetivo, es la de explorar las propiedades de numerosos extractos y compuestos de origen vegetal. Las especies asiáticas pertenecientes a la familia Guttiferae (=Clusiaceae) han mostrado ser una fuente importante de sustancias citotóxicas, antibacterianas y con actividad inhibitoria de la enzima reversa transcriptasa (RT) del VIH tipo 1. El ejemplo más notable es la coumarina calanólido A aislada de *Calophyllum teysmannii*, la cual se encuentra en estudios de fase clínica 2, y podría convertirse en el primer fármaco de origen natural que se aprobase para su uso clínico con pacientes VIH-1 positivos. De este género, también se han aislado otras moléculas, tales como las xantonas, las cuales han mostrado actividad citotóxica y antibacteriana, por lo que estas moléculas también son candidatos potenciales para su evaluación como fármacos antineoplásicos y antibacterianos.

En México solo existe una especie del género *Calophyllum*: *C. brasiliense*, del cual solo existe un trabajo fitoquímico de la madera, en el que se determinó que es una fuente rica en xantonas. En el presente trabajo se aislaron e identificaron 15 compuestos de las hojas, de los cuales 10 fueron coumarinas, 2 triterpenos y 2 ácidos. Las coumarinas generalmente se aislaron como mezclas de isómeros y epímeros, y representaron aproximadamente el 1.5% del peso seco de las hojas, siendo la mezcla 1 (Mammea A/BA+A/BB y epi-A/BB) así como los triterpenos friedelina y canofilol los constituyentes mayoritarios. Las coumarinas aisladas fueron del tipo mammea, las cuales han sido previamente reportadas para el género *Mammea*. Estos compuestos presentan un sustituyente acilo sobre el carbono 8 el cual no se encuentra formando un anillo adicional de 2,3-dimetilcroman-4-ol (anillo D), característico de las coumarinas tipo calanólido y pseudocalanólido, de especies del género *Calophyllum*. En cuanto a las propiedades biológicas de estas sustancias: Se determinó que las coumarinas y xantonas no tienen efectos inhibitorios sobre la actividad de la RT. Trabajos previos han indicado que la presencia del anillo D de las coumarinas anti-RT, es la parte estructural más importante para inhibir la actividad de dicha enzima, por lo tanto la ausencia del anillo D, explicaría la falta de actividad. También se determinó que estas sustancias presentan efectos citotóxicos importantes cuando fueron evaluadas sobre cinco líneas celulares tumorales (HEp-2, HeLa, U251, PC-3 y K562) mediante el método de Sulforrodamina B. En el caso de las coumarinas, las mezclas 1 (Mammeas A/BA+A/BB y epi-A/BB) y 4 (Mammeas B/BA ciclo F + B/BB ciclo F) fueron los compuestos con mayor efecto citotóxico (IC_{50} =0.5 a 2.6 μ M), mientras que en el caso de las xantonas su IC_{50} se ubicó ente 2.0 a 16 μ M. Cabe señalar que el efecto de ambos grupos de sustancias fue similar al del control positivo 5-fluororacilo.

También se demostró que la mayoría de los compuestos únicamente presentaron actividad antibacteriana en 2 de las 14 cepas evaluadas, mediante el método de sensidisco a la concentración evaluada (500 μ g/disco). En el caso de *S. typhi*, esta solo fue susceptible a las xantonas, siendo el efecto observado de tipo bactericida. Para el caso de *S. aureus* tanto las xantonas como las coumarinas mostraron efecto bactericida y solo dos mezclas de

coumarinas (mezcla 1: Mammea A/BA+A/BB+ epi-A/BB y mezcla 3: Mammea C/OA+C/OB) causaron un efecto bacteriostático. Concluyendo: La única especie de *Calophyllum* con distribución en México, no posee coumarinas del tipo de los calanólidos, los cuales son prospectos importantes en la terapia del SIDA, pero sus propiedades citotóxicas al igual que las de las xantonas podrían aprovecharse en la búsqueda de nuevas moléculas antineoplásicas.

I. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemorables las plantas han jugado un papel importante en el tratamiento de las enfermedades humanas. En la actualidad, aproximadamente 120 fármacos son obtenidos de plantas. Como ejemplo de lo anterior se puede mencionar: esteroides, glucósidos cardiotónicos (glucósidos *Digitalis*), anticolinérgicos (alcaloides tipo tropano aislados de la belladona), analgésicos y antitusivos (alcaloides del opio), antihipertensivos (resepina), colinérgicos (*fisostigmina*, *pilocarpina*), antimaláricos (alcaloides aislados de *Cinchona*), antimitóticos (colchicina), anestésicos (cocaína), relajantes del músculo esquelético (tubocurarina), y agentes anticancerígenos (taxol (*Taxus brevifolia*), vincristina, vinblastina (*Catharanthus roseus*), podofilotoxina (*Podophyllum peltatum* L.) y camptotecina (*Camptotheca acuminata* Decne)). Aún cuando es evidente el predominio de los fármacos sintéticos, se ha estimado que las drogas obtenidas de fuentes naturales actualmente representan alrededor del 25 % de las prescripciones médicas realizadas en EUA. Es claro que las plantas siguen teniendo un papel importante en el tratamiento y cura de enfermedades en la vida moderna (Pezzuto, 1997).

Por lo anterior muchas instituciones de diversos países se han dado a la tarea de buscar y aislar nuevas sustancias de fuentes naturales que puedan ser utilizadas con fines terapéuticos.

Hoy día es patente la necesidad de contar con nuevos fármacos que permitan controlar y tratar padecimientos tales como: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), cáncer, y enfermedades causadas por bacterias. Entre otras estrategias que se han seguido para lograr estos objetivos, es explorar las propiedades anti-VIH, antineoplásicas y antimicrobianas de numerosos extractos y compuestos obtenidos de plantas, bacterias, hongos e invertebrados terrestres y marinos. A la fecha, se ha logrado identificar más de 60 productos naturales que pueden contrarrestar *in vitro* los efectos citopáticos de células infectadas con VIH e impedir la replicación del virus (Huang, Fong & Yeung, 1997; Vlietnick *et al.*, 1998, Matthée *et al.*, 1999). Mientras que en el caso del cáncer existen alrededor de 12 productos naturales, de los cuales al menos 5 así como diversos derivados semisintéticos han sido obtenidos a partir de productos naturales extraídos de plantas, los cuales son empleados en la terapia contra el cáncer (Goodman and Gilman 1996; Pezzuto, 1997).

En la búsqueda de productos naturales dirigidos contra el virus del VIH, las especies pertenecientes a la familia Guttiferae (=Clusiaceae), han presentado una tasa de éxito mayor a la normal, comparada con otros taxa de plantas superiores, lo cual ha culminado en el aislamiento de benzofenonas y coumarinas.

Las coumarinas son metabolitos secundarios, los cuales están ampliamente distribuidos en las plantas superiores, aunque también se han aislado de microorganismos. Estas sustancias en la actualidad han despertado gran interés debido al amplio rango de actividad biológica que presentan, en particular destaca su actividad sobre el VIH-1 (Matern *et al.*, 1999). Estos compuestos actúan inhibiendo la enzima transcriptasa reversa del VIH-1, la cual está involucrada directamente en la multiplicación del virus (Kashman *et al.*, 1992). Por sus propiedades, una coumarina aislada de las hojas del árbol tropical

asiático *Calophyllum teysmanii* (Guttiferae), el (+)-calanólido A, actualmente se encuentra en estudios de fase clínica I con pacientes VIH-1+ en el Instituto Nacional del Cáncer de los E.U.A. y podría convertirse en el primer producto natural que se aprobase para uso clínico (Creagh *et al.*, 1998). Otros productos naturales con actividad antiviral (VIH), como las xantonas (Groweiss *et al.*, 2000), también podrían ser potencialmente útiles en el tratamiento del SIDA, además de constituir moldes para el diseño de nuevos fármacos.

En el caso de la búsqueda de nuevos productos antineoplásicos, las xantonas aisladas de especies de la familia Guttiferae, también han mostrado alta actividad citotóxica cuando se han evaluado sobre diversas líneas tumorales, dichas propiedades se atribuyen a que probablemente actúen como bloqueadores del ciclo celular en la fase G2/M. Los mecanismos moleculares de la acción citotóxica de este tipo de compuestos no se conocen, sin embargo se sabe que algunas xantonas inhiben la síntesis de DNA, RNA y proteínas. (Lin *et al.*, 1996) y aumentan el índice mitótico en la metafase (Bilia *et al.*, 2000). En el caso de las coumarinas, aisladas de especies no relacionadas se sabe que actúan a nivel del ciclo celular en la fase G1 (Kofinas *et al.*, 1998), y también inhiben la síntesis macromolecular (Marshall *et al.*, 1994).

Estos compuestos son por lo tanto candidatos potenciales para ser incorporados en un futuro a la quimioterapia, o servir de modelos para realizar derivados semisintéticos más potentes y específicos.

Al igual que en el punto anterior la búsqueda de nuevos fármacos antimicrobianos también es una área de gran interés debido a la emergencia de cepas bacterianas resistentes a los fármacos comúnmente utilizados, las xantonas han mostrado de moderada a alta actividad antimicrobiana, un ejemplo de lo anterior lo representa la rubraxantona que ha mostrado ser fuerte bactericida (Iinuma *et al.*, 1996).

Es importante que países poseedores de una gran diversidad biológica, como México, conozcan y de ser posible aprovechen sus recursos bióticos. En México existen al menos 16 especies de Guttiferas (Maguire, 1979), de las cuales solo 3 han sido investigadas químicamente, por este motivo, en la presente tesis se planteó como objetivos 1) investigar químicamente la especie *Calophyllum brasiliense* 2) examinar, si los compuestos aislados (principalmente coumarinas y xantonas) podían inhibir *in vitro* la actividad de la reversa transcriptasa (RT) del VIH-1, presentar efectos citotóxicos y actividad antibacteriana.

II. ANTECEDENTES

1. El género *Calophyllum*

El género *Calophyllum* es el más importante miembro de la familia Clusiaceae (Guttiferae), está constituido por 187 especies, todas ellas árboles tropicales. La mayoría (179) se encuentran en el Viejo Mundo en especial en la zona Indo-Malasia con extensión hacia las islas de Madagascar y Fuji. Se estima que solo 8 especies se distribuyen en el Continente Americano, desde México hasta las Antillas, y Centro América, Venezuela, Colombia, Perú, Bolivia, Brasil y las Guayanas (Steves, 1980). Este género se encuentra básicamente restringido a selvas húmedas, en tierras bajas, colinas y a veces en bosques de montaña, aunque algunas especies crecen en hábitats secos (Steves, 1980).

1.1. *Calophyllum brasiliense*

C. brasiliense es un árbol caducifolio con una altura aproximada de 40 a 50 metros y con un diámetro a la altura del pecho de aproximadamente 1.80 metros. Presenta flores blancas, diócas, las flores masculinas despiden un ligero aroma, florece de julio a diciembre. El fruto se presenta en drupas de color verde amarillento (Martínez, 1994, Pennington y Sarukhan, 1968, Echenique-Manrique, 1970). Del número de especies arriba mencionadas, *Calophyllum brasiliense* es la única especie del género que llega y se distribuye en México (Pennington y Sarukhan, 1968, Standley 1932). Esta especie se distribuye en América Latina, desde Brasil hasta México. En México, crece en los remanentes de Selvas Altas y Medianas Perennifolias y Subcaducifolias, se localiza tanto en las vertientes del golfo, como del Pacífico. En el sur de Veracruz, oeste de Tabasco y norte de Chiapas, es una especie abundante y codominante de la selva alta perennifolia junto con *Terminalia amazonia*, *Dialium guianense* y *Guatteria anomala*. Su amplitud altitudinal va desde al nivel del mar hasta los 1170 msnm (metros sobre el nivel del mar) (Pennington y Sarukhan 1968, Chudnoff, 1984, Ortega *et al.*, 1991, Campos *et al.*, 1992 Echenique- Manrique, 1970).

1.2. Composición química

Estudios fitoquímicos previos del género *Calophyllum* han revelado que es una fuente rica en metabolitos secundarios tales como: ésteres de ácidos grasos, ácidos libres, saponinas, glucósidos cianogénicos, taninos, terpenoides, triterpenos, esteroides, xantonas, 4-alkil-coumarinas, 4-aril-coumarinas (neoflavonoides) y benzofenonas (Patil *et al.*, 1993, Kashman *et al.*, 1992). Las xantonas, así como las coumarinas, en los últimos años han despertado gran interés debido a la amplia e interesante actividad biológica que han mostrado, por lo que en el presente trabajo se tratara a detalle estos dos grupos de substancias.

1.2.1. Coumarinas

En el caso de los neoflavonoides o 4-aryl- o 4-alkil- coumarinas han existido dificultades para determinar la biogénesis debido a que estas son sintetizadas casi exclusivamente por especies pertenecientes a las familias Leguminosae y Guttiferae, las cuales generalmente agrupan árboles tropicales de gran tamaño (Manitto, 1981). Gautier *et al.*, (1972) suministraron fenilalanina marcada radiactivamente en el carbono 3 a plántulas jóvenes de *Calophyllum inophyllum* y posteriormente aislaron ácido calofilico e inofillolido. Estos resultados permitieron plantear una ruta biogenética que incluye los siguientes pasos (Figura 1). El resorcinol o floroglucinol (ambos de origen policétido) son los precursores del anillo aromático condensado de las coumarinas. La β -adición de dichos precursores a una unidad cinnamil (por ejemplo ácido cinámico ó el éster pirofosfato del alcohol cinámico, ambos derivados de la fenilalanina) daría origen al resto del esqueleto, sintetizándose de esta forma las 4-aryl-coumarinas. En el caso de las 4-alkil-coumarinas, el precursor difiere ya que es un ácido carboxílico $\alpha\beta$ insaturado, siendo entonces el sustituyente en posición 4 de tipo alifático (Manitto, 1981).

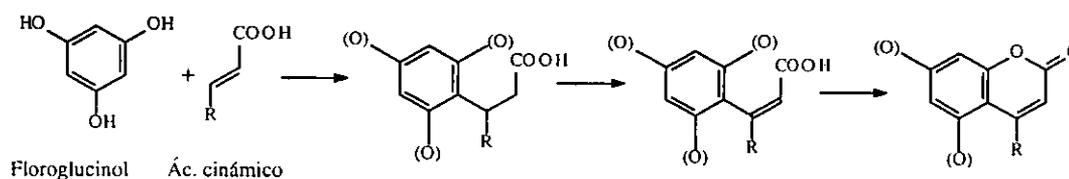


Figura 1. Biosíntesis de neoflavonoides o 4-aryl- o 4-alkil- coumarinas.
(R= C₆H₅ ó n-alkil)

1.2.1.1. Clasificación de Coumarinas

Dentro de las coumarinas aisladas de *Calophyllum* spp, los calanólidos son los compuestos más conocidos, sin embargo se han obtenido otras coumarinas del mismo género las cuales están estructuralmente relacionadas. Las coumarinas de *Calophyllum* actualmente se clasifican en 3 grupos (Fig. 2) (Mc Kee *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 1997). Adicionalmente a la clasificación de las coumarinas del género *Calophyllum*, existe otra clasificación para las coumarinas aisladas del género *Mammea*, el cual es miembro de la familia Guttiferae (figura 3). Dicha clasificación fue propuesta por Crombie *et al* en 1966, e incluye un sistema de nomenclatura con letras.

1.2.1.1.1. Coumarinas de *Calophyllum* spp

- i) Dipiranocoumarinas tetracíclicas: coumarina (anillos A y B), 2,2-dimetilcromeno (anillos A y C) y 2,3-dimetilcroman-4-ol (anillos A y D). Se distinguen por que el anillo C posee un grupo gem-dimetilo, por ejemplo: (+)-calanólido A y (-)-calanólido B.
- ii) Dipiranocoumarinas tetracíclicas donde los anillos de pirano C y D están invertidos, esto es, el grupo gem-dimetilo se encuentra en el anillo D, por ejemplo: pseudocalanólidos.

iii) Piranocoumarinas tricíclicas, las cuales contienen un sustituyente no ciclizado equivalente al anillo D.

Los compuestos pertenecientes a cualesquiera de los grupos anteriores, pueden además variar con respecto al sustituyente en C-4, el cual puede ser: metil, n-propil o fenil.

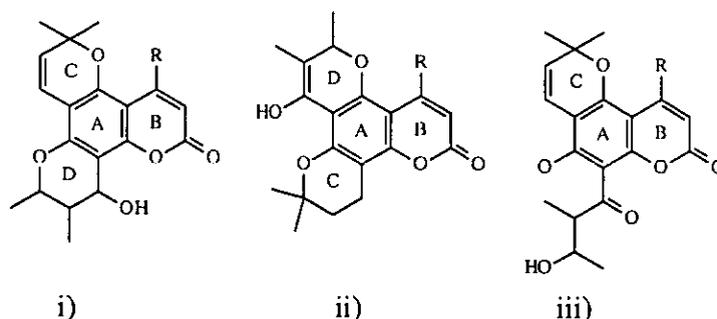


Figura 2. Tipos de coumarinas aisladas de *Calophyllum spp*
R=propil, fenil o metil.

1.2.1.1.2. Coumarinas de *Mammea spp*

1. Todas las coumarinas aisladas del genero *Mammea* reciben el nombre de Mammea
2. El nombre mammea es seguido por una letra que designa el tipo de sustituyente localizado en el carbono 4:

A= fenilo
B= propilo
C= pentilo
D=1-metilpropilo
E= 1-acetoxipropilo

1. Una diagonal separa a esta letra de una segunda letra la cual indica sí el sustituyente acilo esta presente, así como la posición de este con respecto al sustituyente prenilo:
A=6-acilo ó B=8-acilo
2. Una tercera letra define el tipo de sustituyente acilo:
A=3-metilbutiril B=2-metilbutiril
C=butiril D=2-metilpropionyl
3. En los casos en donde el sustituyente prenilo se ha modificado por ciclización, la tercera letra es seguida por el prefijo ciclo y una cuarta letra indica el tipo de heterociclización:
Ciclo D=2,2-dimetilcromeno
Ciclo E=3-hidroxi-2,2-dimetildihidropirano
Ciclo F=2-(1-hidroxi-1-metiletil)dihidrofurano

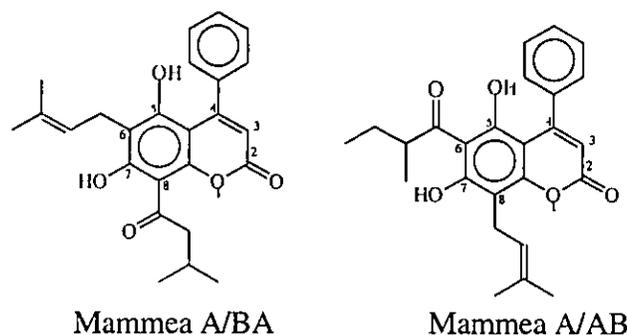


Figura 3. Coumarinas aisladas de *Mammea* spp.

1.2.2. Xantonas

Las xantonas presentan un esqueleto básico derivado de la benzofenona. Tienen su origen en la fenilalanina merced a su producto de degradación; el ácido m-hidroxibenzoico (C₆-C₁) y su posterior condensación con tres unidades de malonato. Otra ruta podría ser: la combinación de una unidad C₆-C₃, por ejemplo un ácido cinámico con dos unidades de malonato para obtener benzofenona. El acoplamiento oxidativo podría conducir a la formación de la xantona (Figura 4). (Gros *et al.*, 1985). Las xantonas pueden ser simples o modificadas. En este último caso por la presencia de un sustituyente glicosídico o grupo prenilado (2,2 dimetilalil) (Figura 5). Además por grado de oxigenación que presenten pueden ser clasificadas como mono, di, tri, o tetraoxigenadas (Bennett *et al.*, 1989; Peres *et al.*, 1997).

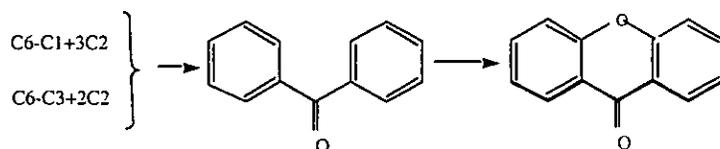


Figura 4. Origen biosintético de las xantonas.

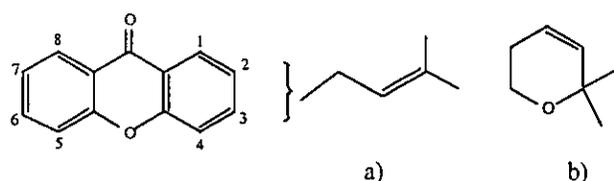


Figura 5. Esqueleto de la xantona y sus sustituyentes a) sustituyente isoprenilo (2,2-dimetilalil). b) sustituyente cromeno producto de la ciclización del isoprenilo con un OH fenólico de la xantona.

2. Actividad Biológica de coumarinas y xantonas

Dentro de este marco podemos mencionar que las coumarinas y xantonas tanto de especies del género *Calophyllum* como de otras especies de familias relacionadas taxonómicamente, han despertado gran interés debido al amplio espectro de actividad biológica que estas han mostrado.

En el caso de las coumarinas estas han desplegado actividades tales como: anticoagulante, antipsoriática, antiinflamatoria, antiplaquetaria, citotóxica, antimutagénica, inhibición de la activación de las células T, de la generación de superóxido en neutrófilos activados, de enzimas tales como: lipoxigenasa, DNA girasa o topoisomerasa y en particular han destacado las propiedades antivirales de algunas coumarinas aisladas de las hojas de diversas especies asiáticas (Matern *et al.*, 1999; ver inciso 2.1.1). Las xantonas también han sido objeto de minuciosas investigaciones con relación a sus propiedades biológicas, con lo cual se ha demostrado que presentan actividad: funguicida, antimálarica, antibacteriana, citotóxica, antiparasitaria, anticoagulante, antimutagénica, han mostrado ser estimulantes del S.N.C, así como inhibidores de la enzima transcriptasa reversa del VIH. (Sordat-Diserens *et al.*, 1992; Rath *et al.*, 1996; Peres *et al.*, 1997; Groweiss *et al.*, 2000)

Debido a la relevancia que tiene el saber que las coumarinas y xantonas presentan actividad antiviral, citotóxica así como antibacteriana, en las siguientes secciones se dará una introducción acerca de las características e importancia del virus del VIH, así como la importancia de buscar nuevos fármacos antineoplásicos y antimicrobianos, finalmente en cada sección se concluye con los antecedentes que apoya dicha actividad.

2.1 El virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA) se caracteriza por una notable disminución en los niveles de linfocitos T CD4+, lo cual ocasiona pérdida de inmunocompetencia y le confiere alta susceptibilidad al organismo a infecciones oportunistas así como del desarrollo de tumores malignos, todo ello con consecuencias letales. La descripción de SIDA como una nueva enfermedad humana se realizó en 1981 y apenas dos años después se logró aislar e identificar el agente causal: el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Soler & Gaudiño-Rosales, 1995). La epidemia de SIDA ha cobrado desde entonces un total de 11.7 millones de vidas en todo el mundo (Turner & Summers, 1999). En México, la progresión de la epidemia también ha sido dramática; de acuerdo a cifras oficiales, en 1983 se presentaron 66 casos de SIDA, alcanzando en el año 2000 un total de 43,000 casos acumulados (http://sida.udg.mx/f_organiza.html; SNVE, 2000).

El VIH es un lentivirus complejo que posee como material genético dos copias idénticas de ácido ribonucleico (ARN) de una sola hebra de aproximadamente 9.2 kb de longitud. Se han aislado dos tipos en los seres humanos: VIH-1 y VIH-2. Estos difieren en sus propiedades serológicas y secuencia genómica, en especial para el gene *env* que codifica la glicoproteína de la membrana viral (gp 120) y la transmembranal (gp41). En cuanto a su distribución geográfica, el VIH-1 predomina en América, Asia y Europa; mientras que el VIH-2 se localiza preferentemente en África. El probable origen del VIH-1 y VIH-2 es

de, dos lentivirus endémicos a dos especies de simios, el virus de la inmunodeficiencia del chimpancé (VIScpz) y virus de la inmunodeficiencia del mangabey (VISmm), respectivamente (Fields *et al* 1996; Turner and Summers, 1999; Soler and Gaudiño-Rosales, 1995).

La multiplicación del virus en el organismo humano depende fundamentalmente de tres enzimas codificadas por el genoma viral: a) la reversa transcriptasa (RT) responsable de la síntesis de ADN proviral a partir del ARN viral, b) la integrasa que regula la integración del ADN proviral al genoma de la célula hospedera y c) la proteasa la cual procesa poliproteínas virales transformándolas en enzimas funcionales y proteínas estructurales, facilitando la maduración e infectividad de las partículas virales (Fields *et al* 1996; Turner and Summers, 1999).

La reversa transcriptasa del VIH (RT) es en principio una ADN-polimerasa que sintetiza ADN de cadena doble a partir de ARN de una sola hebra como molde. Para este propósito, la RT es multifuncional y posee actividad de ADN polimerasa dependiente de ARN, ribonucleasa (ARNasa H) y ADN polimerasa dependiente de ADN (Fields *et al* 1996; Matthée *et al*, 1999). Durante la biosíntesis de la RT del VIH-1, se produce inicialmente un precursor dimérico compuesto de 2 unidades idénticas de 66 kDa (p66/p66). Una de las unidades es hidrolizada por la proteasa viral para dar origen a la enzima catalíticamente activa, la cual es un heterodímero p66/p51. La unidad p66 posee los dominios de ADN polimerasa y ARN ribonucleasa, su estructura tridimensional ha sido determinada por difracción de rayos X y se equipara para fines didácticos con la mano derecha abierta vista de frente (Kohlstaedt *et al*, 1992).

La RT del VIH ha sido un blanco importante en la terapéutica del SIDA, de tal forma que se han desarrollado fármacos que inhiben la actividad de dicha enzima. La inhibición de la RT se ha determinado principalmente evaluando sus propiedades de ADN polimerasa dependiente de ARN, esto mediante la incorporación de nucleótidos marcados con ³H, o bien ³²P, al ADN recién formado. Menos frecuente es el empleo de ensayos no isotópicos, los cuales pueden ser realizados sin pérdida de sensibilidad y especificidad y con mayores ventajas en cuanto seguridad y facilidad de manejo (Vlietnick *et al*, 1998; Simmons *et al*, 1997; Shao *et al* 1997).

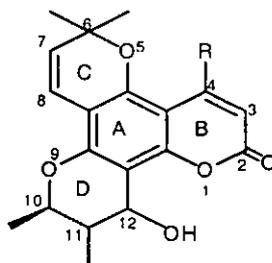
A la fecha se conocen 2 tipos de inhibidores de RT: nucleósidos (NRTIs) y no nucleósidos (NNRTIs) (Huang, Fong & Yeung, 1997). Los inhibidores nucleósidos de la RT fueron los primeros en ser desarrollados y aún son los fármacos retrovirales más importantes. Hoy día los fármacos aceptados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA), comprenden nueve inhibidores de la reversa transcriptasa (5 NRTIs y 3 NNRTIs) y cinco inhibidores de proteasa (<http://www.niaid.nih.gov/daids/dtpdb/fdadrug1.htm>).

2.1.1. Coumarinas

De las coumarinas aisladas del género *Calophyllum* y especies relacionadas taxonómicamente, el (+)-calanólido A (Figura 6) ha sido el compuesto con mayor actividad sobre el virus del VIH, en particular contra la enzima transcriptasa reversa.

Dicha sustancia fue aislada por primera vez de los brotes y frutos del árbol tropical *Calophyllum lanigerum* de Malasia (Kashman *et al*, 1992). En este trabajo también se describieron por primera vez sus propiedades anti-VIH-1 *in vitro* mediante dos ensayos de viabilidad celular con células linfoblásticas T humanas (CEM-SS) infectadas. En el ensayo con XTT tetrazolium-formazan, el (+)-calanólido A detuvo la replicación del VIH-1 y confirió 100% de protección contra los efectos citopáticos ($EC_{50} = 0.1 \mu M$) del virus. La citotoxicidad del compuesto (vs. células no infectadas) se manifestó a concentraciones 200 veces mayores ($IC_{50} = 20 \mu M$) (Tabla 1). Resultados similares se obtuvieron con el segundo método, estableciendo además que el (+)-calanólido A inhibía la producción de RT y de la proteína gp24 viral. También se demostró que el (+)-calanólido A inhibe específicamente la actividad de la RT del VIH-1 mediante ensayos de la RT recombinante sobre moldes homopoliméricos de poliA y poliT. No obstante, el (+)-calanólido A fue inactivo contra células infectadas con VIH-2, así como con la RT de este virus.

Figura 6. Piranocoumarinas aisladas de *Calophyllum spp*



| Configuración | Calanólidos (R = Pr) | Inofilums (R = Ph) | Cordatolidos (R = Me) |
|--|-------------------------|-----------------------|--------------------------|
| <i>trans, trans</i> (11 α -Me, 12 β -OH) | Calanólido A | Inofilum B | cordatólido A |
| <i>trans, cis</i> (11 α -Me, 12 α -OH) | Calanólido B | Inofilum P | cordatólido B |
| <i>cis, trans</i> (11 β -Me, 12 α -OH) | _____ | Inofilum D | _____ |
| <i>cis, cis</i> 11 β -Me, 12 β -OH | Calanólido C | Inofilum A | _____ |

De *C. lanigerum*, se aislaron además 7 coumarinas adicionales, de las cuales dos también fueron activas (Kashman *et al*, 1992). El epímero en C-12 del (+)-calanólido A, el (-)-calanólido B (Figura 6), también presentó propiedades antivirales, pero requirió concentraciones 4 veces mayores para lograr niveles de citoprotección equivalentes a las del (+)-calanólido A (Tabla 1). El 12-acetoxi-calánólido fue aún menos potente, pues presentó una $EC_{50} = 2.7 \mu M$, esto es una concentración 27 veces mayor comparada con la del (+)-calanólido A. También se estableció la estereoquímica absoluta del (+)-calanólido A y (-)-calanólido B, como: 10R,11R,12S y 10R,11R, 12R, respectivamente.

En 1993 se aislaron dos piranocoumarinas de las hojas de *C. inophyllum* de Malasia, los inofilums B y P (Figura 6), los cuales también inhibieron la RT del VIH-1 ($EC_{50} = 38$ y 130

nM, respectivamente) y ofrecieron protección contra los efectos citopáticos del VIH-1 en cultivos de células infectadas (Patil *et al.* 1993; Tabla 1). Los inofilums B y P, a diferencia del (+)-calanólido A y el (-)-calanólido B, presentaron un sustituyente fenilo en la posición 4.

Más adelante, se aislaron los cordatólidos A y B (Figura 6) de las hojas de *C. cordatoblongum* de Sri Lanka. Dichos compuestos inhibieron *in vitro* la actividad de la RT del VIH-1 ($EC_{50} = 12.3$ y $19 \mu\text{M}$, respectivamente), sin embargo, en este caso no se ensayó el efecto de los compuestos sobre células infectadas (Dharmaratne *et al.*, 1998). Los cordatólidos difieren del (+)-calanólido A y el (-)-calanólido B, por la presencia de un sustituyente metilo sobre C-4.

Tabla 1. Coumarinas naturales (*Calophyllum spp*) y sintéticas activas contra la RT del VIH-1

| Compuesto | $EC_{50}^* \mu\text{M}$ | $IC_{50}^{**} \mu\text{M}$ | Fuente |
|---|-------------------------|----------------------------|--|
| (+)-Calanólido A ¹ | 0.1 | 20.0 | <i>C. lanigerum</i> |
| (-)-Calanólido B ¹ | 0.4 | 15.0 | <i>C. lanigerum</i> |
| Calanólido F ² | 2.84 | 12.7 | <i>C. lanigerum</i> var. <i>austrocoriaceum</i> |
| Inofilum B ³ | 1.40 | 55.0 | <i>C. inophyllum</i> |
| Inofilum P ³ | 1.60 | 25.0 | <i>C. inophyllum</i> |
| Costatólido ⁴ = (-)-Calanólido B | | | <i>C. teysmannii</i> |
| Soulatrólido ⁵ = Inofilum B | | | <i>C. teysmannii</i> |
| (±)12-Oxocalanólido A ⁶ | 0.40 | 5.8 | Síntesis |
| (+)12-Oxocalanólido A ⁶ | 0.90 | >10 | Síntesis |
| (-)12-Oxocalanólido A ⁶ | 3.41 | >10 | Síntesis |

¹Kashman *et al.*, 1992; ²McKee *et al.* 1996; ³Patil *et al.*, 1993; ⁴Fuller *et al.*, 1994; ⁵Pengsuparp *et al.*, 1996; ⁶Xu, *et al.* 1998. *Concentración efectiva que inhibe el 50% de la producción viral, 50% de la infectividad, o 50% de los efectos citopáticos inducidos por el virus. **Concentración efectiva que reduce en 50% el crecimiento celular o la viabilidad de células no infectadas.

El (+)-calanólido A se obtiene en cantidades muy reducidas (<1 mg/g extracto) de las hojas de *C. lanigerum* (Cardellina *et al.*, 1995). Por este motivo, diversos investigadores se interesaron en buscar otras fuentes alternativas que proporcionaran coumarinas antiVIH-1 en cantidades suficientes. De esta forma, se ha determinado que es factible aprovechar el látex de *C. teysmannii* var. *inophylloide*, ya que contiene cantidades apreciables de costatólido (hasta 48%) (Spino *et al.*, 1998).

Otra manera de obtener un suministro adecuado de (+)-calanólido A que permitiese investigar sus propiedades farmacológicas, fue a través de la síntesis total de este compuesto. Actualmente se ha logrado sintetizar la mezcla racémica de calanólido A,

logrando además la resolución de los enantiómeros (+) y (-) por métodos cromatográficos (Flavin *et al.*, 1996). El (+)-calanólido A sintético presentó actividad anti-VIH *in vitro* similar a la del producto natural mientras el (-)-calanólido A fue inactivo (Flavin *et al.*, 1996).

Otros esfuerzos para lograr la síntesis del calanólido A, permitieron obtener la mezcla racémica del 12-oxocalanólido A (Khilevich *et al.*, 1996a, 1996 b), logrando separar ambos enantiómeros (Xu *et al.*, 1998). Tanto el (+), como el (-), así como el (±)-12-oxocalanólido A, presentaron una alta actividad contra el VIH-1; la EC_{50} de la mezcla racémica fue idéntica a la del (-)-calanólido B, lo cual es importante puesto que no se requeriría purificar los enantiómeros para su empleo. Los anteriores compuestos además resultaron activos contra el virus de inmunodeficiencia de simios (VIS); pero no así contra el VIH-2. El (+) y (±)-12-oxocalanólido A actúan específicamente sobre la RT ($IC_{50} = 10-40 \mu M$), pero no inhiben la adsorción del virus a las células humanas, la integrasa, proteasa, ni la fusión celular (Xu *et al.*, 1998).

Las piranocumarinas se han examinando desde el punto de vista farmacológico. Se ha estudiado la farmacocinética del costatólido, dihidrocostatólido y (±)-calanólido A, dichos compuestos fueron administrados por vía oral, intravenosa e intraperitoneal a ratones. La biodisponibilidad oral de dichos compuestos fue pobre, mientras que por vía intravenosa e intraperitoneal alcanzó aproximadamente el 95% de cada producto (Newman and Madden, 1995). También se ha determinado el perfil de seguridad del (+)-calanólido A en voluntarios sanos (VIH-1 negativos). El efecto adverso más común fue mal sabor de boca y mareo. El (+)-calanólido A es tolerado en dosis de hasta 800 mg, por lo que desde 1997 el INC inició estudios clínicos de fase 1 en pacientes VIH-1 negativos (Creagh *et al.*, 1998; <http://www.niaid.nih.gov/daids/dtpdb/004462.htm>).

2.1.1.1. Coumarinas antiVIH-1: relaciones estructura-actividad

Hasta el momento se ha encontrado que solo las dipiranocoumarinas tetracíclicas (grupo i, Figura 2) presentan actividad antiVIH-1, mientras que ninguno de los compuestos aislados pertenecientes a los otros grupos son activos (McKee *et al.*, 1996). Las piranocoumarinas antiVIH-1 (Figura 6) pueden presentar en la posición 4 cualesquiera de los tres tipos de sustituyentes conocidos: propil ((+)-calanólido A y (-)-calanólido B), fenil (inofilums B y P) y metil (cordatólidos A y B). Los primeros son los más potentes y los últimos los menos (Tabla 1).

Se ha establecido que el anillo D[†] (*trans*-10,11-dimetildihidropirano12-ol) posee las características estructurales indispensables para la actividad antiVIH-1 del (+)-calanólido A y por lo tanto es el fragmento más importante. La presencia de un heteroátomo, en especial de un grupo OH, sobre el carbono 12, es crucial para dicho tipo de actividad (Galinis *et al.*, 1996; Zembower *et al.*, 1997). Diversos autores señalan el OH-12 debe ser β para obtener máxima actividad y atribuyen algunos resultados contradictorios publicados a que los productos naturales estudiados podrían estar parcialmente racemizados (Flavin *et al.*, 1996).

En todo caso, un grupo ceto en la posición 12 (12-oxocalanólido A) no ocasiona una pérdida de la actividad, sino solo disminución a la cuarta parte de la actividad antiVIH-1 comparada con la del (+)-calanólido A (Tabla 1). En el caso de la síntesis del 12-oxocalanólido A, la pérdida de potencia se compensa con la actividad de la mezcla racémica (Xu *et al.*, 1998).

Se ha sugerido que los dos metilos y el hidroxilo del 2,3-dimetilcroman-4-ol (anillos A y D) deben presentar tres orientaciones sucesivas sobre las posiciones 2, 3 y 4 (10, 11 y 12) para obtener la máxima actividad inhibitoria de la RT del VIH-1 (Ishikawa *et al.*, 1997). Así, el inofilum B con configuración *trans, trans* muestra la máxima actividad ($IC_{50} = 0.038 \mu M$), seguido por inofilum P *trans, cis* ($IC_{50} = 0.13 \mu M$), luego el inofilum D *cis, trans* ($IC_{50} = 11 \mu M$) y finalmente el inofilum A *cis, cis* ($IC_{50} = 30 \mu M$) (Figura 6).

Para investigar el papel del cromanol, se prepararon una serie de análogos del (+)-calanólido A y se evaluó su efecto protector contra la citopatocidad de VIH-1 mediante el ensayo de XTT (Zembower, *et al.*, 1997). La remoción del metilo en C-10 ocasionó que solo un epímero (OH β -12) presentara actividad, aunque disminuida. La sustitución del metilo en C-10 por un etilo se tradujo en una disminución a $\frac{1}{4}$ comparada con la mezcla racémica del calanólido A; pero si el sustituyente era un isopropilo se perdía por completo la actividad. La sustitución de los metilos por etilos sobre las posiciones 10 y 11 ocasionó disminución de la actividad anti-VIH-1. En todos los ejemplos anteriores, la relación *cis* entre los alquilos en 10 y 11 implicó inactividad. Sin embargo, los derivados cetónicos en 12, con relación *cis* o *trans* entre los metilos 10 y 11 si presentaron actividad.

2.1.1.2. Interacción del (+)-Calanólido A con la Reversa Transcriptasa

Se ha estudiado el efecto del (+)-calanólido A sobre quimeras moleculares, las cuales contienen segmentos complementarios de las transcriptasas reversas del VIH-1 y VIH-2, con la finalidad de conocer que segmentos o sitios de la secuencia de aminoácidos son críticos para la inhibición, determinando que el segmento crucial se encuentra entre los residuos 94 a 157 en la transcriptasa reversa del VIH-I, pero también puede existir un segmento adicional, situado entre los aminoácidos 224 y 427. En otros experimentos, en los cuales se generaron mutaciones puntuales en la TR, sugirieron que la sensibilidad al (+)-calanólido A depende de los aminoácidos leucina en posición 100, tirosina 188 y en menor grado sobre la lisina 103 (Hizi *et al.*, 1993; Boyer *et al.*, 1993). Lo anterior sugiere que el (+)-calanólido A tiene dos sitios de unión y es posible que los dos segmentos de TR que le confieren sensibilidad a dicho compuesto estén interaccionando con una única molécula inhibitoria. (Hizi *et al.*, 1993; Boyer *et al.*, 1993; Currens *et al.*, 1996).

Adicionalmente se ha examinado la estructura tridimensional de la TR para determinar si estos segmentos pueden estar en contacto suficientemente cercano para formar un único sitio de unión para el (+)-calanólido A. El modelo tridimensional de la TR muestra que el sitio hidrofóbico, al cual se une el nevirapine (droga de tipo no nucleósido), se encuentra próximo en la base del "pulgar" y cercano a la "muñeca". El nevirapine se une al sitio hidrofóbico justo por debajo del sitio activo de la TR e interactúa directamente con los

residuos de tirosina en posición 181 y 188 (Kohlstaedt *et al.*, 1992). En el caso del (+)-calanólido A, al parecer interacciona con los mismos aminoácidos, pero en particular con el residuo de tirosina 188 (Currens *et al.*, 1996).

También se han realizado evaluaciones de la actividad del (+)-calanólido A sobre cepas del VIH resistentes al 1-[(2-hidroxietoxi)metil]-6-(feniltio)timina (HEPT), encontrando que cambios simples en la secuencias de aminoácidos de RT, en especial en los aminoácidos 101, 103, 106, 181 o 236 dan al virus alta resistencia al HEPT, pero no al (+)-calanólido A. (Buckheit *et al.*, 1995).

Los estudios emprendidos sobre el (+)-calanólido A desde 1992, han llevado a concluir que es un nuevo tipo de inhibidor no nucleósido de la RT (NNRTI) del VIH-1 y es un fuerte candidato para transformarse en fármaco. Recientemente se realizó con éxito el primer ensayo de actividad del (+)-calanólido A *in vivo*. Dicho compuesto administrado oral o parenteralmente inhibió la replicación del VIH-1 IIIb en un modelo de células CEM-SS humanas infectadas implantadas dentro de una fibra plástica hueca en ratón (Xu *et al.*, 1998).

Sintetizando, algunas de las características más sobresalientes del (+)-calanólido que determinan su importancia farmacológica (Xu *et al.*, 1998) son:

- a).-Presenta actividad selectiva contra el VIH-1, pero no contra otros retrovirus, como el VIH-2.
- b).-Presenta actividad contra una gran diversidad de cepas de VIH-1, tanto de referencia obtenidas de muestras clínicas incluyendo aquellas que inducen sincicio. Provee citoprotección a células humanas establecidas o nuevas, incluyendo leucocitos periféricos y macrófagos.
- c).- Es activo contra cepas virales resistentes a los fármacos convencionales, por ejemplo AZT y 3TC, así como contra cepas con las mutaciones Y181C y K103N que confieren resistencia contra la mayoría de los NNRTIs (nevirapine, delarvide y efavirenz).
- d).-Es inactivo contra cepas con la mutación T139I; la cual, sin embargo, es susceptible a casi todos los otros agentes antiHIV, incluyendo los NNRTIs.
- e).-Se une en dos sitios diferentes de la RT y su mecanismo de acción es único. Presenta sinergismo en combinación con NRTIs, inhibidores de proteasa y algunos NNRTIs.
- f).-Debido a su naturaleza lipofílica se distribuye rápidamente en el cerebro y linfa luego de su administración oral e intravenosa en ratas, por tanto penetra a los reservorios virales

2.1.2. Xantonas

Las xantonas comúnmente se encuentran en la madera del género *Calophyllum* y especies de familias relacionadas taxonómicamente. Las benzofenonas son precursores biogénicos de las xantonas (Schmidt and Beerhues, 1997), pero las posibles propiedades antiVIH-1 de estos compuestos han sido poco investigadas. Recientemente se encontró que dos xantonas preniladas (Figura 7) aisladas de la corteza de *Maclura tinctoria* (Moraceae) presentan actividad anti-VIH-1 *in vitro*. Las macluraxantonas A y B presentaron $EC_{50} = 1-2.2 \mu\text{g/ml}$,

sin embargo, también presentaron alta toxicidad ($IC_{50} = 2.3-3.7 \mu\text{g/ml}$) a las células humanas hospederas CEM-SS (Groveiss *et al.*, 2000). Además, se ha reportado que el swertifranchisido (1,5,8-(trihidroxi-3-metoxi-7-(5',7',3'',4''-tetrahidroxi-6'-C- β -D-glucopiranosil-4'-oxi-8'-flavil)-xantona), aislada de *Swertia franchetiana* (Gentianaceae), inhibió la RT del VIH-1 con un $IC_{50} = 3 \mu\text{g/ml}$ (Wang *et al.*, 1994). Adicionalmente la mangostina y la γ -mangostina, aisladas de *Garcinia mangostana* (Guttiferae) inhiben de manera no competitiva la actividad de la proteasa del VIH-1 (Chen *et al.*, 1996).

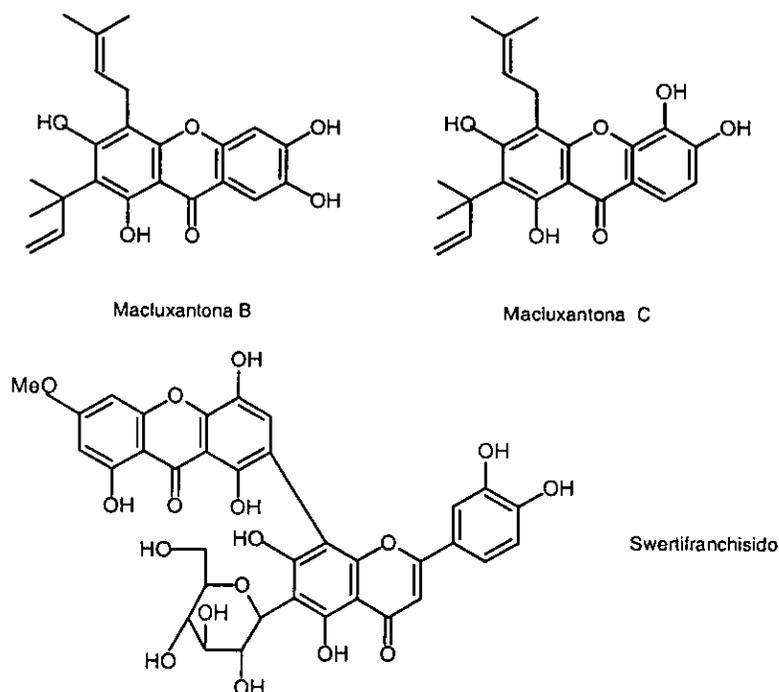


Figura 7. Xantonas con actividad anti-VIH-1

2.2. Actividad Citotóxica

Debido a que el cáncer, es una enfermedad de alta incidencia a nivel mundial y estudios epidemiológicos aportan la evidencia de que existen factores externos tales como agentes químicos, radiaciones y virus, los cuales juegan un papel muy importante en la generación de dicho padecimiento, causando alteraciones a nivel del ADN, RNA y/o proteínas (Perucho 1998) y dado que muchos de los fármacos con los que se cuenta en la actualidad presentan efectos adversos muy severos durante el tratamiento quimioterapéutico, es de gran importancia encontrar y proponer nuevas moléculas como alternativa a la terapia antitumoral.

La búsqueda de productos naturales para la terapia contra el cáncer representa una área de gran interés, en la cual las plantas representan una fuente importante. Para llevar a cabo dicha búsqueda, los cernimientos realizados de extractos o sustancias obtenidas de plantas, mediante ensayos de citotoxicidad proveen datos (concentración, efecto, etc.) preliminares

de gran valor para seleccionar las moléculas con propiedades antineoplásicas potenciales (Popoca *et al.*, 1998). La citotoxicidad es un parámetro que se define como: la toxicidad de cualquier molécula evaluada sobre diversas líneas celulares tumorales en cultivo (Suffnes and Douros, 1982).

2.2.1. Coumarinas

Como parte de los estudios de actividad antiviral, las coumarinas aisladas del género *Calophyllum*, en particular los calanolidos (Kashman *et al.*, 1992; Mckee *et al.*, 1996) e inofilinas (Patil *et al.*, 1993) presentaron baja citotoxicidad cuando fueron evaluadas *in vitro* en varias líneas celulares con IC_{50} que van de 12.7 a 55 μ M. (Tabla 1)

En otro trabajo realizado por Morel *et al* (1999), reportaron el efecto citotóxico de 2 coumarinas: racemol y Mammea A/AC ciclo F (figura 8), las cuales fueron aisladas de *Mesua racemosa*, (género relacionado taxonómicamente) contra la línea celular KB, encontrando que estas sustancias también presentaron baja citotoxicidad con porcentajes de inhibición de 49% (10 μ g/ml = 24 μ M) en el caso del racemol y 32% (10 μ g/ml = 24 μ M) para la Mammea A/AC ciclo F.

Mientras que Guilet *et al.* (2000) reportaron el efecto citotóxico de diversas coumarinas aisladas de *C. dispar* (Figura 8) de estas coumarinas la Mammea A/BA ciclo F, Mammea A/BB ciclo F, Mamma A/AA ciclo F, Mammea A/AB ciclo F y Mammea A/AC ciclo F tuvieron una baja actividad citotóxica, inhibiendo el 50 % del crecimiento celular a una concentración de 5 a 15 μ g/ml (=12.5 a 35.6 μ M). Adicionalmente se ha reportado el efecto citotóxico de tres coumarinas estructuralmente no relacionadas (Figura 8). Dicho trabajo fue realizado por Kofinas *et al* (1998) quienes encontraron que las coumarinas: umbelliferona, isoimperatrina y 2'(S),3'(R) -2'-acetoxiisopropil-3'-acetoxi-2',3'-dihydroangelicina aisladas de *Tordylium apulum*. También presentaron baja citotoxicidad (IC_{50} = 12.0, 9.9 y 7.6 μ g/ml (NSCLC-N6) y 8.6, 6.8, y 5.3 μ g/ml (KB).

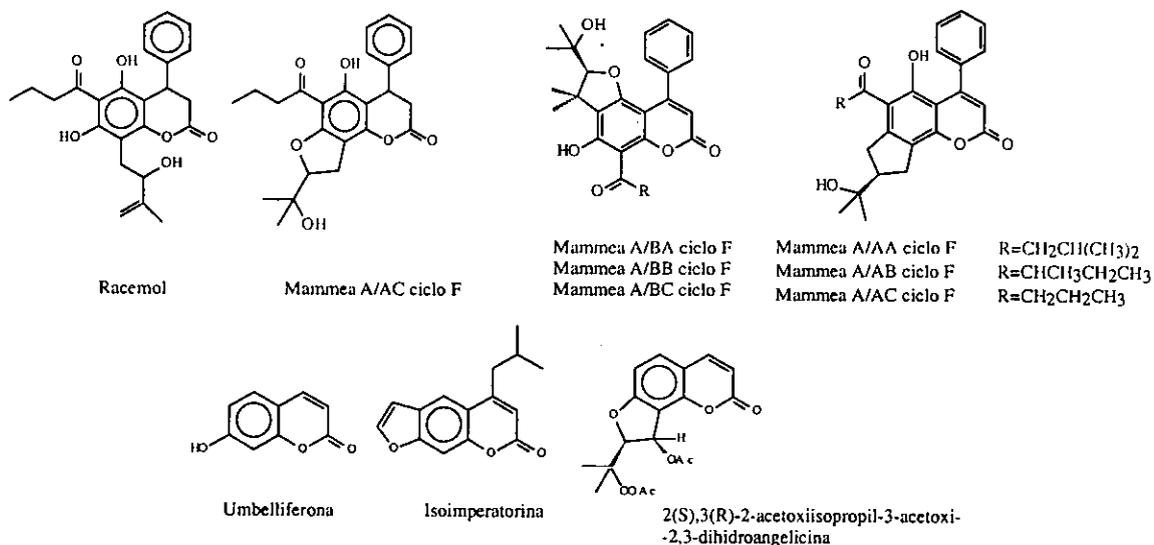


Figura 8. Coumarinas con efectos citotóxicos.

2.2.2. Xantonas

Hasta el momento no existen reportes en la literatura acerca de la actividad citotóxica de xantonas aisladas del genero *Calophyllum*, sin embargo si hay reportes de xantonas pertenecientes a otros géneros de la misma familia (Figura 9), las cuales si han mostrado una importante actividad citotóxica. Seo *et al* 1999, reporta el efecto citotóxico de las xantonas: trapezifolixantona y manglexantona aisladas de *Tovomita brevistaminea*, las cuales fueron evaluadas contra la línea celular KB. Estas xantonas tuvieron actividad citotóxica significativa con $EC_{50}=4.1$ y $1.9 \mu\text{g/ml}$ respectivamente. En otro trabajo realizado por Asano *et al.*, 1996 se reportó el efecto citotóxico de 15 xantonas aisladas de *Garcinia hanburyi* sobre las líneas celulares: HeLa y HEL. De las 15 sustancias solo 8 mostraron moderado efecto citotóxico y de estas la desoxymorellina fue la única que mostró gran actividad ($0.39 \mu\text{g/ml}$) en ambas líneas celulares.

Otro trabajo realizado en 1998 por Proobraser *et al.* reportaron el efecto de siete xantonas aisladas de la fracción metanólica de *Mammea siamensis* contra varias líneas celulares como: Lu-1(cáncer de pulmón humano), KB (carcinoma epidermoide oral humano), LNCaP (cáncer de próstata humano dependiente de hormona), encontrando que todas fueron inactivas con $ED_{50}=20 \mu\text{g/ml}$ Cabe mencionar que todas las xantonas evaluadas presentaron un grupo OMe en posición 1 y pueden o no presentarlo en posición 3.

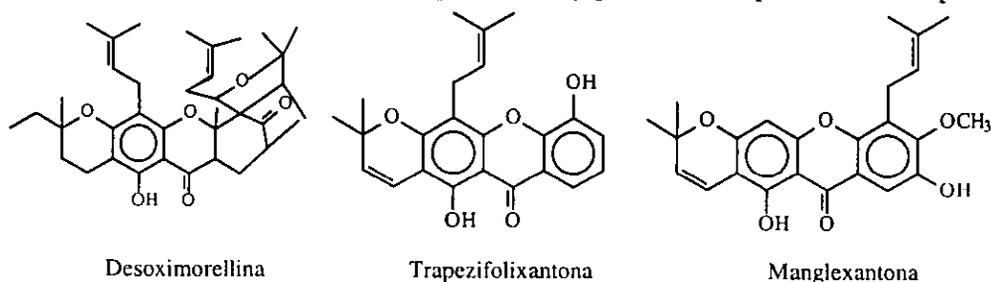


Figura 9. Xantonas con efectos citotóxicos

2.3. Actividad Antibacteriana

Otro aspecto adicional y de no menor relevancia que ha llamado la atención de los investigadores es el surgimiento durante los últimos 30 años, de más cepas resistentes a los diversos fármacos empleados en la actualidad tanto a nivel comunitario como nosocomial, situación que impide recurrir a ellos cuando se los considera la mejor opción terapéutica (Goodman y Gilman, 1996; Miller, 1996).

La resistencia a fármacos empleados en la actualidad se debe principalmente a diversos mecanismos como: a) resistencia ribosomal, la cual es causada a través de mutaciones, lo cual se ve reflejado en cambios estructurales de los receptores proteínicos ribosomales hacia los fármacos, evitando la fijación y en consecuencia el efecto sobre la síntesis de proteínas, b) alteraciones en la permeabilidad de la membrana, lo cual disminuye la penetración de fármacos a través de la pared bacteriana e c) inactivación enzimática, este mecanismo es considerado uno de los más importante y se lleva a cabo mediante recombinación del material genético. La bacteria adquiere fragmentos de DNA extracromosómico que le

Adicionalmente, y a raíz de la aparición de bacterias resistentes a antibióticos, como *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) así como *S. aureus* resistente a penicilina (SARP) (Iinuma, *et al.*, 1996), y dado que la bacteria SARM se ha vuelto una infección importante, principalmente en hospitales, se ha emprendido la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que puedan ser utilizados en el tratamiento de infecciones causadas principalmente por SARM. Dharmaratne *et al.*, (1999), reportaron las MICs contra SARM y contra *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM) de dos xantonas: calozeyloxantona y 6-deoxi- α -mangostina. Encontrando que la calozeyloxantona fue más efectiva contra las dos cepas con valores de MICs=4.1 y 8.1 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la segunda sustancia no mostró actividad significativa (MICs=250 $\mu\text{g/ml}$), respecto a los antibióticos: vancomicina y gentamicina (MICs=0.5, 4.0 y 0.5, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente).

En otro trabajo realizado por Iinuma *et al.*, (1996), también reportaron los MICs de dos xantonas: α -mangostina (*Garcinia mangostana*) y rubraxantona (*G. cowa*) sobre cepas de SARM y SASM. Encontrando que ambas xantonas fueron efectivas con MICs=1.57-12.5 y 0.31-1.25 $\mu\text{g/ml}$ en ambos casos, siendo incluso la rubraxantona más efectiva que el antibiótico vancomicina (MICs=3.13-6.25 $\mu\text{g/ml}$).

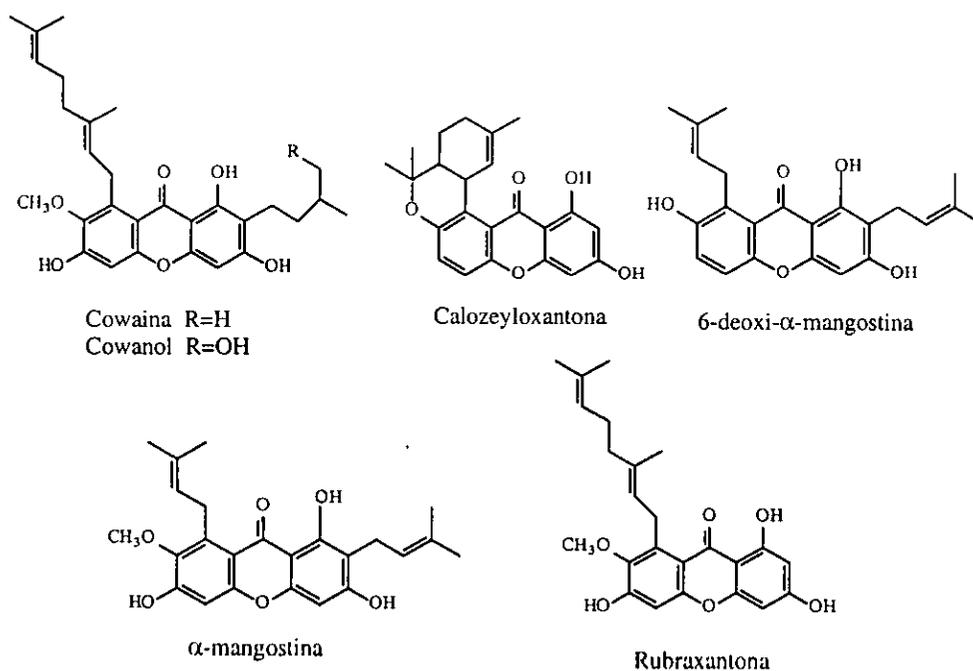


Figura 10. Xantonas con actividad antibacteriana

III. OBJETIVOS

1. Conocer la composición química de las hojas de *Calophyllum brasiliense*.
2. Determinar la presencia de coumarinas del tipo de los calanólidos.
3. Examinar las propiedades biológicas de los compuestos aislados, así como de las xantonas previamente aisladas del duramen de la misma especie, para determinar:
 - a) Efectos sobre la actividad de la enzima transcriptasa reversa (RT) del VIH-1.
 - b) Efectos citotóxicos en diversas líneas celulares tumorales humanas.
 - c) Propiedades antibacterianas sobre diversas bacterias principalmente enteropatógenas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudio fitoquímico

1.1. Material Biológico

Una muestra de hojas de *C. brasiliense* fue proporcionada e identificada por el M. en C. Mario Vázquez de la Universidad Veracruzana. Las hojas fueron colectadas en el ejido Benigno Méndez de Veracruz el 29 de Junio de 1996 por L. H. Bojorquez G. y E. Santiago Cervantes. Ejemplares de herbario están depositados en la Universidad Veracruzana en Jalapa, Veracruz. Las xantonas fueron obtenidas de un trabajo previo realizado con el duramen de *C. brasiliense* (Reyes *et al.*, 1997).

1.2. Cromatografía e Instrumentación

Los extractos se separaron en sus diferentes componentes utilizando cromatografía en columna (c.c.), cromatografía en capa fina (c.c.f.) y preparativa (ccfp). En la separación cromatográfica se utilizaron como adsorbente Gel de Sílice 60 (Merck) y como eluyentes se emplearon diferentes disolventes orgánicos. Para realizar c.c.f. se utilizaron cromatofolios de Sílica Gel de 0.25 mm de espesor (Merck), mientras que para realizar ccfp se empleó cromatoplasmas de Sílica Gel de 2 mm de espesor (Merck). La pureza de los compuestos fue observada por c.c.f. Como reveladores se utilizó luz ultravioleta y una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N.

Las constantes físicas y los datos espectroscópicos, que sirvieron para la identificación de los compuestos aislados, fueron obtenidos como se indica a continuación: Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns; los espectros de infrarojo (IR) se realizaron en los espectrofotómetros Perkin Elmer 283-B y Nicolet FT-JR 5 SX. En el caso de los espectros de ultravioleta (UV) éstos se obtuvieron con un espectrofotómetro Perkin Elmer 552; los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN¹H) se realizaron en los espectrómetros Varian Gemini 2000 (200 MHz), y Varian XL 300 (300 MHz). En el caso de los espectros de Carbono (RMN¹³C) estos se determinaron en un espectrómetro Varian Gemini 2000 (200 MHz). Para obtener los espectros de masas por impacto electrónico (EMIE) se utilizó un espectrómetro Hewlett-Packard 5985-B.

1.3. Aislamiento e identificación de los compuestos

A fin de determinar si las hojas de *C. brasiliense* contenían coumarinas del tipo de los calanólidos se prepararon los extractos orgánicos correspondientes (Esquema 1).

Se colocaron 2075 gramos de hojas cortadas en pequeñas fracciones para aumentar la superficie de contacto con el disolvente y así mejorar la extracción. Se realizaron extracciones a temperatura ambiente durante una semana con cada disolvente de polaridad creciente: hexano (3 veces), acetona (2 veces), metanol (2 veces) y agua (2 veces). Posteriormente los extractos fueron concentrados al vacío en un rotavapor.

1.3.1. Extracto Hexánico

De las tres extracciones realizadas con hexano se obtuvieron un total de 96.91 gramos. En la primera extracción (70.32 g) se observó la precipitación espontánea de unos agregados cristalinos de color blanco, los cuales se lavaron con hexano, obteniéndose 19.88 g ; así como un residuo café (43.98 g). Una muestra de los agregados cristalinos fue analizada por c.c.f. y se observaron tres manchas; la de mayor y menor polaridad presentaron R_f (frente de referencia) similares al de los triterpenos canofilol y friedelina, respectivamente. La mancha de polaridad intermedia aparentemente era un solo compuesto.

Parte de los agregados cristalinos (5.15 g) fueron disueltos en diclorometano. La parte insoluble fué filtrada al vacío obteniéndose un polvo blanco (583.8 mg), el cual por c.c.f. y por comparación con muestras auténticas resultó ser una mezcla de canofilol y friedelina.

El sobrenadante se concentró en un rotavapor eliminándose el CH₂CL₂, posteriormente se agregó hexano frío, e instantáneamente se formó un precipitado blanco, el cual se filtró, este procedimiento se realizó 5 veces, de tal forma que se obtuvieron cinco fracciones (2HH1-5), las cuales por c.c.f. se observaron como una sola mancha con el mismo R_f y que correspondieron al producto de polaridad intermedia de la mezcla original. Este producto al ser analizado por RMN¹H se determinó que era una mezcla de compuestos del tipo de las coumarinas **Mammea A/BA** , **Mamma A/BB** y **epi-Mammea A/BB** reportadas previamente para la especie *Mammea americana* (Crombie *et al.*, 1966,1967,1970 y 1985)

Parte del sobrenadante (clave: 1HH (9.45 g)) fue preabsorbido en celita. La celita se colocó en una columna empacada con gel de sílice para columna. La columna se eluyó con hexano y acetato de etilo, así como mezclas de estos disolventes (Esquema 2).

De la fracción 1 (1HHC1) eluída con hexano se obtuvo una cera de color blanco (883.3 mg) con punto de fusión 52-55 °C, la cual no fue caracterizada.

De las fracciones 3-5 (1HHC3-5) eluídas con hexano precipitó un polvo incoloro (45.9 mg) el cual se determinó que era el triterpeno friedelina al ser comparado por ccf con una muestra auténtica.

En la fracción 6 (1HHC6) eluída con hexano precipitó un polvo fino (5.0 mg) de color blanco, el cual por c.c.f. se observó como un solo compuesto. El análisis espectroscópico permitió determinar que en realidad esta substancia es una mezcla de coumarinas (**Mammea B/BA** y **Mammea B/BB**) similares a las previamente reportadas para la especie *Mammea americana* (Finnegan *et al.*, 1965, Carpenter *et al.*, 1970, Crombie *et al.*, 1970, 1972)

En las fracciones 14 a 25 (1HHC14-25) eluídas con hexano precipitó un polvo color crema (720.6 mg), el cual resultó ser una mezcla de coumarinas iguales a las encontradas en la fracción 2HH5 (**Mammea A/BA**, **Mammea A/BB** y **epi-Mammea A/BB**) al ser comparadas por c.c.f. y por RMN¹H.

Las fracciones 36 y 37 (1HHC36-37) eluídas con una mezcla de hexano/acetato de

etilo 9:1, fueron redisueltas con hexano, formándose un precipitado blanco (83.0 mg) el cual por c.c.f. indicó que era una mezcla de canofilol y otro producto con idéntico Rf. Se procedió a disolver esta mezcla en acetona y se dejó que cristalizara lentamente, obteniéndose dos tipos de cristales: a) agujas incoloras y b) agujas de color opaco, así que se procedió a su separación con una espátula. Los cristales opacos presentaron un punto de fusión de 180-182 °C. Los estudios espectroscópicos revelaron que se trata de una mezcla de coumarinas **Mammea C/OA** y **Mammea C/OB** previamente aisladas de la especie *Mammea africana* (Carpenter *et al.*, 1970). Mientras que los cristales de color opaco se identificaron como el canofilol previamente detectado en la mezcla.

En las fracciones 43 a 46 (1HHC44) eluidas con hexano/acetato de etilo 9:1, fueron redisueltas con hexano, formándose unos cristales amorfos, los cuales por c.c.f. se observaron como una sola mancha. Los estudios espectroscópicos revelaron que en realidad se trataba de una mezcla de coumarinas con un sustituyente propilo en la posición 4 y además presenta en las posiciones 5 y 6 un anillo de tipo furano. Dicha mezcla esta constituida por los compuestos **Mammea B/BA ciclo F** y **Mammea B/BB ciclo F**, siendo el primer compuesto el más abundante dentro de esta mezcla.

De las fracciones 49 a 53 (1HHC50) eluidas con hexano/acetato de etilo 9:1 al agregarle hexano y dejar evaporar se formó un sólido de color blanco (5.0 mg) el cual por c.c.f. se observó como un solo compuesto. Sus estudios de RMN¹H revelaron que se trata de un compuesto del tipo de los terpenos probablemente un triterpeno, pero debido a su poco rendimiento no fue posible establecer su estructura.

1.3.2. Extracto Acetónico

A partir de las dos extracciones realizadas con acetona se obtuvo un total de 101.34 g. Una muestra (19.18 g.) se maceró en 800 ml de acetato de etilo obteniéndose un polvo insoluble de color café (6.03 g.) (4AH) el cual se filtró al vacío (Esquema 1).

Posteriormente a la parte soluble en acetato de etilo (800 ml) fue procesada para eliminar las clorofilas para lo cual se adicionaron 50 gramos de carbón activado, la mezcla se colocó en una parrilla de calentamiento. Después de 10 minutos contados a partir de la primera ebullición se retiró del fuego y se filtró al vacío empleando un embudo Buchner el cual contenía un papel filtro y una capa de celita lavada. El filtrado de esta solución se concentró al vacío hasta un volumen aproximado de 50 ml

A las 24 horas, precipitó de manera espontánea un polvo fino de color blanco (561.1 mg), el cual se filtró al vacío. El precipitado resultó ser una mezcla de friedelina y canofilol al ser comparado por c.c.f. con muestras auténticas. El sobrenadante (5.32 g) fue etiquetado como 3AH2. Este material se preabsorbió en celita y se incorporó a una columna empacada con sílica gel para columna (100 g.) la cual se eluyó con hexano y acetato de etilo así como mezclas de estos disolvente. Se tomaron fracciones de 250 ml (Esquema 3).

De la fracción 10 eluida con hexano/acetato de etilo 9:1 se le agregó hexano y después de un día se formó un precipitado de color amarillo, el cual se filtro al vacío. El

precipitado (3AH2C10(1)) (41.8 mg) con punto de fusión: 162-164 °C; analizado por c.c.f. mostró un solo compuesto. El análisis espectroscópico permitió identificar a este compuesto como la **Isomammeigina (Mammea A/BA ciclo D)**.

Con respecto al sobrenadante de la fracción 10, este se concentró al vacío y después se le agregó acetona, formándose espontáneamente un sólido de color blanco (3AH2C10(2)) (15.3 mg) el cual se filtró al vacío. Este sólido fue identificado como el triterpeno friedelina al ser comparado con muestras auténticas.

En la fracción 11 eluida con hexano/acetato de etilo 8.5:1.5 y después de agregar hexano se formó un precipitado (70.9 mg) el cual al ser comparado con una muestra auténtica, se determinó que se trata del triterpeno canofilol, previamente aislado.

De las fracciones 16 a 17 eluidas con hexano/acetato de etilo 8.5:1.5 y después de agregar hexano se formaron unos cristales incoloros (102.3 mg) con punto de fusión 118-119 °C. Por c.c.f. y RMN¹H se determinó que se trata de la misma mezcla de coumarinas previamente encontrada en la fracción 11HC44 (**Mammea B/BA ciclo F**, **Mammea B/BB ciclo F**) del extracto hexánico.

En la fracción 18 (3AH2C18) eluida con hexano/acetato de etilo 8.5:1.5, se formó un sólido amorfo de color crema (5.6 mg), el cual por c.c.f. se observó como una sola mancha. El análisis de RMN¹H permitió identificar a este como un compuesto del tipo de los triterpenos, pero debido a su bajo rendimiento no fue posible la determinación estructural.

De las fracciones 40 a 43 (3AH2C40) eluida con hexano/acetato de etilo 6.5:3.5 precipitó de hexano un sólido de color café, con punto de fusión: 193-194 °C. Sus estudios espectroscópicos permitieron identificar a esta sustancia como el ácido protocatechuico

De las fracciones 49-61 (3AH2C51) eluidas con hexano/acetato de etilo 4:6 y hasta la fracción 61 eluida con hexano/acetato de etilo 1:9, se obtuvieron cristales incoloros (49.8 mg) con punto de fusión 170-172 °C, los cuales fueron recristalizados con una mezcla de acetona/hexano 1:4. Por c.c.f. se observó como una sola mancha y su análisis espectroscópico permitió sugerir que se trata de un artefacto derivado del ácido shíquimico.

1.3.3. Extracto Metanólico

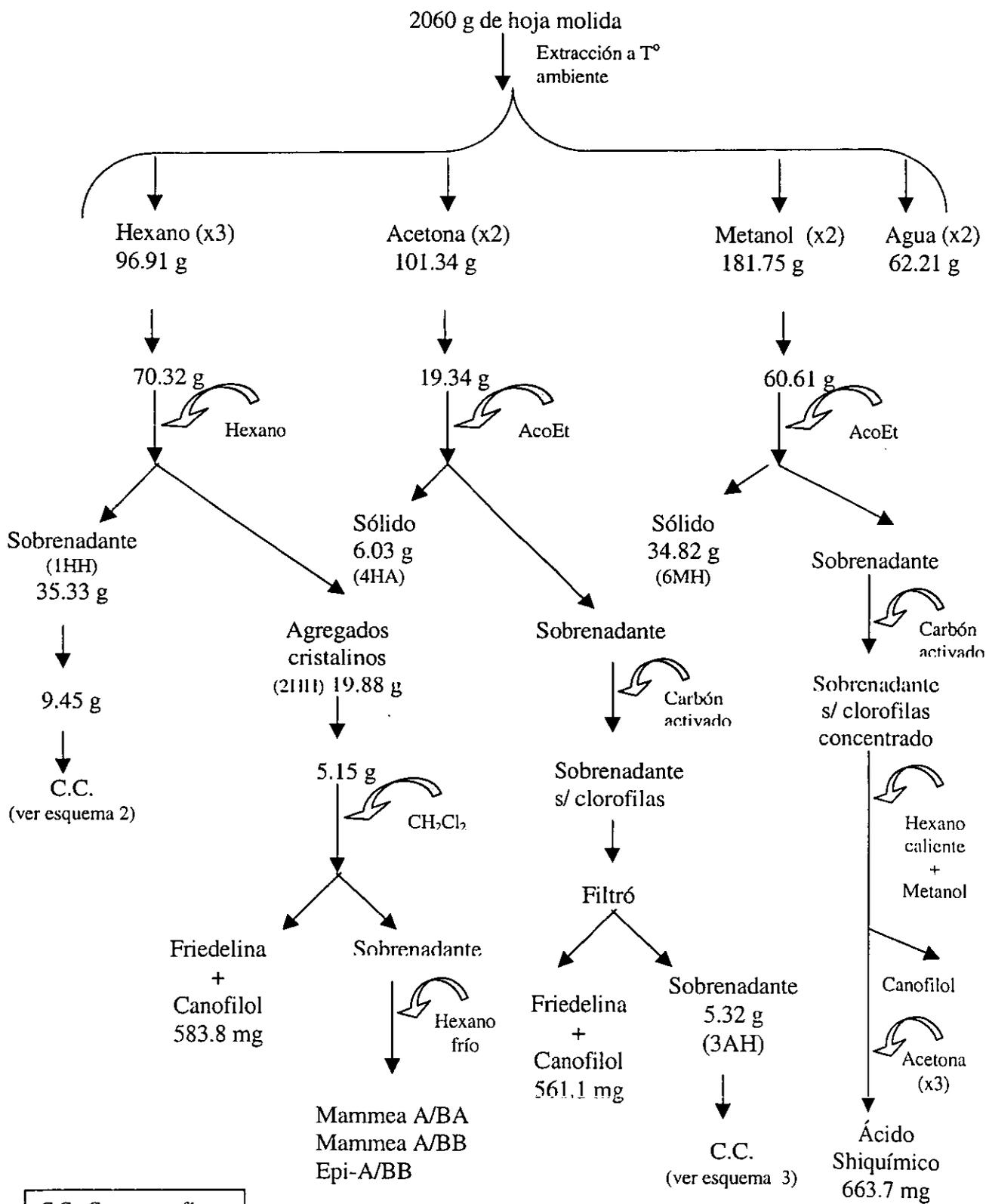
A partir de las dos extracciones realizadas con metanol se obtuvo un total de 181.74 g (Esquema 1). Una muestra (160.61 g), se maceró con 800 ml de acetato de etilo, obteniéndose un sólido insoluble de color café (34.82 g) (6MH) el cual se filtró al vacío. El sobrenadante se concentró al vacío (4.40 g) y posteriormente se disolvió en 800 ml de acetato de etilo, se le adicionaron 50 g de carbón activado, esta mezcla se colocó en una parrilla de calentamiento y después de 10 minutos contados a partir de la primera ebullición se retiró del fuego y se filtró al vacío empleando un embudo Buchner el cual contenía un

papel filtro y una capa de celita lavada.

El sobrenadante obtenido de esta forma se concentró al vacío, posteriormente se lavó con hexano caliente, la parte soluble en este se retiró con una pipeta pasteur. La parte insoluble se disolvió en metanol y se dejó evaporar a temperatura ambiente, durante este período de evaporación se observó la formación de unos cristales incoloros los cuales se filtraron al vacío y por c.c.f. fueron identificados como el triterpeno canofilol.

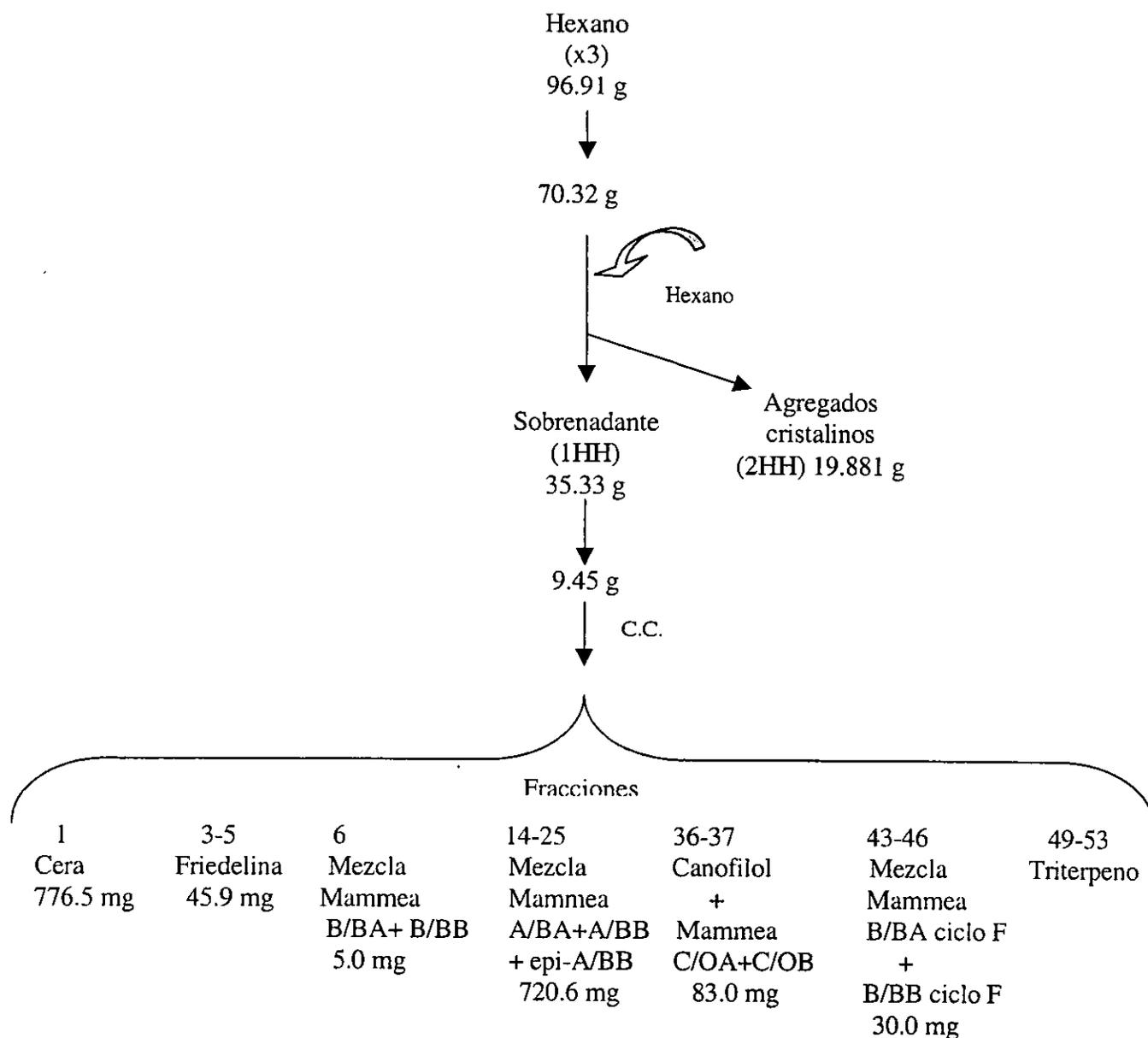
El sobrenadante se concentró y se disolvió en acetona y nuevamente se dejó evaporar a temperatura ambiente, durante este proceso se observó la precipitación espontánea de unos sólidos amorfos de color crema insolubles, insolubles en acetona. Esta sustancia (5MH1(2)p, 663.7 mg) fue soluble en metanol y agua, presentó un punto de fusión de 180-183 °C, por c.c.f. se observó como una sola mancha, y el análisis espectroscópico permitió identificar a esta sustancia como el ácido shiquímico, precursor de diversos metabolitos secundarios.

Esquema 1. Obtención de extractos de polaridad creciente de las hojas de *C. brasiliense*

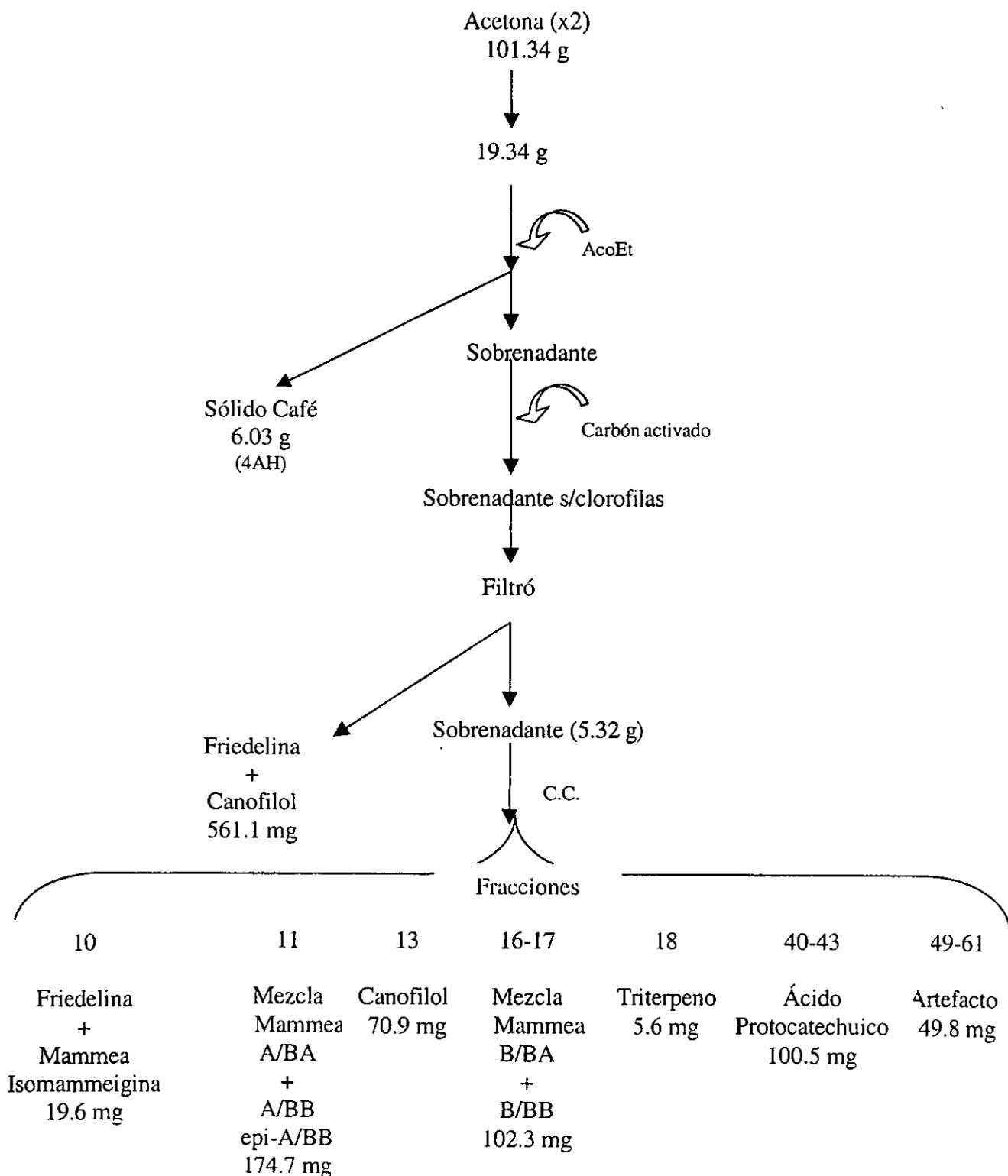


C.C.=Cromatografía en Columna

Esquema 2. Obtención de los compuestos del extracto de hexano de las hojas de *C. brasiliense*



Esquema 3. Obtención de los compuestos del extracto de acetona de las hojas de *C. brasiliense*



2. Actividad Biológica

2.1. Determinación de la actividad sobre la enzima transcriptasa reversa (RT)

Para la determinación de dicha actividad se empleó el ensayo de actividad Lenti-RT. Dicho ensayo es un método colorimétrico no radiactivo y se ha empleado para la búsqueda de compuestos inhibidores de la RT VIH-1. Este método consiste en determinar la incorporación de bromo-desoxiuridina (BrdUTP) a un molde de poliadenina (poli A) inmovilizado en microplacas de 96 pozos. La BrdUTP es reconocida posteriormente por un anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina. La adición del reactivo paranitrofenilfosfato ocasiona que la fosfatasa alcalina hidrolize el grupo fosfato a paranitrofenil. Esta reacción es colorida y puede registrarse en un Lector de ELISA a 405 nm.

Para la evaluación de la actividad sobre la RT se realizaron dos ensayos, las sustancias se probaron a tres concentraciones molares (2.5, 25.0 y 250 μM .) cuando se desconocía el peso molecular se emplearon las concentraciones: 1.11, 11.5, 111.5 $\mu\text{g/ml}$, como disolvente se empleó DMSO a una concentración máxima del 10% v/v. Como control positivo se usó nevirapine, inhibidor de la RT, bajo las mismas concentraciones de molaridad.

Para determinar las condiciones bajo las cuales la actividad de la RT eran optimas, se realizaron ensayos de prueba en los cuales se varió la temperatura y se observó que a temperatura ambiente (28 $^{\circ}\text{C}$) la reacción procedía lentamente, Mientras que a 33 $^{\circ}\text{C}$ es más rápida, alcanzando valores de absorbancia máximos de 2.5 a las 4 horas de haber agregado el paranitrofenil fosfato, no así a temperaturas inferiores. Por lo que se decidió que la temperatura optima era 33 $^{\circ}\text{C}$. Cabe señalar que aun variando la temperatura el control de nevirapine siempre inhibió la actividad de la RT en función de la dosis. Lo anterior fue un dato que permito determinar que la enzima se encontraba en optimas condiciones.

A continuación se describe brevemente en que consistió el protocolo para determinar actividad sobre la RT de los metabolitos de *C. brasiliense*

Este kit consiste de varios elementos:

2 Placas de Poli A

1 Frasco con: amortiguador de dilución (B)

2 Frasco con: componentes de reacción de la RT (C1)

1 Frasco con: amortiguador de reconstitución (C2)

1 Frasco con: Rtr-VIH estándar

2 Frasco con: amortiguador de lavado concentrado (E)

2 Frasco con: Anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (O)

1 Frasco con: tabletas del substrato de la FA (P1)

1 Frasco con: amortiguador del substrato de la FA (P2)

Piezas de plástico adhesivo.

1. Dilución del amortiguador de dilución.

- Adicionar 30 ml del frasco B en un vaso de precipitado y adicionar 30 ml de agua destilada.

2. Dilución de las sustancias.

- Las sustancias se evaluaron en 3 concentraciones molares (2.5, 25.0 y 250 μM .) cuando se desconocía el peso molecular se emplearon las concentraciones 1.11, 11.1, y 111.5 $\mu\text{g/ml}$. Cada sustancia se evaluó por triplicado y se realizó un

- segundo ensayo solo en aquellas sustancias que mostraron algún grado de actividad sobre la RT
- Adicionar 135 μ l de la solución diluida B en cada pozo de las dos placas de preparación de muestras (cada placa contiene 96 pozos).
 - Adicionar 15 μ l de la sustancia por analizar en el pozo A1.
 - Adicionar 15 μ l de la segunda sustancia por ser analizada en el pozo A2 y así continuar con las demás sustancias hasta completar A12.
 - Transferir 15 μ l desde los pozos A1-A12 a los correspondientes pozos de la fila B.
 - Transferir 15 μ l desde los pozos B1-B12 a los correspondientes pozos de la fila C y así continuar hasta la fila G (Esto se realiza en ambas placas).
 - La fila H se usa para referencias y controles.
3. Preparación de la mezcla de reacción.
 - Adicionar 2 ml de amortiguador de reconstitución (C2) al frasco que contiene la componentes de reacción de la TR (C1).
 4. Preparación de las placas de poli A con las muestras.
 - Tomar las dos placas y adicionar 100 μ l de la mezcla de reacción que se preparó en el 3er. punto.
 - Transferir 50 μ l de cada pozo de las placas de preparación de muestras.
 - Cubrir las placas con el plástico adhesivo e incubar por 30 minutos a 33 °C.
 5. Dilución de la rTR-VIH estándar (D).
 - Adicionar 1.5 ml del amortiguador de dilución preparado en el punto 1 al frasco que contiene el liofilizado la rTR-VIH estándar (D) mezclar vigorosamente.
 - Tomar un vaso de precipitado y etiquetarlo con el número 2, adicionar 12 ml del amortiguador de dilución preparado en el punto 1 y verter 1 ml de la rTR-VIH estándar diluida, mezclar vigorosamente.
 6. Inicio de la reacción de la TR.
 - Tomar las placas de poli A de la incubadora y adicionar 50 μ l de la enzima estándar en todos los pozos excepto H8-H12.
 - Adicionar 50 μ l del amortiguador de dilución en los pozos de H8-H12.
 - Sellar las placas con el plástico adhesivo e incubar durante 3 hrs. a 33 °C con agitación constante.
 7. Preparación de la solución de lavado.
 - Adicionar 150 μ l de tritón X-100 en un litro de agua destilada y agitar por 10 minutos.
 - Tomar del Kit el amortiguador de lavado concentrado (E) y adicionar 50 ml a un contenedor de 20 litros.
 - Adicionar el tritón X-100 disuelto al contenedor y ajustar el volumen a 20 litros con agua destilada y mezclar vigorosamente.
 8. Fin de la reacción de TR.
 - Tomar las placas de poli A de la incubadora y lavarlas 4 veces. Eliminar el exceso de agua colocándolas hacia abajo sobre un papel absorbente.
 9. Reconstitución del anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina.

- Tomar los dos frascos de que contienen el anticuerpo (O) y adicionar 12 ml de agua destilada conteniendo 1 % v/v de tritón X-100 a cada una, mezclar vigorosamente en un vortex durante 10 a 15 minutos.
 - Tomar las placas recién lavadas y adicionar 100 μ l a cada pozo de ambas placas de poli A, posteriormente cubrirlas con el plástico adhesivo e incubarlas durante 90 minutos a 33 °C y con agitación constante.
10. Preparación del sustrato de la fosfatasa alcalina (FA).
- Adicionar las tabletas de FA (P1) al amortiguador (P2) agitar aproximadamente por 20 minutos, mantener en oscuridad y a temperatura ambiente.
11. Eliminar el exceso de anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina.
- Después de 90 minutos de incubación remover de las placas de poli A los excesos de anticuerpo lavando 20 veces. Eliminar el exceso de agua colocándolas hacia abajo sobre un papel absorbente.
12. Inicio de la reacción de la fosfatasa alcalina.
- Adicionar 200 μ l de la sustancia preparada en el punto 10 a cada uno de los pozos de ambas placas de poli A.
 - Cubrir las placas con el plástico adhesivo e incubar a temperatura ambiente y en oscuridad y con agitación constante.
13. Lectura de las placas (Para tal fin emplear un lector de placas).
- Leer la absorbancia de ambas placas después de 30 minutos de incubación. Repetir la lectura en intervalos de tiempo hasta que la lectura de los pozos H1-H7 den valores de aproximadamente el 75 % del valor máximo de actividad.
14. Procesar datos.

2.2. Determinación de la citotoxicidad y la concentración media inhibitoria (IC₅₀)

Inicialmente se realizó un tamizaje de las sustancias aisladas a una concentración de 31 μ M ó 20 μ g/ml cuando se desconocía el peso molecular, y se determinó el % de inhibición de crecimiento celular. Posteriormente se determinó la IC₅₀ solo en aquellas sustancias que mostraron una inhibición del crecimiento celular superior al 60%. Como controles positivos se emplearon 5-Fluororacilo y adriamicina. Todos los compuestos fueron disueltos en DMSO, a una concentración máxima del 0.5% v/v. Las pruebas se realizaron en 5 líneas celulares: Carcinoma epidermoide de laringe humano, HEP-2 (ATCC CCL 23), carcinoma de cervix humano, HeLa (ATCC CCL2), Carcinoma del sistema nervioso central U251, Carcinoma de Próstata PC-3 y el linfoma K562.

Este ensayo se llevó a cabo mediante el método de la sulforrodamina B en placas de 96 pozos para determinar la viabilidad celular el cual es un ensayo colorimétrico que se lee en un lector de Elisa a 515 nm (Esquema 4).

Día 1.

- Se toman las placas de crecimiento celular en el cual se observe una confluencia de 70 a 80 %
- Se cuentan las células para obtener una solución de 5×10^4 células/ml.
- Se inoculan dos placas con 100 μ l de la solución anterior de células (5×10^3 células/ml).
- Se incuban 37 °C en 4.5 % de CO₂.

Día 2.

- A las 24 hrs. se añaden 100 µl de medio a la placa denominada placa cero y después se fijan con 50 µl de una solución de TCA (ácido tricloroacético) al 50% durante 1 hr. a 4 °C. Transcurrida la hora se lava con agua corriente de la llave 5 veces, se deja secar a temperatura ambiente y se guarda en refrigeración.
- En la(s) placa experimental se añaden 100 µl de la(s) dilución de la(s) sustancia a probar y se incuban durante 48 hrs.

Día 4.

- La placa experimental se fija con 50 µl de una solución TCA al 50% y procede igual que en la placa cero.

Día 5.

- Las placas (cero y experimental) se tiñen con 100 µl de una solución de sulforrodamina B al 0.4% en ácido acético al 1% durante 30 min.
- Se lavan con una solución al 1% de ácido acético 5 veces y se dejan secar a temperatura ambiente.

Día 6.

- Se adicionan 100 µl de TRIS base (pH 10) y se agita.
- Se mide la densidad óptica a 515 nm en un lector de placas.
- Y con los datos de densidad óptica se calcula % de inhibición y/o IC₅₀ con respecto al control.

Para determinar el % de inhibición se aplican las siguientes formulas según sea el caso. En los casos que se determinó el valor de IC₅₀, los datos obtenidos se sometieron a una regresión lineal para obtener dicho resultado.

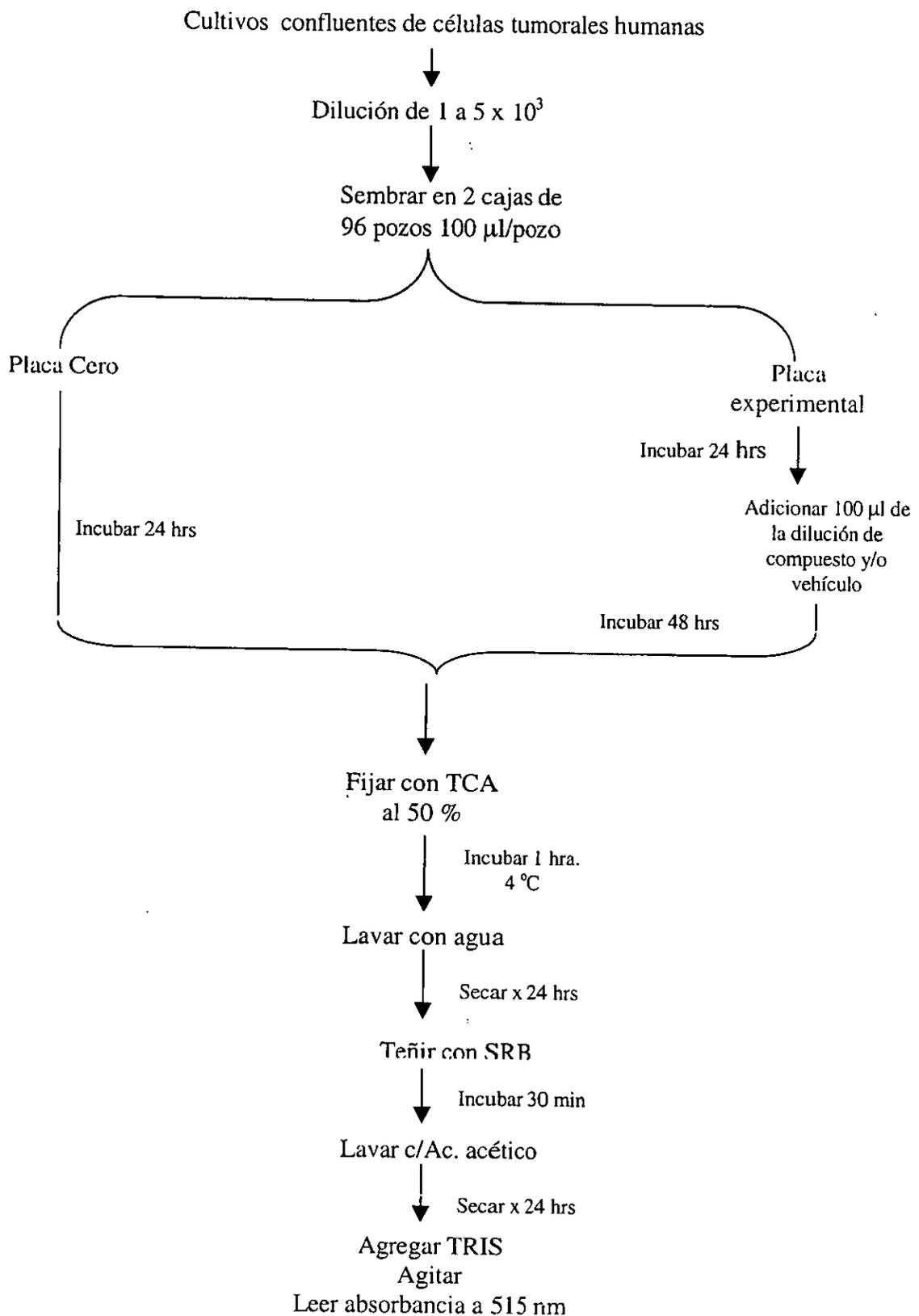
$$\begin{aligned} & 100 \times [(T - T_o) / (C - T_o)] \quad \text{cuando } T \text{ es igual o } > \text{ a } T_o \\ \text{ó} & 100 \times [(T - T_o) / T_o] \quad \text{cuando } T \text{ es } < \text{ a } T_o \end{aligned}$$

C = Densidad óptica del control

T = Densidad óptica del tratamiento

T_o = Densidad óptica de la placa cero.

Esquema 4. Prueba de actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales humanas.



2.2. Determinación de la actividad antimicrobiana

Para este ensayo se siguió el método de sensidisco propuesto por Bauer *et al.*, (1966) y modificado por Cáceres *et al.*, (1990). Las tres cepas que se emplearon durante el primer ensayo (grupo 1) fueron amablemente donadas por el laboratorio de Fitoquímica de la UBIPRO de la facultad de Iztacala. Y las once cepas evaluadas en el segundo ensayo (grupo 2) forman parte del cepario del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Grupo 1

Staphylococcus aureus

Bacillus subtilis

Staphylococcus epidermidis

Grupo 2

Escheriquia coli enteropatógena (EPEC) (029358)

E. coli enteropatógena (ETEC) (050933)

E. coli enteroinvasiva (EIEC) (28918)

E. coli (ATCC 25922) (093258)

E. coli agregativa (AGG) (049766)

Salmonella typhi (aislamiento clínico RRE) (095426)

Salmonella typhi (ATCC 6539) (95073)

Salmonella typhimurium (074289)

Shigella dysenteriae (Dys 3)

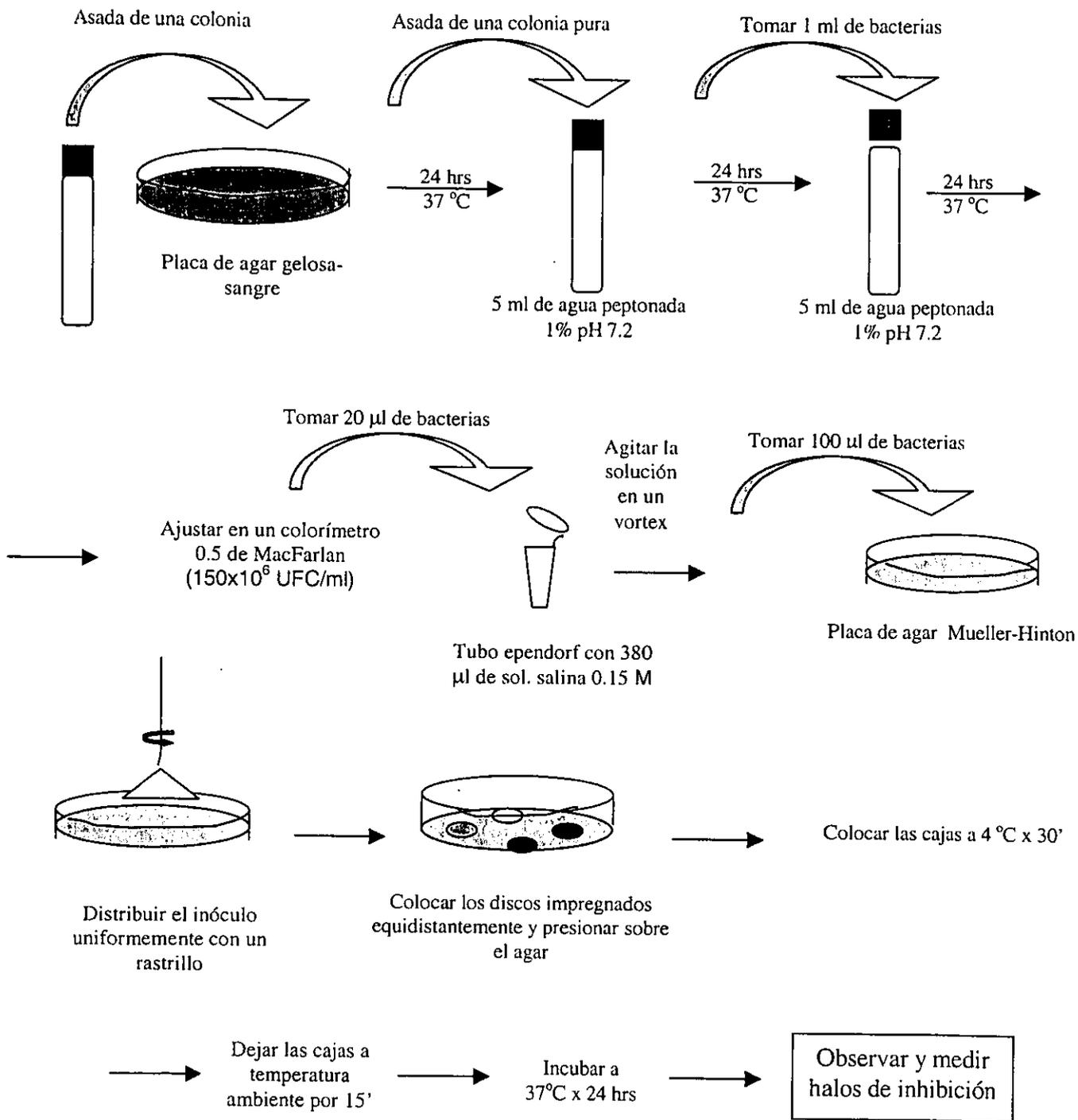
Staphylococcus aureus

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) (095081)

Cada sustancia se probó contra las bacterias arriba mencionadas empleando discos de papel filtro Whatman No. 3 de 6.0 mm de diámetro, los cuales se marcaron e impregnaron 500 µg/disco. Como controles positivos se emplearon: Cloranfenicol (0.25 µg/disco), estreptomocina y ampicilina (10.0 µg/disco). Como disolventes se emplearon agua estéril, y acetona.

Los discos impregnados y secados en condiciones de esterilidad en una campana de cultivo, se colocaron en cajas con agar Muller-Hinton de 4 mm de espesor, previamente inoculadas. El método para inocular las placas es: de un cultivo puro de cada una de las bacterias arriba citadas se inocula un tubo de 5 ml con agua peptonada al 1% y se incuba a 37 °C durante 24 horas, de este cultivo se toma una alícuota de 1 ml y se inocula en otro tubo con 10 ml de agua peptonada al 1% el cual también se incuba durante 3 horas a 37 °C en agitación constante, pasado este período el cultivo se ajusta en un nefelómetro al valor 0.5 de MacFarland para obtener una concentración de 150×10^6 , a partir de esta concentración se realiza una dilución 1/20 en solución salina. A partir de esta solución se toman 100 µl que se inoculan en las cajas con agar Muller-Hinton gelificado, haciendo un estriado cerrado con un rastrillo, para obtener un crecimiento bacteriano homogéneo en toda la caja. Finalmente se colocan los discos sobre la superficie de la placa de agar de manera equidistante. Posteriormente las cajas se incuban a 4°C durante 30 minutos, después se sacan de la estufa y se dejan a temperatura ambiente durante 15 minutos más, para finalmente incubarse a 37 °C durante 24 horas, pasado este período se revisan las cajas y se miden los halos de crecimiento (Esquema 5).

Esquema 5. Prueba de actividad antimicrobiana.



V. RESULTADOS

1. Estudio fitoquímico de las hojas de *Calophyllum brasiliense*

1.1. Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos (en peso seco de las hojas) obtenidos con hexano, acetona, metanol y agua se muestran en la tabla 3. El extracto que mostró un mayor rendimiento fue el de metanol (8.82%). A este le siguieron los extractos de hexano y acetona con rendimiento de 4.70 y 4.92 % respectivamente y finalmente el extracto acuoso (3.35 %).

Tabla 3. Rendimiento de los extractos obtenidos de las hojas de *C. brasiliense*.

| Extracto | Gramos | % del peso seco |
|--------------|---------------|-----------------|
| Hexano | 96.91 | 4.70 |
| Acetona | 101.34 | 4.92 |
| Metanol | 181.74 | 8.82 |
| Agua | 69.21 | 3.36 |
| Total | 449.21 | 21.80 |

1.2. Composición química de las hojas

De los extractos analizados (hexano, acetona y metanol) se aislaron 14 compuestos (Tabla 4) a saber: 2 triterpenos, 9 coumarinas, 2 derivados del ácido shiquímico así como un compuesto el cual probablemente sea un artefacto producto del tratamiento del extracto de acetona con carbón activado.

Tabla 4. Compuestos aislados de las de las hojas de *C. brasiliense*

| Compuesto | Hexano | Acetona | Metanol |
|---|--------|---------|---------|
| Triterpenos | | | |
| Friedelina | + | + | - |
| Canofilol | + | + | + |
| Coumarinas | | | |
| Mezcla 1: Mammeas A/BA, A/BB y epi-A/BB | + | + | - |
| 2 : Mammeas B/BA y B/BB | + | - | - |
| 3 : Mammeas C/OA y C/OB | + | - | - |
| 4 : Mammeas B/BA ciclo F y B/BB ciclo F | + | + | - |
| Isomammeigina | - | + | - |
| Derivados del ácido shiquímico | | | |
| Ácido Protocatechuico | - | + | - |
| Acetonido 3,4 del Ác. Shiquímico | - | + | - |
| Ácido Shiquímico | - | - | + |

1.3. Compuestos obtenidos del extracto hexánico

El análisis cromatográfico del extracto de hexano proporcionó 11 compuestos (Figura 13) los cuales de acuerdo con sus datos espectroscópicos resultaron ser los triterpenos canofilol y friedelina, así como nueve coumarinas. Estas no se obtuvieron puras, sino en forma de 4 mezclas de isómeros: 1) Mammea A/BA, Mammea A/BB y epi A/BB; 2) Mammea B/BA y Mammea B/BB; 3) Mammea C/OA y Mammea C/OB; 4) Mammea B/BA ciclo F y Mammea B/BB ciclo F. Este extracto fue el más abundante y rico en compuestos, siendo sus constituyentes mayoritarios la mezcla 1 (Mammea A/BA, A/BB, epi A/BB) y los triterpenos canofilol y friedelina.

1.3.1. Friedelina y Canofilol

Del extracto hexánico al redisolverlo con hexano precipitó una mezcla de dos triterpenos, los cuales fueron aislados e identificados como friedelina y canofilol al comparar sus datos espectroscópicos y constantes físicas con muestras auténticas, así como por cromatografía en capa fina (idéntico Rf). Estos compuestos también se obtuvieron de otras fracciones cromatográficas.

1.3.2. Mezcla 1) Mammea A/BA, A/BB, epi A/BB

El precipitado así como las fracciones cromatográficas (inciso 1.3.1) obtenidas del extracto de hexano, presentaron una mezcla inseparable de 3 coumarinas, las cuales en ccf aparecen como una sola mancha. Sin embargo, el análisis espectroscópico (RMN¹H, EM e IR) reveló que en realidad se trataba de una mezcla de compuestos del tipo de las coumarinas presentes en la especie *Mammea americana*, conocidas como: Mammea A/BA, Mammea A/BB y epi-Mammea A/BB (Crombie *et al.*, 1966, 1967, 1970, 1985). En el espectro de RMN¹H, se observó una señal simple en 6.0 ppm, característica para el protón H₃ del esqueleto de una coumarina. Dicho esqueleto debe estar substituido por un grupo fenilo en el carbono 4 ya que se observan dos señales múltiples en 7.56 y 7.42 ppm las cuales integran para 5 hidrógenos, también se observó una señal simple en 14.61 la cual sugiere la presencia de un OH quelatado. Una señal simple en 5.90 que desaparece al agregar D₂O indicó que se trataba de un hidroxilo posiblemente sobre el Carbono 5. El espectro de RMN¹H también indicó que este compuesto contiene dos substituyentes adicionales en el carbono 6 y 8 los cuales fueron por un lado un grupo 3,3-dimetilalil y un grupo 3-metilbutiril. En el primer caso se observaron señales características en 5.09 m (J=7 y 1.4 Hz, 1H), 3.29 d (J=7 Hz, 2H), 1.70 s (3H) y 1.65 d (J=14 Hz, 3H), para los protones H₁', H₁' y los metilos correspondientes. En el caso del grupo acilo (3-metilbutiril), éste fue indicado por la presencia de señales en 3.19 d (J=6.8 Hz, 1H), 2.32 m (J=6.6 Hz, 1H) y 1.06 d (J=6.7 Hz, 6H) para los protones H₂", H₃" y los metilos sobre el C₄".

Por otro lado, el espectro de RMN¹H mostró señales adicionales de menor intensidad que sugieren que además del compuesto Mammea A/BA se encuentra un compuesto en menor cantidad el cual es el isómero Mammea A/BB, así como su epímero-Mammea A/BB. La presencia del isómero Mammea A/BB se dedujo por las señales en 3.95 ppm (J=6.5, 1H), 1.29 d (J=6.7, 3H), 1.95 m (2H), 1.01 t (J=7.28, 3H) así como una señal

simple en 14.57 ppm que integra para un OH quelatado, dichas señales sugirieron la presencia de una coumarina con un grupo 2-metilbutiril en la posición 8.

La presencia del compuesto epi-A/BB se dedujo de otro grupo de señales de mucho menor intensidad que las previamente mencionadas en 4.11 m (J=6.7, 1H), 1.30 dd (J=6.7, 3H), 1.59 m (2H), 1.01 t (J=7.28, 3H) las cuales fueron asignadas a una coumarina con un grupo 2-metilbutiril, así como una pequeña señal simple en 14.50. Las pequeñas diferencias en desplazamiento químico sugieren que epi-A/BB es el epímero del compuesto **Mammea A/BB**. Dicha mezcla de compuestos isómericos (**Mammea A/BA** y **A/BB**), presentó en el espectro de MASAS, el ión molecular en 406 congruente para la fórmula mínima C₂₅H₂₆O₅ y el pico base en m/z 293.

Datos de RMN¹H de la mezcla 1: Mammea A/BA y A/BB(200 MHz, CDCL₃)

| Protón | d (ppm) | Multiplicidad | J (Hz) | No. de H | |
|-----------------------------|---------------------|---------------|---------------|----------|----|
| H ₃ | 6.0 | s | | 1H | |
| Arom. | 7.85 | m | | 3H | |
| Arom. | 7.56 | m | | 2H | |
| OH 5 | 14.61 | s | | 1H | |
| OH 7 | 5.9 | s | | 1H | |
| CH ₂ -isoprenilo | 3.30 | d | 7.0 | 2H | |
| CH-isoprenilo | 5.09 | tm | 7.02 | 1H | |
| CH ₃ -isoprenilo | 1.65 | s | | 3H | |
| CH ₃ -isoprenilo | 1.70 | s | | 3H | |
| Subst. acilo | Protón | d (ppm) | Multiplicidad | J | H |
| A/BA | CH ₂ | 3.19 | d | 6.4 | 2H |
| | CH | 2.32 | m | 6.0 | 1H |
| | 2(CH ₃) | 1.06 | d | 6.7 | 6H |
| A/BB | CH | 3.95 | m | 6.5 | 1H |
| | CH ₂ | 1.95 | m | - | 2H |
| | CH ₃ | 1.01 | t | 7.2 | 3H |
| | CH ₃ | 1.29 | d | 6.7 | 3H |

IR ν max (KBr):3985(OH); 2964, 2932, 2872(C-H alifático); 1729(C=O); 1724(C=O); 1614(C=C); 1556(C=C); 1390(C-O).

EMIE: 70(w) m/z (%): 406 M+ (96.4%)[C₂₅H₂₆O₅]+; 363(55.6%); 351(76.0%); 293(100%).

1.3.3. Mezcla 2) Mammea B/BA y B/BB

El espectro de RMN¹H de la fracción 6 obtenida de la columna del extracto de hexano revelo de igual forma que se trata de una mezcla de los compuestos **Mammea B/BA** y **B/BB** previamente reportadas de *Mammea americana* (Crombie *et al.*, 1967, 1970, 1972, 1985; Finnegan *et al.*, 1965) y *M. africana* (Carpenter *et al.*, 1970) El espectro de RMN¹H fue similar al anteriormente descrito para la mezcla 1 de coumarinas **Mammea A/BA**, **A/BB** y epi **A/BB**, pero a diferencia de este, se observó: una señal triple en 2.93 ppm (J=7.5 Hz) la cual integra para dos hidrógenos, una señal múltiple en 1.38 ppm (J=3.5 Hz, 2H) y una señal triple en 0.91 ppm (J=6.4 Hz, 3H), las cuales indican la presencia de un grupo propilo. La

ausencia de las dos señales múltiples en 7.56 y 7.42 ppm indican que en la posición 4 se encuentra un sustituyente propilo en vez de un grupo fenilo.

Por otro lado, el espectro de RMN¹H mostró al igual que en el compuesto anterior señales de menor intensidad que sugieren que además del compuesto B/BA, se encuentra en menor cantidad el isómero Mammea B/BB, el cual presenta un sustituyente 2-metilbutiril sobre el carbono 8. A continuación se señalan los datos de RMN¹H que permitieron identificar dicha mezcla.

Datos de RMN¹H de la mezcla 2: Mameas B/BA y B/BB (200 MHz, CDCl₃)

| Protón | d | Multiplicidad | J | H | |
|-----------------------------|---------------------|---------------|---------------|-----|----|
| H ₃ | 6.0 | s | | 1H | |
| CH ₂ -propilo | 2.93 | t | 7.5 | 2H | |
| CH ₂ -propilo | 1.38 | m | 3.5 | 2H | |
| CH ₃ -propilo | 0.91 | t | 6.4 | 3H | |
| OH | 14.61 | s | | 1H | |
| OH | 6.86 | s | | 1H | |
| CH ₂ -isoprenilo | 3.49 | d | 7.2 | 2H | |
| CH-isoprenilo | 5.24 | t | 7.2 | 1H | |
| CH ₃ -isoprenilo | 1.82 | s | | 3H | |
| CH ₃ -isoprenilo | 1.87 | s | | 3H | |
| Subst. acilo | Protón | d(ppm) | Multiplicidad | J | H |
| B/BA | CH ₂ | 3.16 | d | 6.7 | 2H |
| | CH | 2.27 | m | 6.6 | 1H |
| | 2(CH ₃) | 1.03 | d | 6.7 | 6H |
| B/BB | CH | 3.93 | m | 6.6 | 1H |
| | CH ₂ | 1.93 y 1.63 | m | - | 2H |
| | CH ₃ | 1.25 | d | 6.6 | 3H |
| | CH ₃ | 0.97 | t | 6.4 | 3H |

IR v max (KBr): 3325(OH); 2960, 2931, 2858(C-H alifático); 1722(C=O); 1602(C=C); 1560(C=C); 1462(C=C); 1329(C-O); 1116 (C-O).

1.3.4. Mezcla 3) Mammea C/OA y C/OB

Los estudios espectroscópicos de los cristales opacos aislados de las fracciones 36 y 37 de la columna de hexano revelaron que se trataba de una mezcla de coumarinas: Mammea C/OA y C/OB. El espectro de RMN¹H mostró señales similares para el H₃, el OH sobre el carbono 5 y para el OH sobre el carbono 7, así como para el grupo 3-metilbutiril en posición 8, todas ellas ya descritas para el compuesto Mammea A/BA, pero a diferencia de este, se observó la ausencia de las señales para el grupo isoprenilo y para el grupo fenilo, apareciendo nuevas señales: una señal simple en 6.25 asignado a un protón aromático, el cual fue asignado al hidrógeno sobre el carbono 6, adicionalmente también se observaron señales en: 2.95 ppm (t, J=7.5 Hz), 1.64, 1.37 y 0.90 (t, J=6.8 Hz), las cuales indican la presencia de un grupo pentilo el cual debe localizarse sobre el carbono 4.

Adicionalmente, el espectro de RMN¹H mostró señales de menor intensidad para un grupo 2-metilbutiril que sugieren que además del compuesto C/OA, se encuentra el isómero: Mammea C/OB.

Dicha mezcla de isómeros (**Mammea C/OA** y **Mammea C/OB**) presentó en el espectro de Masas el ión molecular en 332 congruente para la fórmula mínima $C_{19}H_{24}O_5$ y el pico base en m/z 275. Estas sustancias han sido previamente aisladas de la especie *Mammea africana* (Carpenter *et al.*, 1970). A continuación se señalan los datos de RMN^1H de la mezcla **Mammea C/OA** y **Mammea C/OB**.

Datos de RMN^1H de la mezcla 3: Mammeas C/OA y C/OB (200 MHz, $CDCl_3$)

| Protón | d(ppm) | Multiplicidad | J | H | |
|------------------------------|---------------------|---------------|---------------|-----|----|
| H ₃ | 6.04 | s | | 1H | |
| CH ₂ -pentilo (1) | 2.95 | t | 7.5 | 2H | |
| CH ₂ -pentilo (2) | 1.64 | m | | 2H | |
| CH ₂ -pentilo (2) | 1.37 | m | | 2H | |
| CH ₃ -pentilo | 0.90 | t | 6.8 | 3H | |
| OH 5 | 14.16 | s | | 1H | |
| OH 7 | 7.10 | s | | 1H | |
| H ₆ | 6.25 | s | | 1H | |
| Subst. acilo | Protón | d(ppm) | Multiplicidad | J | H |
| C/OA | CH ₂ | 3.14 | d | 6.6 | 2H |
| | CH | 2.26 | m | 6.6 | 1H |
| | 2(CH ₃) | 1.01 | d | 6.6 | 6H |
| C/OB | CH | 3.90 | m | 6.6 | 1H |
| | CH ₂ | 1.88 | m | 6.8 | 2H |
| | CH ₃ | 1.24 | d | 6.6 | 3H |
| | CH ₃ | 0.94 | t | 5.9 | 3H |

Punto de fusión de 180-182 °C.

IR v max (KBr): 3164(O); 2961, 2932, 2872(C-H alifático); 1726(C=O); 1622(C=C); 1595(C=C); 1390(C-O); 1270(C-O); 1117(C-O).

EMIE: 70(w) m/z (%): 332M+ (36.6%) [$C_{19}H_{24}O_5$]+, 317(21.10%) [M+CH₃], 299 (7.0%) [M+CH₃-H₂O], 276(66.1%) [M+C₄H₈], 275(100%) [M+C₄H₉], 234(13.3%), 219(12.69%).

1.3.5. Mezcla 4) **Mammea B/BA** ciclo F y **B/BB** ciclo F

El análisis de RMN^1H de los cristales obtenidos en las fracciones 43 a 46 del extracto de hexano, mostró similitudes con el espectro de la mezcla de **Mammea B/BA** y **B/BB** pero a diferencia de este, se observó una señal triple en 4.85 ppm ($J=9$ Hz), una señal doble en 3.08 ppm ($J=6.7$ Hz) y tres señales simples en 2.0, 1.41 y 1.28 ppm, las cuales fueron asignadas a protones de un anillo 2-(1-hidroxi-1-metiletil)dihidrofurano, el cual se encuentra en posición 5 y 6. Por lo que se dedujo que se trata del compuesto **Mammea B/BA** ciclo F que al igual que en los casos anteriores ya ha sido previamente reportado para el género *Mammea* (Crombie *et al.*, 1972, 1985) Adicionalmente, el espectro de RMN^1H también mostró señales de menor intensidad que sugieren que además del compuesto **B/BA** ciclo F, se encuentran el isómero: **Mammea B/BB** ciclo F. Dicha mezcla isomérica (**Mammeas B/BA** ciclo F y **Mammea B/BB** ciclo F) presentó en el espectro de masas el ión molecular en 388 congruente para la fórmula mínima $C_{22}H_{28}O_6$ y el pico base en m/z 331. A continuación se señalan los datos de RMN^1H de la mezcla de **Mammea A/BA** ciclo F y **A/BB** ciclo F

Datos de RMN¹H de la mezcla 4: Mammea B/BA ciclo F y B/BB ciclo F
(200 MHz, CDCl₃)

| Protón | d(ppm) | Multiplicidad | J | H | |
|--------------------------|---------------------|---------------|---------------|-----|----|
| H ₃ | 5.95 | s | - | 1H | |
| CH ₂ -propilo | 2.82 | m | 7.2 | 2H | |
| CH ₂ -propilo | 1.64 | m | 7.4 | 2H | |
| CH ₃ -propilo | 1.03 | t | 6.4 | 3H | |
| OH 5 | 14.18 | s | - | 1H | |
| OH ciclo F | 2.00 | s.ancho | - | 1H | |
| CH-ciclo F | 4.85 | t | 9.0 | 2H | |
| CH ₂ -ciclo F | 3.08 | d | 6.7 | 2H | |
| CH ₃ -ciclo F | 1.41 | s | - | 3H | |
| CH ₃ -ciclo F | 1.28 | s | - | 3H | |
| Subst. acilo | Protón | d(ppm) | Multiplicidad | J | H |
| B/BA ciclo | CH ₂ | 3.17 | dd | - | 2H |
| F | CH | 2.24 | m | 6.6 | 1H |
| | 2(CH ₃) | 1.03 | d | - | 6H |
| B/BB ciclo | CH | 3.85 | m | 6.6 | 1H |
| F | CH ₂ | 1.92 y 1.5 | m | - | 2H |
| | CH ₃ | 1.23 | d | 8 | 3H |
| | CH ₃ | 0.99 | t | 5.6 | 3H |

IR v max (KBr): 2964(C-H alifático); 1728(C=O); 1631(C=C); 1606(C=C); 1429(C=C); 1393(C-O); 1300(C-O); 1150(C-O); 1121(C-O).

EMIE: 70(w) m/z (%): 388 M+ (54.9%) [C₂₂H₂₈O₆]⁺; 373(14.0%)[M+CH₃]; 355(11.2%); 332(22.5%); 331(100%)[M+⁻]; 301(7.0%); 287(4.9%); 259(14.7%).

1.4. Compuestos obtenidos del extracto acetónico

La separación cromatográfica del extracto de acetona proporcionó 10 compuestos (Figura 13) los cuales de acuerdo a sus características física y datos espectroscópicos fueron identificados como los triterpenos: canofilol y friedelina así como seis coumarinas las cuales se obtuvieron como mezclas de isómeros (mezcla 1: Mammea A/BA, Mammea A/BB y epi A/BB; mezcla 4: Mammea B/BA ciclo F y Mammea B/BB ciclo F) excepto la coumarina Isomammeigina (Mammea A/BA ciclo D) la cual se obtuvo pura, así como el ácido protocatechuico y un artefacto probablemente producido durante el tratamiento que se dio a este extracto (Inciso 1.3.2).

Las características físicas así como los análisis espectroscópicos de IR, UV y RMN¹H de la mayoría de los compuestos aislados son similares a los previamente indicados en el punto anterior, excepto para los compuestos: Isomammeigina, ácido protocatechuico y el artefacto.

Por lo tanto a continuación se señalan los datos espectroscópicos que permitieron la identificación de dichas sustancias.

1.4.1. Isomammeigina (A/BA ciclo D).

El espectro de RMN¹H del precipitado la fracción 10 del extracto de acetona fue similar al del compuesto Mammea A/BA, pero a diferencia de este, mostró dos señales dobles en 5.38 ppm (J=10 Hz) y 6.62 ppm (J=10 Hz), las cuales fueron asignadas a dos protones vinílicos los cuales forman un anillo de cromeno con lo cual se pudo concluir que esta substancia es la **Isomammeigina (A/BA ciclo D)** previamente aislada del genero *Kilmeyera pumila* (Castellano *et al.*, 1988; Nagem *et al.*, 1988). Dichos estudios fueron confirmados por el análisis de difracción de rayos X (Figura 11).

Datos de RMN¹H de la Isomammeigina (Mammea A/BA ciclo D) (200 MHz, CDCL₃)

| Protón | d (ppm) | Multiplicidad | J (Hz) | No. de H | |
|-----------------------------|---------------------------------|---------------|---------------|----------|----|
| H ₃ | 6.0 | s | | 1H | |
| Arom | 7.39 | m | | 3H | |
| Arom. | 7.23 | m | | 2H | |
| OH 7 | 14.78 | s | | 1H | |
| CH-cromeno (3) | 5.38 | d | 10 | 1H | |
| CH-cromeno (4) | 6.62 | d | 10 | 1H | |
| 2(CH ₃)-cromeno | 0.95 | s | | 6H | |
| Subst. acilo | Protón | d (ppm) | Multiplicidad | J | H |
| | CH ₂ | 3.19 | d | 6.7 | 2H |
| | CH | 2.32 | sept | 6.7 | 1H |
| | (CH ₃) ₂ | 1.06 | d | 6.7 | 6H |

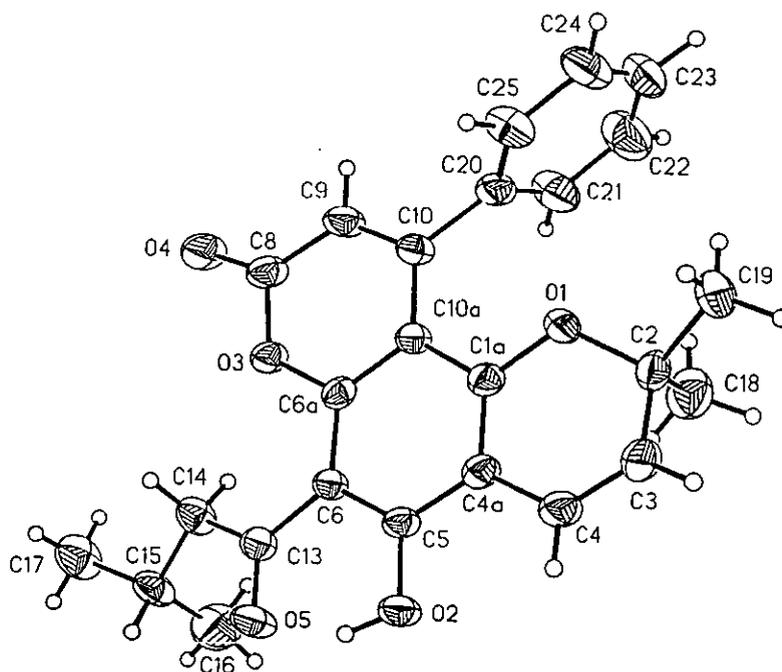


Figura 11. Esterodiagrama por difracción de Rayos X de la isomammeigina.

1.4.2. Ácido Protocatechuico

De acuerdo a las características físicas y datos espectroscópicos del precipitado de la fracción 40-43 del extracto de acetona permitieron identificar a esta sustancia como el ácido protocatechuico el cual es un intermediario en la vía del ácido shíquímico. A continuación se señalan los datos de RMN¹H que permitieron su elucidación estructural

C₇H₆O₄, sólido café, p.f. 192-194 °C.

RMN¹H(300 MHz, Acetona D6/TMS): 9.00(1H, s. ancho, COOH), 7.52(1H, d, J=2, H2), 6.88(1H, d, J=8, H5), 7.46(1H, dd, J=2,1 y 8.4, H6), 9.00(1H, s. ancho, OH), 9.00(1H, s. ancho, OH).

IR v max (KBr): 3309 ancha (COOH); 1674 (C=O); 1602 (C=C); 1525 (C=C); 1455 (C=C); 1294 (C-C); 1294 (C-O); 1243 (C-O); 767 (Ar).

EMIE: 70(w) m/z (%): 154 M+ (93.6%) [C₇H₆O₄]; 137 (100%) [M+-OH]; 119(2.12%); 109 (23.4%)[M+-COOH]; 91 (2.83%); 81(8.15%); 63(7.8%).

1.4.3. Artefacto: Acetónido 3-4 del ácido shíquímico

Los datos espectroscópicos así como el análisis de Rayos X (Figura 12) de la fracción 49-61 obtenida mediante el tratamiento con carbón activado del extracto de acetona, permitieron identificar a esta sustancia como el: Acetónido 3-4 del ácido shíquímico. Dicho compuesto probablemente es un artefacto el cual se originó al tratar el ác. Shíquímico con acetona y sílice. A continuación se anotan los datos espectroscópicos que permitieron su elucidación estructural así como el análisis de rayos x que permitieron confirmar su estructura.

C₁₀H₁₄O₅, cristales incoloros, p.f. 170-172 °C.

RMN¹H (500 MHz, Acetona D6/TMS): 6.79 (1H, ddd, J=3.3, 1.7, 1.7), 2.55 (1H, ddt, J=15.0 3.0, 3.5), 2.28 (1H, ddt, J=15.0, 6.0, 1.5), 3.95 (1H, td, J=6.0, 4.5); 4.13 (1H, t; J=6) 4.73 (1H, m, J=4.7, 1.5), 1.32 (1H, s), 1.32 (1H, s)

RMN¹³C (500 MHz, Acetona D6): δ:135.3 (C1), 130.5 (C2), 30 (C3), 68.2 (C4), 77.9 (C5), 72.9 (C6), 109.6 (C7), 26.1 (C8), 28.2 (C9), 167.8 (C10).

IR v max (KBr): 3339 (OH); 2591-2598 (COH); 1701 (C=O); 1644 (C=C); 1276 (C-O).

EMIE: 70(w) m/z (%): 214 M+ (0.05%) [C₁₀H₁₄O₅]; 199 (100%) [M+-CH₃]; 139 (51.77 %) (M+-COO(CH₃)₂)

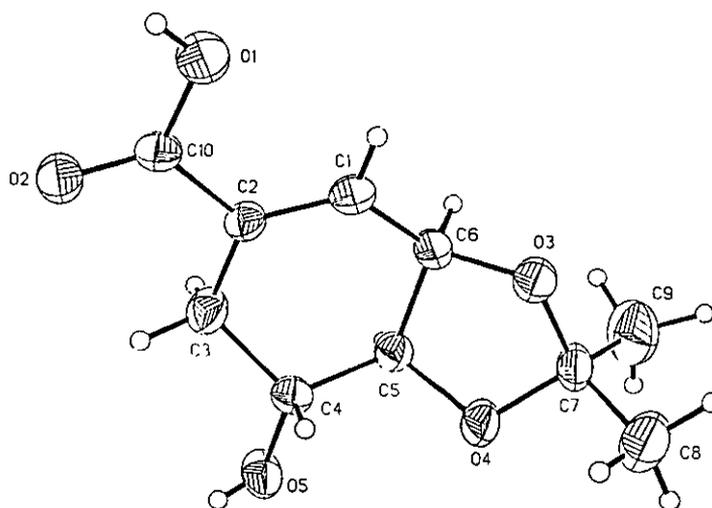


Figura 12. Esterodiagrama por difracción de Rayos X del acetónido 3-4 del ácido shiquímico.

1.5. Compuestos obtenidos del extracto metanólico

El extracto metanólico después de haber sido sometido al tratamiento con carbón activado, proporcionó 2 compuestos, los cuales de acuerdo a sus características físicas y datos espectroscópicos fueron identificados como: Canofilol y ácido shiquímico. El ácido shiquímico, se ha aislado de diversos géneros de plantas y microorganismos y ha sido ampliamente identificado, estableciéndose que es un intermediario clave en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, así como de diversos grupos de metabolitos secundarios (Herbert, *et al*, 1989). El extracto acuoso no fue analizado químicamente.

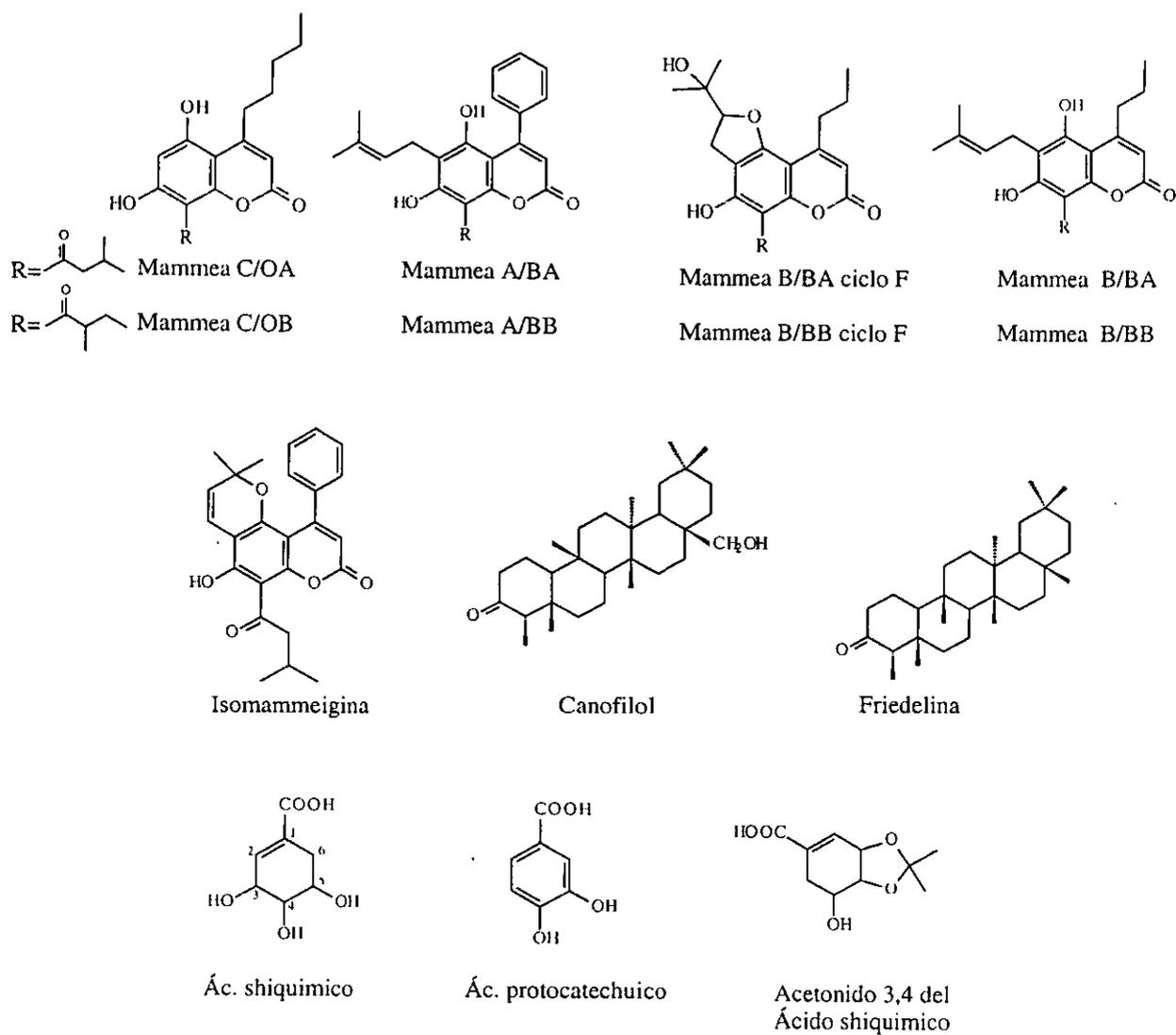


Figura 13. Coumarinas, Triterpenos y Ácidos aislados de las hojas de *C. brasiliense*

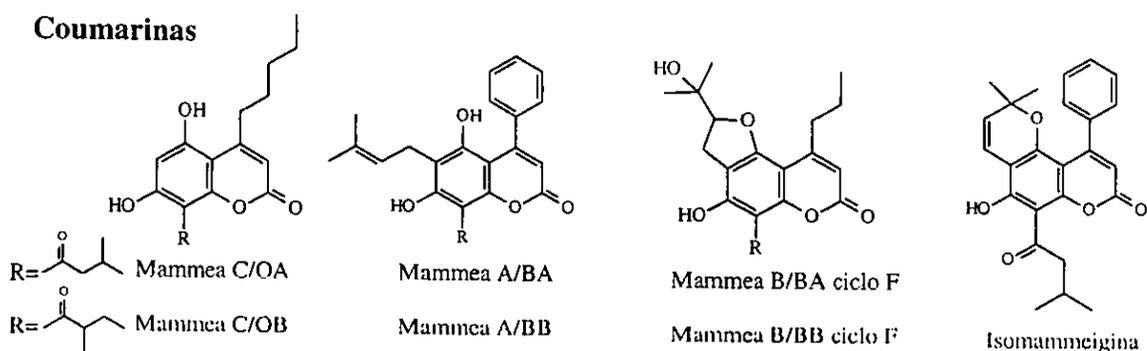
2. Evaluación de la actividad biológica de los metabolitos de las hojas de *Calophyllum brasiliense*

Una parte fundamental del presente proyecto fue la evaluación de la actividad biológica de xantonas y coumarinas (Figura 14). Las coumarinas aquí aisladas de *C. brasiliense*, han sido previamente descritas para el género *Mammea*, y muestran diferencias estructurales respecto de los calanólidos. Estos compuestos presentan el grupo acilo en posición 8 ciclizado formando el anillo D (2,3-dimetilcroman-4-ol), y el grupo isoprenilo sobre el carbono 6 también se encuentra formando un anillo denominado C (2,2-dimetilcromeno). Se ha establecido que la actividad sobre la RT de este tipo de compuestos se encuentra precisamente en el anillo D, el cual presenta las características estructurales necesarias para la actividad anti-VIH-1, en particular la presencia de un grupo OH sobre el carbono 12. En el caso de las coumarinas tipo mammea ninguna presenta el anillo D y solo dos de las coumarinas aisladas presentan el grupo acilo ciclizado, en el caso de la Isomammegina se encuentra el anillo C, y para el caso de la Mammea B/BB ciclo F este es de tipo furano (2-(1-hidroxi-1-metiletil)-dehidrofurano).

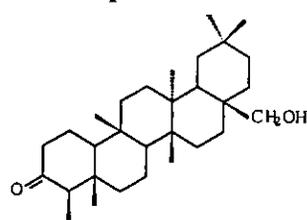
Por lo tanto y debido a las diferencias estructurales entre los calanólidos anti-VIH-1 y las coumarinas tipo mammea, se decidió evaluar la actividad sobre la RT de estas últimas, así como determinar la citotoxicidad de este tipo de compuestos. Se sabe que los calanólidos anti-VIH-1 presentan baja citotoxicidad, mientras que las coumarinas tipo mammea presentan cierto grado de citotoxicidad (Guilet *et al.*, 2000). Adicionalmente se evaluó la actividad antibacteriana ya que esta no ha sido explorada en trabajos previos.

Las xantonas son otro grupo de compuestos las cuales fueron previamente aislados del duramen de *C. brasiliense* (Reyes *et al.*, 1997) y dado que no han sido evaluadas sus posibles propiedades antivirales, en el presente trabajo también se evaluó la actividad sobre la RT ya que se ha reportado que algunas xantonas aisladas de *Maclura tintoria* (Groweiss *et al.*, 2000) presentan actividad contra la RT del VIH-1, así como sus probables efectos citotóxicos ya que en la literatura se ha reportado que son fuertes inhibidores de la replicación celular *in vitro* (Asano *et al.*, 1996) y finalmente también se sabe que algunas xantonas tienen efectos de tipo bactericida (Inuma *et al.*, 1996), por lo que también se evaluó su actividad sobre diversas enterobacterias.

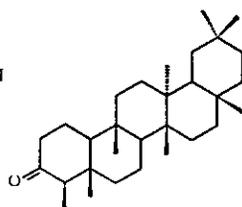
Coumarinas



Triterpenos

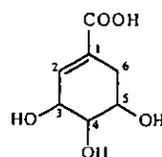


Canofilol

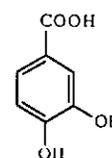


Friedelina

Ácidos

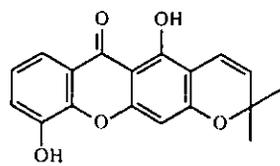


Ác. shiquimico

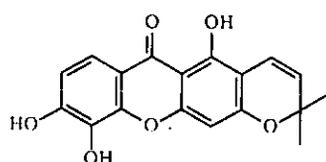


Ác. protocatechuico

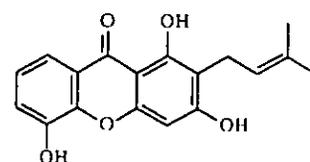
Xantonas



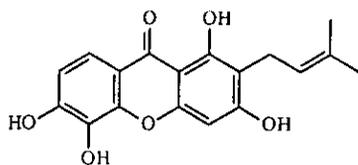
I: 6-desoxijacareubeina



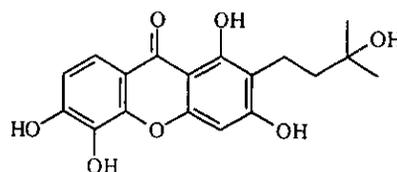
III: Jacareubeina



IV: 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona



V: 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona



VI: 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona

Figura 14. Coumarinas, triterpenos, ácidos y xantonas de *C. brasiliense* evaluados en las pruebas de actividad biológica (RT, citotoxicidad y antibacteriana).

2.1. Determinación de la actividad de los compuestos aislados sobre la enzima transcriptasa reversa

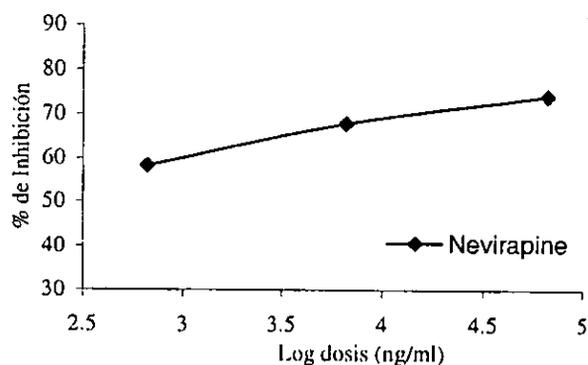
A las concentraciones evaluadas (250, 25 y 2.5 μM) ninguna de las xantonas, mostró efecto sobre la actividad de la RT mientras que para el caso de las mezclas de coumarinas solo una de ellas (mezcla 1: Mammea B/BA ciclo F+B/BB ciclo F) así como la isomammeigina inhibieron levemente a la concentración más alta (250 μM <8.6 %) (Tabla 5). A la misma concentración, el nevirapine inhibió la actividad de la RT en un 74.2%. También se detectó una ligera inhibición de la RT en el caso del triterpeno friedelina (6.12%). Mientras que el canofilol fue totalmente inactivo.

Tabla 5. Efecto de los metabolitos secundarios sobre la actividad de la TR.

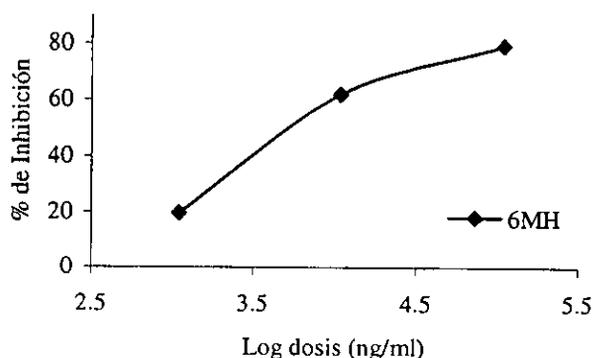
| Sustancias | % inhibición * |
|---|----------------|
| Control | 0 |
| Nevirapine | 74.1 |
| Xantonas: | |
| I | 0.0 |
| III | 0.0 |
| III y IV | 0.0 |
| V | 0.0 |
| VI | 0.0 |
| Coumarinas: | |
| Mezcla 1: Mammea A/BA+A/BB | 0.0 |
| Mezcla 3: Mammea C/OA+C/OB | 0.0 |
| Mezcla 4: Mammea B/BA ciclo F+B/BB ciclo F | 4.77 |
| Isomammcigina | 8.67 |
| Triterpenos: | |
| Friedelina | 6.12 |
| Canofilol | 0.0 |
| Derivados del ácido shiquímico: | |
| Ácido Shiquímico | 2.74 |
| Ácido Protocatechuico | 2.02 |

*=promedio de 2 experimentos independientes con 3 réplicas cada uno, a una concentración de 250 μM

Cabe mencionar que dentro de los compuestos o mezclas no identificadas, el precipitado del extracto de metanol con clave 6MH (Inciso 1.3.3) (grafica 2) mostró un efecto significativo sobre la actividad de la RT de 19.82, 62.0 y 79.3 % a las concentraciones de 1.11, 11.1 y 111.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. El efecto observado de las dos últimas concentraciones son similares a las observadas en el control positivo (6.65 $\mu\text{g/ml}$ = 74.2 % y 66.75 $\mu\text{g/ml}$ = 68.0 %) (grafica 1).



Grafica 1. Efecto del nevirapine sobre la actividad de la enzima RT a concentraciones de: 0.665, 6.65 y 66.75 $\mu\text{g/ml}$



Grafica 2. Efecto del precipitado 6MH sobre la actividad enzimática de la RT examinado a concentraciones de: 1.11, 11.1 y 111.5 $\mu\text{g/ml}$ por desconocer su estructura peso molecular

2.2. Determinación de la Citotoxicidad

La citotoxicidad de xantonas y coumarinas se evaluó inicialmente sobre cinco líneas celulares derivadas de tumores humanos, a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ (fracciones) o 31 μM (compuestos puros). La mayoría de las xantonas y coumarinas mostraron efectos tóxicos contra casi todas las líneas celulares (Tabla 6).

En particular destacan las mezclas de coumarinas 1)Mammea A/BA+A/BB, y 3)Mammea C/OA+C/OB) así como las xantonas (Tabla 6) las cuales fueron en casi todos los casos 100% tóxicas a la concentración evaluada, con excepción de la isomammeigina y la mezcla 4)Mammea B/BA ciclo F+B/BB ciclo F, las cuales únicamente tuvieron efectos tóxicos superiores al 50 % sobre la una línea celular (PC-3) o dos (K562 y U251) respectivamente. En contraste, los ácidos shiquímico y protocatechuico fueron inactivos contra casi todas las líneas celulares. En el caso de los triterpenos, el canofilol mostró toxicidad sobre las líneas epiteliales Hela y HEP-2, mientras que la friedelina solo fue citotóxica a PC-3.

Tabla 6. Inhibición del crecimiento celular por los metabolitos de las hojas y duramen de *C. brasiliense* en cinco líneas celulares.

| Substancia | % de inhibición | | | | |
|-------------------------------------|-----------------|-------|-------|------|------|
| | HeLa | HEp-2 | PC-3 | K562 | U251 |
| Coumarinas: | | | | | |
| Isomammeigina | 14 | 16 | 63.4 | 46.8 | 38.9 |
| Mezcla 1: Mamea A/BA+A/BB | 100 | 92.0 | 96.4 | 88.6 | 93.1 |
| Mezcla 3: Mamea C/OA+C/OB | 100 | 100 | 100 | 89.1 | 100 |
| Mezcla 4: Mamea B/BA c.F+ B/BB c. F | 18 | 20 | 48.4 | 69.5 | 57.8 |
| Xantonas: | | | | | |
| I | 100 | 100 | 100 | n.p | 100 |
| III | 100 | 95.0 | 88.76 | 74.2 | 100 |
| IV | 87.0 | 76.0 | 46.8 | 84.4 | 66.6 |
| III y IV | 100 | 98 | n.p | n.p | n.p |
| V | 100 | 92 | 79.2 | 100 | 89.6 |
| Triterpenos: | | | | | |
| Canofilol | 76 | 80 | 7.0 | s.a | 13.7 |
| Friedelina | 15 | 2 | 61.9 | s.a | 25.8 |
| Ácidos: | | | | | |
| Ac. Protocatechuico | 2 | s.a | s.a | s.a | s.a |
| Ác. Shiquímico | s.a | s.a | 2.32 | s.a | 5.26 |
| Otros: | | | | | |
| 6MH | 3 | 2 | n.p | n.p | n.p |

Compuestos evaluados por 48 hrs. a una concentración 31 μM o 20 $\mu\text{g/ml}$ para el caso de 6MH; s.a: sin actividad; n.p. : no probado.

Un segundo ensayo fue realizado para determinar la concentración efectiva 50 (IC_{50}) solo de aquellas sustancias que mostraron efectos citotóxicos superiores al 50 % en el primer ensayo. En la tabla 7 se muestra que los IC_{50} de las mezclas de coumarinas se encuentran en general entre 0.5 a 2.6 μM dependiendo del tipo celular, mientras que en el caso de las xantonas este se ubica entre 2.0 a 16 μM . Es interesante notar que la cantidad necesaria para provocar dichos efectos citotóxicos de la mayoría xantonas y coumarinas, es igual a la del control positivo (5-fluororacilo) en el caso de las líneas HeLa y HEp-2, mientras que en las tres líneas restantes estos compuestos son 15 veces mas potentes. Sin embargo, al comparar estos resultados con un segundo control positivo (adriamicina), el efecto citotóxico de las xantonas y coumarinas resultó alrededor de 150 veces menor.

Tabla 7. IC₅₀ de coumarinas y xantonas en líneas celulares tumorales.

| Substancia | IC ₅₀ (µM) | | | | |
|------------------------------|-----------------------|-------|-------|------|-------|
| | HeLa | HEp-2 | PC-3 | K562 | U251 |
| Coumarinas: | | | | | |
| Mezcla 1: A/BA+A/BB | 0.6 | 2.0 | 0.5 | 1.8 | 1.6 |
| Mezcla 3: C/OA+C/OB | 0.5 | 1.0 | 1.8 | 2.6 | 2.5 |
| Mezcla 4: B/BA c. F+B/B c. F | n.p. | n.p. | n.p. | 5.0 | 9.4 |
| Xantonas: | | | | | |
| I | 3.0 | 3.0 | n.p. | n.p. | n.p. |
| III | 2.5 | 2.5 | 14.8 | 3.4 | 2.7 |
| IV | 9.0 | 12 | n.p. | 7.1 | 8.2 |
| III y IV | 2 | 2 | n.p. | n.p. | n.p. |
| V | 3.0 | 5.0 | 16.0 | 11.8 | 6.5 |
| 5-fluororacilo | 1.5 | 1.0* | 114 | 82.6 | 205 |
| Adriamicina | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 1.8 | 0.018 |

Concentración efectiva 50 (EC₅₀ =µM) de los compuestos determinada a las 48 hrs; n.p. : no probado

2.3. Determinación de la actividad antibacteriana

Los compuestos de *C. brasiliense* (tres mezclas de coumarinas, cuatro xantonas, dos triterpenos, ácido shiquímico, y protocatechuico y el precipitado 6MH) fueron inicialmente examinados en once cepas enteropatógenas, la mayoría de los compuestos únicamente tuvieron efecto en dos cepas: *S. typhi* y *S. aureus* (Tabla 8) En el caso de *S. typhi*, (gram-) esta solo fue susceptible a las xantonas pero no a coumarinas y demás compuestos, siendo el efecto observado de tipo bactericida. Para el caso de *S. aureus* (gram+), únicamente xantonas y coumarinas mostraron un efecto bactericida y solo en dos mezclas de coumarinas (mezcla 1: Mammea A/BA+A/BB y mezcla 3: Mammea C/OA+C/OB) se observó un efecto bacteriostático Cabe mencionar que estas bacterias fueron ligeramente sensibles a coumarinas y xantonas en comparación a los compuestos: ampicilina y estreptomina, los cuales fueron 50 veces más potentes.

Tabla 8. Efecto de coumarinas y xantonas de *C. brasiliense* en dos bacterias enteropatógenas.

| Substancia | Halos de inhibición (mm) ^d | |
|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>Salmonella typhi</i> (7) | <i>Staphylococcus aureus</i> (10) |
| Coumarinas: | | |
| Mezcla 1) A/BA+A/BB | 0.0 | 11.5; 16 ✓ |
| Mezcla 3) C/OA+C/OB | 0.0 | 9.5; 14 ✓ |
| Mezcla 4) B/BA c. F+B/B c. F | 0.0 | 0.0 |
| Xantonas: | | |
| I | 0.0 | 0.0 |
| III | 11.5 | 10.5 |
| III y IV | 13.0 | 11.5 |
| V | 12.5 | 11.0 |
| VI | 14.5 | 9.0 |
| Ampicilina* | 24.0 | 25.5 |
| Estreptomina* | 16.0 | 25.5 |

Compuestos evaluados a 500 µg/ml; d=promedio de 3 replicas; *= concentración: 10.0 µg/disco; ✓ =efecto bacteriostático

Un segundo experimento (Tabla 9) mostró resultados similares sobre otra cepa de *S. aureus* y también indicó que las bacterias oportunistas *B. Subtilis* y *S. epidermidis* son ligeramente afectadas por las xantonas y coumarinas, a la concentración evaluada, y son altamente susceptibles al cloranfenicol.

Tabla 9. Efecto de xantonas y coumarinas de *C. brasiliense* sobre tres bacterias.

| Sustancias | Halos de inhibición (mm) d | | |
|------------------------------|----------------------------|--------------------|------------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>S. epidermidis.</i> |
| Coumarinas: | | | |
| Mezcla 1) A/BA+A/BB | 15.2, 17.7 ✓ | 14.5 | 14.3, 17.3 ✓ |
| Mezcla 3) C/OA+C/OB | 13.3, 16.0 ✓ | 12.0 | 12.5, 15.1 ✓ |
| Mezcla 4) B/BA c. F+B/B c. F | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Xantonas: | | | |
| I | 7.5 | 0.0 | 0.0 |
| III | 11.8 | 9.3 | 11.1 |
| III y IV | 12.6 | 10.6 | 11.8 |
| V | 13.3 | 10.6 | 12.0 |
| VI | 11.1, 13 ✓ | 9.1 | 10.6, 15.3 ✓ |
| Cloranfenicol* | 19.0 | 15.0 | 15.3 |

Compuestos evaluados a 500 µg/ml; d=promedio de 3 replicas; *= concentración: 0.25 µg/disco, ✓ =efecto bacteriostático.

VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se aislaron de las hojas de *C. brasiliense* 15 compuestos de los cuales 10 son coumarinas, dos son triterpenos (friedelina y canofilol), y dos son ácidos (shíquimico y protocatechuico) así como un posible artefacto derivado del ácido shíquimico. Las coumarinas generalmente se aislaron como mezcla de isómeros y epímeros, con excepción de la isomammeigina que se aisló pura. De estos compuestos las mezclas de coumarinas representan aproximadamente el 1.5 % del peso seco de las hojas, siendo la mezcla I (Mammeas A/BA, A/BB y epi-A/BB) así como los triterpenos friedelina y canofilol los constituyentes mayoritarios de los extractos de hexano y acetona.

En el caso de las coumarinas, todas presentan un grupo acilo saturado sobre el carbono 8, así como un grupo isoprenilo en la posición 6 de la molécula. Las coumarinas obtenidas son de dos tipos de acuerdo al sustituyente sobre el carbono 4: a) aquellas que presentan un sustituyente fenilo (mezcla 1: mammeas A/BA, A/BB, y epi-A/BB; e Isomammeigina) y b) las que presentan un grupo alquilo de tamaño variable, ya sea propilo (mezcla 2: mammea B/BA y B/BB; mezcla 4: mammea B/BA ciclo F y B/BB ciclo F); o pentilo (mezcla 3: mammea C/OA C/OB).

Es importante destacar que las coumarinas aquí aisladas son del tipo *Mammea* y difieren de aquellas comúnmente identificadas para el género *Calophyllum* del tipo *Calanólido*, y sus precursores, así como *Pseudocalanólidos*. Estos dos últimos grupos se caracterizan por presentar un anillo 2,3-dimetilcroman-4-ol resultado de la ciclización grupo acilo insaturado sobre el C-8, con el grupo fenol en la posición 7 (McKee *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 1997). Por el contrario las coumarinas de *C. brasiliense* poseen un grupo acilo sobre el carbono no ciclizado y está saturado, tal como se ha reportado para otros géneros tales como *Mammea* y *Mesua* (ambos incluidos junto con el género *Calophyllum* en la subfamilia Calophylloideae). Recientemente Guilet *et al* (2000) reportaron por primera vez el aislamiento de ocho 4-fenilcoumarinas aisladas de *C. dispar*, las cuales también presentan en la posición 6 u 8 un grupo acilo saturado. Por lo tanto el presente trabajo representa el segundo reporte en el cual se aíslan del género *Calophyllum* coumarinas del tipo mammea y aunque las relaciones biogenéticas dentro del género no son claras, *C. brasiliense* y *C. dispar* podrían representar a los primeros miembros de un grupo minoritario que sintetizen coumarinas con un grupo acilo saturado y por lo tanto podrían ser considerados como la unión con otros géneros de la subfamilia Calophylloideae dentro de la familia Clusiaceae. (Guilet *et al.*, 2000).

Las coumarinas tipo mammea aquí aisladas, así como las xantonas, no mostraron efectos inhibitorios sobre la actividad de la RT (Tabla 5). Previamente se ha mencionado que las coumarinas con actividad anti-RT, presentan un anillo D (trans-10, 11-dimetildihidropirano-12-ol), el cual se ha identificado como el farmacóforo (la parte de la molécula más importante para una actividad biológica) para la RT. (Véase la estructura del (+)-calanólido A, Figura 6). Se ha establecido que la presencia de un heteroátomo, en particular de un OH con orientación β es determinante para dicha actividad. (Galinis *et al.*, 1996; Flavin *et al.*, 1996). Puesto que las coumarinas aisladas en el presente trabajo no presentan el anillo D (grupo acilo ciclizado) esto explica porque no inhiben la actividad de la RT. No obstante,

sería interesante evaluar a estas sustancias sobre otras enzimas importantes dentro del ciclo de replicación del virus del VIH, como la integrasa o proteasa, así como evaluar sus propiedades *in vitro* con células infectadas con el VIH-1.

Es interesante destacar que las coumarinas anti-RT, en particular el (+)-calanólido A, presentan baja citotoxicidad sobre linfocitos T humanos empleando el método de XTT-tetrazolium-formazan, siendo su $IC_{50} = 20 \mu M$ (Kashman *et al.*, 1992). En el presente trabajo se determinó que las mezclas de coumarinas presentan efectos citotóxicos a concentraciones 20 veces menores ($IC_{50} = 2.6-9.4 \mu M$. Tabla 7) cuando fueron evaluadas sobre cinco líneas celulares tumorales humanas mediante el método de sulforrodamina B, lo anterior refleja la importancia del sustituyente acilo sobre el carbono 8, ya que cuando se encuentra ciclizado formando el anillo D disminuyen sus efectos citotóxicos y se incrementa la actividad inhibitoria sobre la RT. Cuando el grupo acilo se encuentra no ciclizado disminuyen su actividad sobre la RT y aumentan sus efectos citotóxicos.

Respecto a la citotoxicidad, las coumarinas de *C. brasiliensis* son entre 4 y 6 veces más potentes que otras coumarinas del tipo mammea. Por ejemplo, Gilet *et al* (2000) reportaron el efecto citotóxico de las coumarinas aisladas de *C. dispar*, en particular de los compuestos mammea A/BA ciclo F, mammea A/BB ciclo F, mammea A/AA ciclo F, mammea A/AB ciclo F así como mammea A/AC ciclo F sobre la línea celular KB, encontrando que estas presentan un IC_{50} entre 5 y 15 $\mu g/ml$ ($=12.5$ a $35.6 \mu M$). De igual manera Morel *et al* (1999) también reportaron que las 6-acilcoumarinas en particular el racemol y la mammea A/AC ciclo F aisladas de *Mesua racemosa* presentaron baja citotoxicidad contra la misma línea celular (KB).

Las diferencias encontradas con respecto a la citotoxicidad de las coumarinas de *C. brasiliense* y las de *C. dispar* así como de *M. racemosa*, podrían ser atribuidas a la diferencia de los compuestos de estas dos últimas especies. Los compuestos de *C. brasiliense* presentan un sustituyente acilo en posición 8, lo cual podría ser la causa de los importantes efectos citotóxicos observados. En particular podemos ver que tanto el racemol como la mammea A/AC presentan el grupo acilo en posición 6, lo cual podría explicar la baja citotoxicidad.

Un grupo isoprenilo sobre el carbono 6 también puede ser importante para la citotoxicidad de las coumarinas. Cuando no está ciclizado su actividad es mayor: $IC_{50}=0.6 \mu M$ (mezcla 1: Mammea A/BA, A/BB y epiA/BB), mientras que compuestos similares pero con el grupo isoprenilo ciclizado formando un anillo de furano presentan baja actividad citotóxica como en el caso de las mammea A/BA ciclo F así como la mammea A/BB ciclo F aisladas de *C. dispar* las cuales tuvieron efectos citotóxicos a concentraciones menores ($9.0 \mu g/ml = 21.3$ y $15 \mu g/ml = 35.6 \mu M$ respectivamente). Dichas diferencias podrían ser la causa de la citotoxicidad diferencial observada entre este grupo de sustancias.

Con base en lo anterior, sería interesante, evaluar otro tipo de respuestas tales como la inhibición de la síntesis de DNA, alteraciones del ciclo celular etc., lo anterior sería de utilidad pues permitiría determinar con exactitud las propiedades citotóxicas de dichas sustancias, debido a que se sabe que otras moléculas del tipo de las coumarinas actúan a

nivel del ciclo celular en la fase G1 (Kofinas *et al.*, 1998) e inhiben la síntesis macromolecular (Marshall *et al.*, 1994). Determinar los mecanismos moleculares (por ejemplo: apoptosis o detención del ciclo celular) involucrados en la respuesta citotóxica de estas moléculas, sería de gran importancia para proponer a estas para estudios posteriores en modelos *in vivo* con algún tipo de carcinoma inducido.

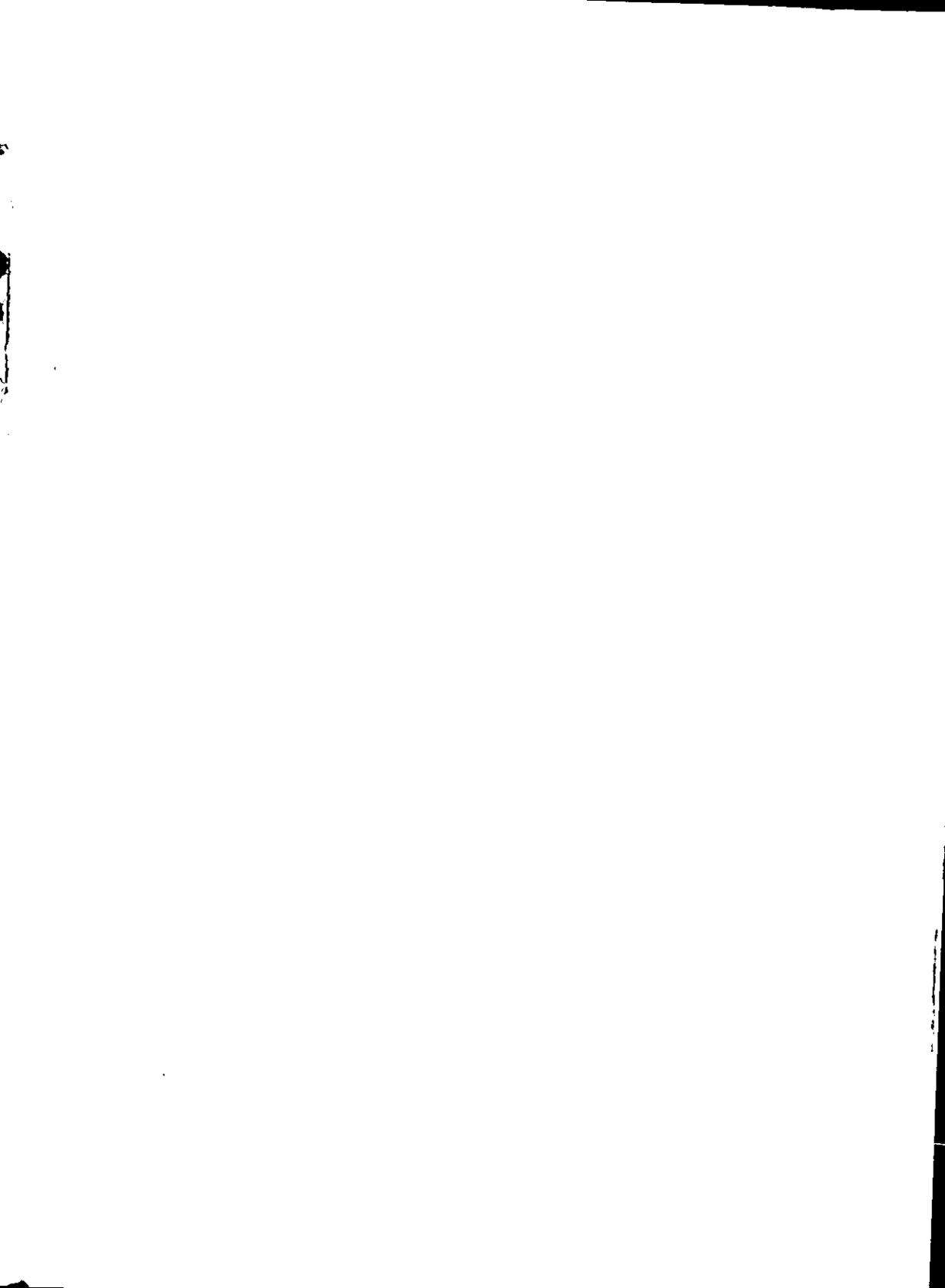
En el caso de las xantonas, ninguna de estas inhibió la actividad enzimática de la RT (Tabla 5). La ausencia de actividad por parte de estas moléculas probablemente pudiera estar asociada a las diferencias estructurales de estas xantonas y las que si han mostrado actividad. En el caso de las xantonas Macluxantona B y Macluxantona C (Groweiss *et al.*, 2000) (Figura 7), estas presentan 2 substituyentes prenilados dentro de su estructura: sobre el carbono 2 un grupo 2-isopentenil y sobre el carbono 4 un grupo 1,1'-dimetilalil. Las xantonas aquí evaluadas solo presentan el substituyente 1,1'-dimetilalil sobre el carbono 2, mientras que el carbono 4 se encuentra libre (figura 14), estas diferencias podrían influir en la falta de actividad sobre la RT.

No obstante lo anterior, las xantonas de *C. brasiliense* presentan efectos antiproliferativos significativos cuando fueron evaluadas contra líneas celulares tumorales humanas *in vitro* (Tabla 7); destaca la actividad citotóxica de la xantona III, este compuesto fue el más activo en las cinco líneas celulares tumorales evaluadas. Lo anterior concuerda con otros estudios en los cuales se ha observado que este tipo de compuestos cuando presentan un anillo adicional de tipo pirano (formado por la ciclización del grupo isoprenilo en posición 2 con el grupo OH sobre el carbono 3), la actividad citotóxica se ve incrementada (Asano *et al.*, 1996; Seo *et al.*, 1999), no así cuando este no se encuentra formando un ciclo como en el caso de las xantonas IV, V y VI en las cuales se ve una disminución de la actividad citotóxica (Tabla 7). Esto es más evidente en el caso de la xantona IV la cual carece de un hidroxilo menos. Lo anterior es congruente con otros resultados; Sordat-Diserens *et al.*, (1992) reportaron el efecto citotóxico de diversas xantonas preniladas sobre el carbono 3, aisladas de *Garcinia livingstonei* en cinco líneas celulares tumorales de colon y en general la actividad citotóxica no fue significativa, excepto para la xantona 6,11-dihidroxi-3-metil-3-(4-metil-3-pentenil)-3H,7H-pirano[2,3-c]-xantona, la cual presentó una IC₅₀ de 1.6 µg/ml (=4.2 µM) y 0.6 µg/ml (=1.5 µM) en las líneas Co115 y SW480 respectivamente. Adicionalmente también se ha reportado que cuando las xantonas se encuentran metoxiladas y/o se encuentran poco hidroxiladas estas presentan baja actividad citotóxica (Poobrasert *et al.*, 1998).

Por lo tanto sería relevante al igual que en el caso de las coumarinas, corroborar la actividad citotóxica de las xantonas mediante otros métodos, e iniciar otros estudios que permitan conocer los mecanismos moleculares que median la respuesta citotóxica. Otros estudios han señalado que las xantonas suprimen la síntesis macromolecular (Lin *et al.*, 1996), aumentan el índice mitótico en la metafase (Bilia *et al.*, 2000), inhiben la actividad la enzima topoisomerasa I y II (Tosa *et al.*, 1997) e inhiben la actividad de la proteína P-glucoproteína (Tchamo *et al.*, 2000), no obstante los mecanismos moleculares no se han determinado por lo tanto estos antecedentes son de gran importancia ya que pueden orientar con respecto de la dirección de futuras investigaciones.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, tanto las xantonas como las coumarinas no presentaron actividad a bacterias gram-, mientras que contra las bacterias gram+ (*S. aureus*, *B. subtilis* y *S. epidermidis*) estos compuestos tuvieron baja actividad a la concentración evaluada (500 µg/disco), siendo alrededor de 50 veces menos efectivas comparadas con los controles positivos (Tablas 8 y 9). Este es el primer trabajo en el cual se reporta que las coumarinas presentan actividad antibacteriana aunque moderada.

Con respecto a las xantonas, se puede inferir que la poca actividad observada, se deba principalmente a la presencia del grupo isoprenilo en posición 3, ya que las xantonas que han mostrado una significativa actividad (por ejemplo la rubraxantona y la calozeyloxantona, Figura 10), incluso comparable a la observada en los controles positivos (Inuma *et al.*, 1996, Dharmaratne *et al.*, 1999), no presentan dicho sustituyente sobre el carbono 3. Por lo tanto esta sería la característica más importante que determina la baja actividad antibacteriana aquí reportada para las xantonas de *C. brasiliense*.



Experiencia Calidad y Servicio
D.F. 2001

www.geocities.com/tesis_dff
E-mail: tesis_dff@hotmail.com

TEL. 50 96 47 13

TESIS DF

en
Impreso y Encuadernado



VII. CONCLUSIONES

A partir del estudio químico de las hojas y la evaluación de la actividad biológica en particular sobre la reversa transcriptasa (RT), efectos citotóxicos así como efectos antibacterianos de las coumarinas y xantonas de *Calophyllum brasiliense* se puede concluir que:

- 1) Las hojas de *Calophyllum brasiliense* son ricas en metabolitos secundarios en particular de coumarinas del tipo Mammea, siendo la mezcla I (Mammea A/BA, A/BB y epi-A/BB) así como los triterpenos canofilol y friedelina los constituyentes mayoritarios.
- 2) *Calophyllum brasiliense* es la segunda especie en la que se determina que sintetiza coumarinas tipo Mammea reportadas para otros géneros tales como *Mammea* y *Mesua*.
- 3) Las coumarinas tipo mammea aisladas presentan baja actividad anti-RT (<10% a 250 μ M), sugiriendo que la ausencia del anillo D podría explicar la baja actividad.
- 4) Tanto las xantonas como las coumarinas tienen efectos citotóxicos importantes sobre diversas líneas celulares tumorales humanas.
- 5) Presentan baja actividad antibacteriana.
- 6) La única especie de *Calophyllum* con distribución en México no posee coumarinas del tipo de los calanólidos los cuales son prospectos importantes en la terapia del SIDA, pero sus propiedades citotóxicas al igual que las de las xantonas podrían aprovecharse en el tratamiento del cáncer.

VIII. PERSPECTIVAS

- a) Determinar los mecanismos celulares y/o moleculares que median la respuesta citotóxica.
- b) Evaluar las coumarinas en células infectas por el virus del SIDA.
- c) Ciclizar el grupo acilo de las coumarinas obtenidas para generar el anillo D y determinar si se incrementa la actividad anti-RT.
- d) Evaluar las coumarinas sobre otras enzimas (integrasa y proteasa) involucradas en la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).
- e) Ampliar los estudios a todas las especies de Guttíferas presentes en México.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Asano, J., Chiba, K., Tada, M., Yoshii, T. (1996). Cytotoxic xanthenes from *Garcinia hanburyi*. *Phytochemistry* 41(3):815-820.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science* 220: 868-871.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Chemical Pathology*. 36(3):493-496.
- Bennett, Graham y Lee, Hiok-Huang. (1989). Xanthenes from Guttiferae. *Phytochemistry* . 28(4):967-998.
- Bilia A.R., Yusuf A.W., Braca A., Keita A., Morelli I. (2000). New prenylated anthraquinones and xanthenes from *Viasmia guineensis*. *J. Nat. Prod.* 63:16-21.
- Boyer P.L., Currens M.J., McMahon J.B. Boyd M.R. and Hughes S.H. (1993). Analysis of nonucleoside drug-resistan variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse transcriptase. *Journal of Virology*. 67(4):2412-2420.
- Buckheit W.R., Boltz V.F., Yeagy-Bargo S., Weislow O., Mayers D.L., Boyer P.L., Hughes S.H., Pan B.C., Chu S.H. and Bader J.P. (1995). Resistance to 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine derivatives is generated by mutations at multiple sites in the HIV-1 Reverse Transcriptase. *Virology*. 210:186-193.
- Cáceres A., Cano O., Samawoa V. And Aguilar L. (1990). Plant used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders: 1 screening of 84 plants used against enterobacterias. *Journal of Ethnopharmacology*. 30:55-73
- Campos V.A., Cortes A. L., Davila A.P., García M. A., Reyes S.J. , Toriz A.G., Torres C. L., y Torres C.R. (1992). *Plantas y Flores de Oaxaca*. México. UNAM. pag. 15
- Cardellina, J.H. II, Bokesch, H.R., McKee, T.C., Boyd, M.R. (1995). Resolution and comparative anti-HIV evaluation of the enantiomers of Calanolides A and B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 5(9):1011-1014.
- Carpenter I., McGarry E. J., Scheinmann F. (1970). The neoflavonoids and 4-alkylcoumarins from *Mammea afriacana* G. Don. *Tetrahedron Letters*. 46:3983-3986.
- Castellano E.E., Zukerman-Schpector J. (1988). Structure of Isomammeigina- a new phenylcoumarin from Guttiferae species. *Acta Cryst.* C44:1936-1938
- Chen S. X., Wan M., and Loh B. N. (1996). Active Constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Medica* 62:381-382
- Chudnoff M. (1984). *Tropical timbers of the world*. Agric. Handbook. Washington, D.C. : U.S. Department of Agriculture, Forest Service p. 466
- Creagh T., Xu Z. Q. Ray L. Giltner J., Nayer T. and Ruckle J. 1998. 5th Conf Retrovir Oppor Infect. p.202(abstract no 652) 1998 Feb 1-5.
- Crombie L. and Games D.E. (1966). Isolation and structure of *Mammea* A/BA, A/AB and A/BB: a group of 4-aryl-coumarin extractives of *Mammea americana* L. *Tetrahedron Letters*. 2:145-149.

- Crombie L. and Games D.E. (1966). Isolation and structure of Mammea B/BA, B/BB, B/BC and C/BB: a group of 4-n-propyl- and 4-n-amyl-coumarin extractives of *Mammea americana* L. *Tetrahedron Letters*. 2:151-156.
- Crombie L., Games D. E. (1967). Extractives of *Mammea americana* L. Part II. The 4-phenylcoumarins. Isolation and structure of Mammea A/AA, A/A cyclo D, A/BA, A/AB and A/BB. *J. Chem. Soc. (C)*. 7:2553-2559
- Crombie L., Games D. E., Haskins N. J., Reed G. F. (1970). Identification of nine new 5,6-annulated relatives of the mammea coumarins B/BA, B/BB & B/BC. *Tetrahedron Letters*. 46:3975-3978.
- Crombie L., Games D.E., Haskins N.J., Reed G.F. (1972). Extractives of *Mammea americana* L. Part V. The insecticidal compounds. *J. C. S. Perkin I*. 2255-2260.
- Crombie L., Jones R. C. F., Palmer C. J. (1985). Synthesis of mammeins and surangin A. *Tetrahedron Letters*. 26(24):2929-2932.
- Currens, M.J., Gulakowski R.J., Mariner J.M., Moran R.A., Buckheit R.W., Gustafson K.R., McMahon J.B. and Boyd M.R. (1996). Antiviral Activity and mechanism of action of Calanolide A against the Human Immunodeficiency Virus type-1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 279(2):645-651.
- Dharmaratne, H.R.W., Wijesinghe, W.M.N.M., Thevanasem, V. (1999). Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum* species, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 66:339-342.
- Dharmaratne H.R., Wanigasekera W. M., Mata-Greenwood E., Pezzuto J.M. (1998). Inhibition fo human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase activity by cordatolides isolated from *Calophyllum cordato-oblongum* [letter]. *Planta Medica*. 64(5):460-461.
- Echenique-Manrique R. (1970). *Descripción, características y usos de 25 maderas tropicales mexicanas*. México. Camara Nacional de la Industria de las Construcción.
- Fields B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M (eds.). (1996). *Fields' Virology*. 3rd Ed., Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. 1340 pp.
- Finnegan R.A., Mueller W. H. (1965). Constituents of *Mammea americana* L. IV. The structure of Mammeigin. *J. Org. Chem*. 30:2342-2344
- Flavin M.T., Rizzo, J. D. , Khilevich A., Kucherenko A., Sheinkam A. K., Vilaychack V., Lin L., Chen W., Greenwood E. M., Pengsuparp T., Pezzuto J.m., Hughes S. H. , Flavin T.M., Cibulski M., Boulanger W.A., Shones R.L. and Xu Z.Q. (1996). Synthesis, chromatographic resolution, and Anti-Human Immunodeficiency Virus activity of (±)-Calanolide A and its enantiomers. *Journal of Medicinal Chemistry*. 39(6): 1303-1313.
- Frame, A.D. , Rios-Olivales, E., De Jesus, L., Ortiz, D., Pagan, J., Mendez, S.(1998). Plants form Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. *P.R.Health Sci. J*. 17(3):243-52.
- Fuller R.W., Bokesch H.R., Gustafson K.R., McKee T.C., Cardellina J.H., McMahon J.B., Cragg G.M., Soejarto D.D. and Boyd M.R. (1994). HIV-Inhibitory coumarins from latex of the tropical rainforest tree *Calophyllum teysmanni* var. *inophylloide*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 4(16):1961-1964.
- Galinis D.L. , Fuller R.W. Mckee T.C., Cardellina J.H. Gulakowski R.J., McMahon J.B. and Boyd M.R. (1996). Structure-Activity modifications of the HIV-1 inhibitors (+)-

- Calanolide A and (-)-Calanolide B. *Journal of Medicinal Chemistry*. 39(22): 4507-4510.
- Gautier J., Cave A., Kunesch G. Y Polonsky J. (1972). On the biosynthesis of Neoflavonoids. *Experientia* 28(7):759-761.
- Goodman and Gilman (1996). *Las bases farmacológicas de la terapeutica*. 9 ed. Vol. II. Edit. McGraw-Hill Interamericana.pag.1096-1098
- Gormley, N. A., Orphanides, G., Meyer, A., Cullis, P.M., Maxwell, A. (1996). The interaction of coumarin antibiotics with fragments of the DNA gyrase B protein. *Biochemistry*. 35(15):5083-5092.
- Gros E. G., Pomilio A.B., Seldes A.M. y Burton G. (1985). *Introducción al estudio de los productos naturales*. Washington, D.C., OEA.
- Groweiss A., Cardellina II J. H and Boyd M.R. (2000). HIV-Inhibitory Prenylated xanthenes and flavones from *Maclura tintoria*. *J. Nat. Prod.* 63:1537-1539.
- Guilet D., Hélesbeux J.J., Séraphin D., Sévenet T., Richomme P. y Bruneton J. (2000). Novel Cytotoxic 4-Phenylfuranocoumarins from *Calophyllum dispar*. *Journal of Natural Products*. 10-15.
- Herbert R.B. (1989). *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*. 2da Edición Chapman and Hall. pag.97-119
- Hizi A., Tal R., Shaharabany M., Currens M.J. Boyd M.R. Hughes S. H. and McMahon J.B. (1993). Specific inhibition of the reverse transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and the chimeric enzymes of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 by nonnucleoside inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37(5):1037-1042.
- Huang T. B. ; Fong W. P. and Yeung H. W. (1997). Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sciences* 61(10):933-949.
- Iinuma,M., Tosa, H., Tanaka, T., Asai, F., Kobayashi, Y., Shimano, R., Miyauchi, K. (1996). Antibacterial activity of xanthenes from Guttiferaceous plants against methicillin-resistan *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.* 48:861-865.
- Ishikawa T., Oku Y. & Kotake K.-I. (1997). Diastereoselective preparation of a trans, trans 2,3-dimethylchroman-4-ol skeleton: A model synthetic approach to anti-HIV-1 active *Calophyllum* coumarins. *Tetrahedron* 53(44):14915-14928.
- Kashman, Y., Gustafson K.R., Fuller R. W., Cardellina J. H., McMahon J. B., Currens M. J. Buckheit R. W., Hughes S H., Cragg G.M. and Boyd M. R. (1992). The Calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *Journal of Medicinal Chemistry*. 35(15):2735-2743.
- Khilevich, A. Aye, M., Flavin, M.T., Rizzo, J.D., Lin L., Dzekhtser, S., Brankovic, D., Zhang, H, Chen, W., Liao, S., Zembower, D. E., & Xu, Z.Q. (1996a). Synthesis of (+)-Calanolide A, an anti-HIV agent, via enzym-catalized resolution of the Aldol products. *Tetrahedron Asymmetry* 7(11):3315-3326.
- Khilevich, A. Rizzo, J.D., Flavin, M.T., Sheinkman A.K., Aye, M. Kucherenko, A., Yan, Ch., Dzekhtser, S., Brankovic, D., Lin, L., Liu, J., Rizzo, T.M., & Xu, Z.Q. (1996b). A versatile approach for synthesis of 2,3-dimethyl chroman-4-ones, intermediate for Calanolide anti-HIV agents, via Aldol/Mitsunobo reactions. *Synthetic Communications* 26(20):3757:3771.

- Kofinas, C., Chinou, I., Loukis, A., Harvala, C., Roussakis, C., Maillard, M., Hostettman, K. (1998). Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. *Planta Medica* 64:174-176.
- Kohlstaedt L.A., Wang J., Friedman J.M., Rice P.A. and Steitz T.A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256:1783-1790.
- Levinson W. and Jawetz E. (2000). *Microbiología e inmunología: Autoevaluación y repaso*. Edit. Manual Moderno, pag.3-223
- Lin C. N. , Liou S.J. , Lee T. H. , Chuang Y. C. and Won S. J. (1996). Xanthone derivatives as potential anti-cancer drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 48:539-544.
- Lin C. N. , Liou S. S. ; Ko F. N. and Teng C. M. (1992). γ -Pyrone compounds. II: Synthesis and antiplatelet effects of tetraoxygenated xanthenes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 81(11):1109-1112.
- Maguire, B. (1979). *Taxon* 28 (1, 2/3): 13-18.
- Manitto P. (1981). *Biosynthesis of natural products*. Edit. John Wiley & Sons. pag. 373-381.
- Marshall M. E., Kevin K., Benefield C., Umerani A., Albainy-Jenei S., Zhao Q., Khazaeli M.B. (1994). Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines *in vitro*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120:S3-10.
- Martínez M. (1994). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas*. México D.F. Fondo de Cultura Económica.
- Matthée G., Wright A.D., y König G. M. (1999). HIV Reverse transcriptase inhibitors of Natural Origin. *Planta Medica* 65:493-506
- Matern U., Luer P., Kreuzsch D. (1999). Biosynthesis of Coumarin. Tomado de: *Comprehensive Natural Products Chemistry* Vol. 1. Edit. Elsevier. pag. 623-637
- McKee T. C., Fuller R.W., Covington C.D., Cardellina J.H., Gulakowski R.J. Krepps B. L., McMahon J. B. and Boyd M. R. (1996). New Pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*. *Journal of Natural Products*. 59(8):754-758.
- McKee T.C., Covington C.D., Fuller R.W., Bokesch H.R., Young S., Cardellina J.H. II., Kadushin M.R., Soejarto D.D., Stevens P.F., Cragg G.M., Boyd M.R. (1998) Pyranocoumarins from tropical species of the genus *Calophyllum*: a chemotaxonomic study of extracts in the National Cancer Institute Collection. *Journal of Natural Products*. 61: 1252-1256.
- Miller G. (1996). Resistencia bacteriana: repercusiones en el manejo de antibióticos. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. Vol. IX: 24-27
- Morel C., Guilet D., Oger J.M, Séraphin D., Sévenet T., Wiart C., Hadi A.H., Richomme P. and Bruneton J. (1999). 6-Acylcoumarins from *Mesua racemosa*. *Phytochemistry*. 50:1243-1247.
- Nagem T. J., DE A. e. Silva M. (1988). Xanthenes and phenylcoumarins from *Kielmeyera pumila*. *Phytochemistry*.27(9):2961-2962.
- Newman R. A. and Madden T. (1995). *Proc. Annu. Meet Am. Assoc. Cancer Res.* 35:A18558.
- Ortega-Escalona, F., Castillo-Moraies I., and Carmona-Valdovinos, T. (1991). *Anatomía de la Madera de Veintiseis Especies de la Selva Lacandona, Chiapas*. Angiospermas Arbores de México No. 3. La Madera y su uso 26. Instituto de Ecología A.C. &

Universidad Autónoma Metropolitana. México. 200 pp.

- Patil A. D., Freyer A. J., Eggleston D. S., Haltiwanger R. C., Bean M.F., Taylor P. B., Caranfa M. J., Breen A. L., Bartus H. R., Johnson R. K., Hertzbeerg R. P. and Westley J. W. (1993). Inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *Journal of Medicinal Chemistry*. 36(26):4131-4138
- Pattalung, P., Thongtheeraparp, W., Wiriyachitra, P., Taylor, W. (1994). Xanthones of *Garcinia cowa*. *Planta Medica*. 60:365-368.
- Pengsuparp T., Serit M., Hughes S H., Soejarto D. D. and Pezzuto J. M. (1996). Specific inhibition of Human Immunodeficiency Virus type 1 Reverse Transcriptase mediated by Soulatrolide, a coumarin isolated from the latex of *Calophyllum teysmannii*. *Journal of Natural Products*. 59(9):839-842.
- Pennington T.D. y Sarukhan J. (1968). *Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México*. México. Instituto Nacional de Investigadores Forestales. Pag. 413.
- Peres V. y Nagem T.J. (1997). Trioxxygenated naturally occurring xanthones. *Phytochemistry*. 44(2):191-214.
- Pezzuto J. M. (1997). Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology*. 53:121-133.
- Popoca J., Aguilar A., Alonso D., Villarreal M. L. (1998). Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 59:173-177.
- Proobrasert O., Constant H.L., Beecher C.W.W., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Pezzuto J.M., Cordell G.A., Santisuk T. and Reutrakul V. (1998). Xanthones from the twigs of *Mammea siamensis*. *Phytochemistry*. 47(8):1661-1663.
- Rath G., Potterat O., Mavi S., and Hostettmann K. (1996). Xanthones from *Hypericum roeperanum*. *Phytochemistry*. 43(2):513-520.
- Reyes C. R., Jimenez E. M., Estrada M. E. (1997). Antifungal xanthones from *Calophyllum brasiliense* heartwood. *Journal of Chemical Ecology* 23(7):1901-1911.
- Schmidt, W. & Beerhue, L. (1997). Alternative pathways of xanthones biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. *FEBS Lett*. 420(2-3):143-6.
- Seo E.K., Wall M.E., Wani M.C., Navarro H., Mukherjee R., Farnsworth N.R. and Kinghorn A.D. (1999). Cytotoxic constituents from the roots of *Tovomita brevistaninea*. *Phytochemistry*. 52:669-674
- Shao, X., Ekstrand, D.H.L., Bhikahabhai ,R., Kallander, C.F.R., & Gronowitz, J.S. (1997). A non-radioactive microtitre plate reverse transcriptase (RT) assay based on immobilized template, for screening of RT activity inhibitors and evaluation of their mode of action. *Antiviral Chemistry & Therapy* 8(2):149-159.
- Simmons G., Clapham P. R., Picard L., Offord R. E., Rosenkilde M. M., Schwartz T. W., Buser R., Wells T. N. C., Proudfoot A.E. (1997). Potent Inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science*. 276(5310):276-9.
- Spino C., Dodier M. and Sotheeswaran S. (1998). Anti-HIV coumarins from *Calophyllum* seed oil. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 8:3475-3478
- Soler, C. & Gudiño-Rosales, J. C. (1995). A 11 años del descubrimiento del virus de

- Inmunodeficiencia Humana. *Salud Pública Mex.* 37(6): 499-509.
- Sordat-Diserens I., Rogers C., Sordat B and Hostettmann K. (1992). Prenylated xanthenes form *Garcinia livingstonei*. *Phytochemistry* 31(1):313-316.
- Standley, P. C. (1923). Clusiaceae In: *Tress and Shrubs of Mexico*. Contributions from the United States National Herbarium. Vol 23, part 3. p 824-827.
- Steves P. F. (1980). A revision of the old world species of *Calphyllum* (Guttiferae). *Journal of the Arnold Arboretum*. 61(2):117-171.
- Suffnes M. and Douros J. (1982). Current status of the NCI plant and animal product program. *Journal of Natural Products*. 45(1):1-14.
- Tchamo D. N., Dijoux-Franca M.-G, Mariotte A.-M. Tsamo E., Daskiewicz J.B., Bayet C., Barron D., Conseil G., and Di Pietro A. (2000). Prenylated xanthenes as potential P-Glycoprotein modulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 10:1343-1345.
- Tosa H., Iinuma M., Tanaka T., Nozaki H., Ikeda S., Tsutsui K., Tsutsui K., Yamada M., and Fujimori S. (1997). Inhibitory activity of xanthone derivatives isolated from some Guttiferaeous plants against DNA Topoisomerases I and II. *Chem. Pharm. Bull.* 45(2):418-420.
- Turner, B. G., Summers M. F. (1999). Structural Biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*. 285(1): 1-32.
- Vlietnick A.J., De Bruyne T., Apers S., and Pieters L.A. (1998). Plant-Derived leading compounds for chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. *Planta Medica*. 64:97-109.
- Wang , J.N., Hou, C.Y., Liu. L.Z., Lin. L.Z., Gil. R.R. & Cordell. G.A. (1994). Swertifrancheside, an HIV-reverse transcriptase inhibitor and the first flavone-xanthone dimer, from *Swertia franchetiana*. *Journal of Natural Products* 57:211-213.
- Xu, Z.Q., Bukheit, R.W., Stup, T.L., Flavin, M.T., Khilevich, A. Rizzo J.D., Lin L., Zembower, D. E. (1998). In vitro anti-Human Immunodeficiency virus (HIV) activity of the chromanone derivative, 12-oxocalanolide A, a novel NNRTI. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 8: 2179-2184.
- Zembower D.E., Liao S., Flavin M.T., Xu Z.Q., Stup T.L., Bukheit R.W., Khilevich A., Mar A.A. and Sheinkman A.K. (1997). Structural Analogues of the calanolide Anti-HIV agents. Modification of the *trans*-10,11-dimethyldihydropyran-12-ol Ring (Ring C). *Journal of Medicinal Chemistry* 40(6):1005-1017.

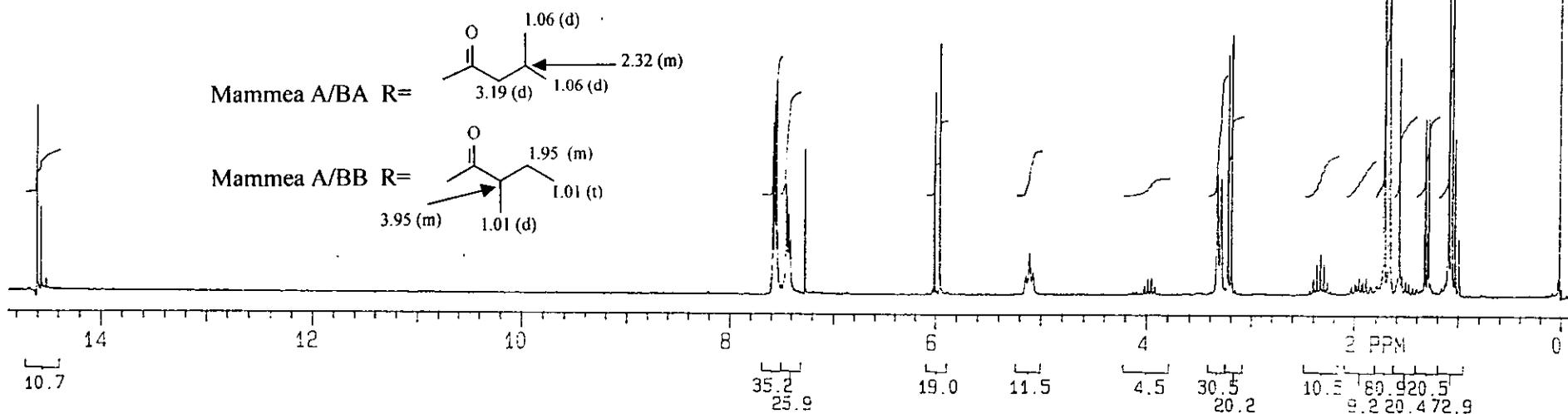
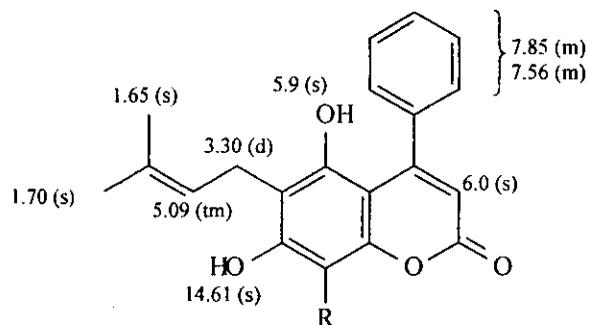
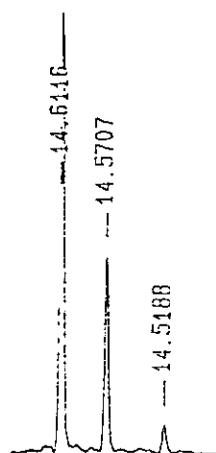
ANEXO

RICARDO REYES CHILPA

3 AH 2C11

ELIZABETH ESTRADA
INSTITUTO DE QUIMICA U.N.A.M.
WILBER MATUS MEDINA

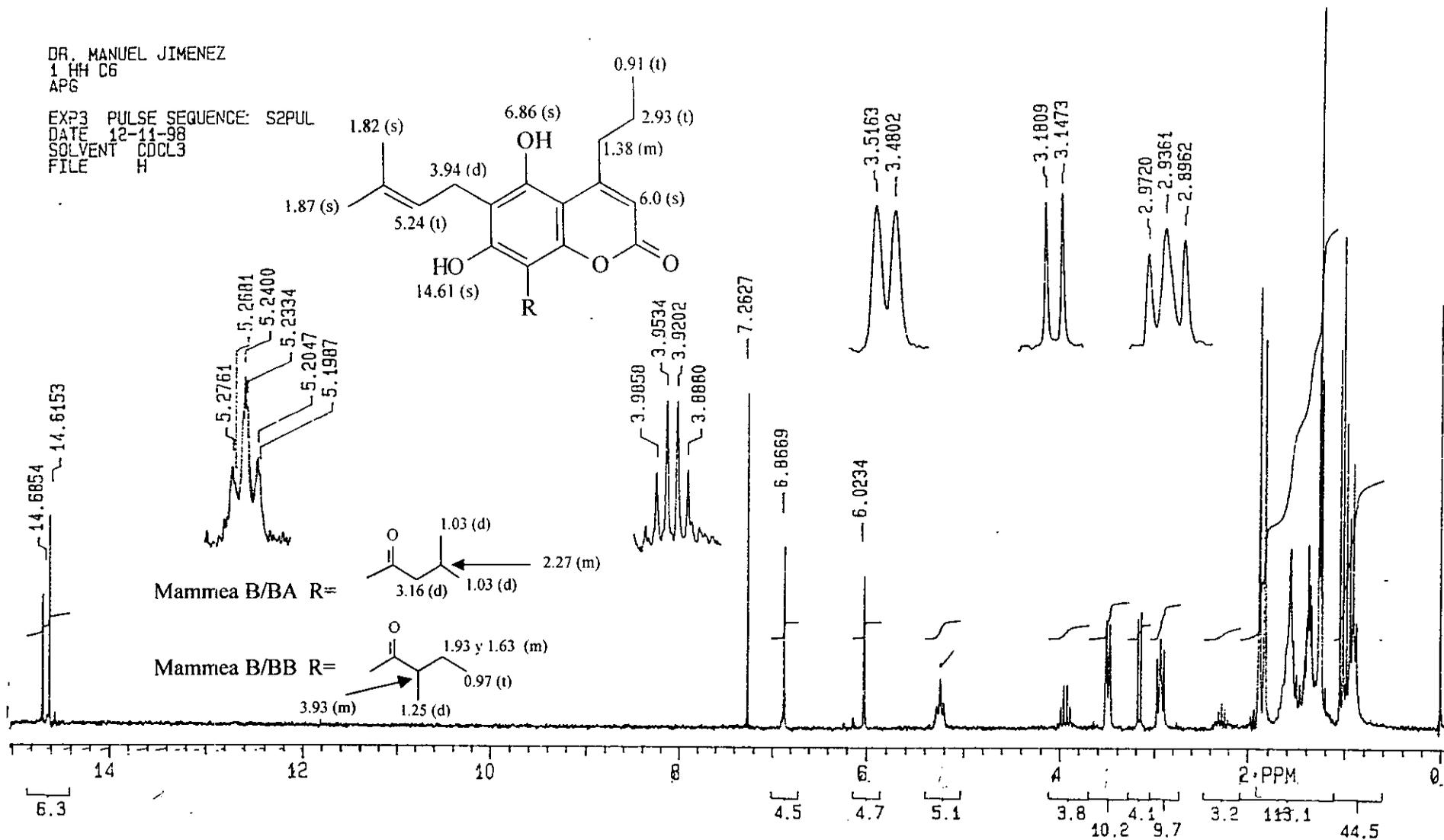
EXPS PULSE SEQUENCE: S2PUL
DATE 01-02-99
SOLVENT CDCL3
FILE H



Espectro No. 1. Espectro de RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): Mezcla 1: Mammea A/BA + Mammea A/BB + epi-Mammea A/BB

DR. MANUEL JIMENEZ
1 HH C6
APG

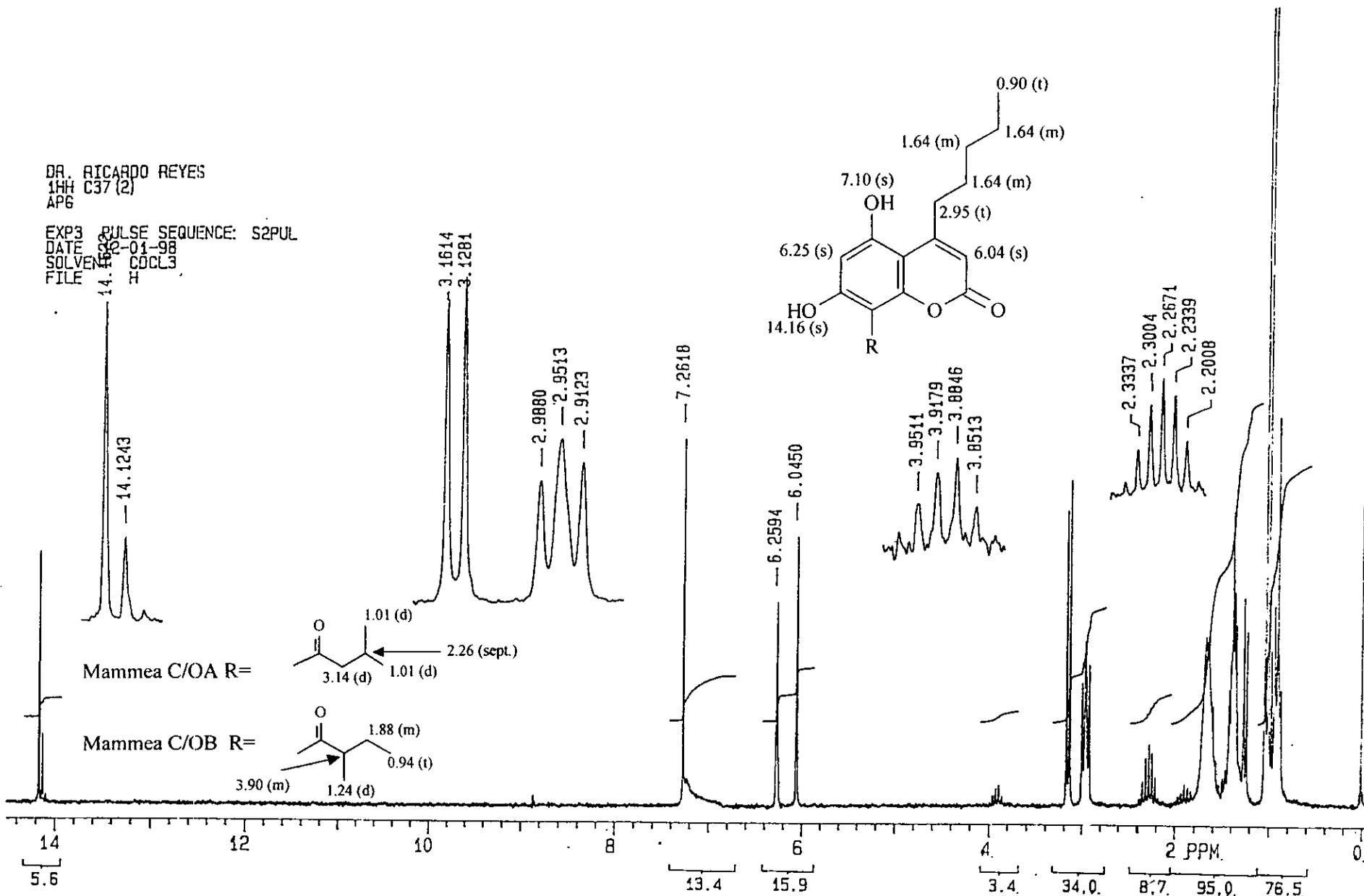
EXP3 PULSE SEQUENCE: S2PUL
DATE 12-11-98
SOLVENT CDCL3
FILE H



Espectro No. 2. Espectro de RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): Mezcla 2: Mamea B/BA + Mamea B/BB

DR. RICARDO REYES
 1H C37 (2)
 AP6

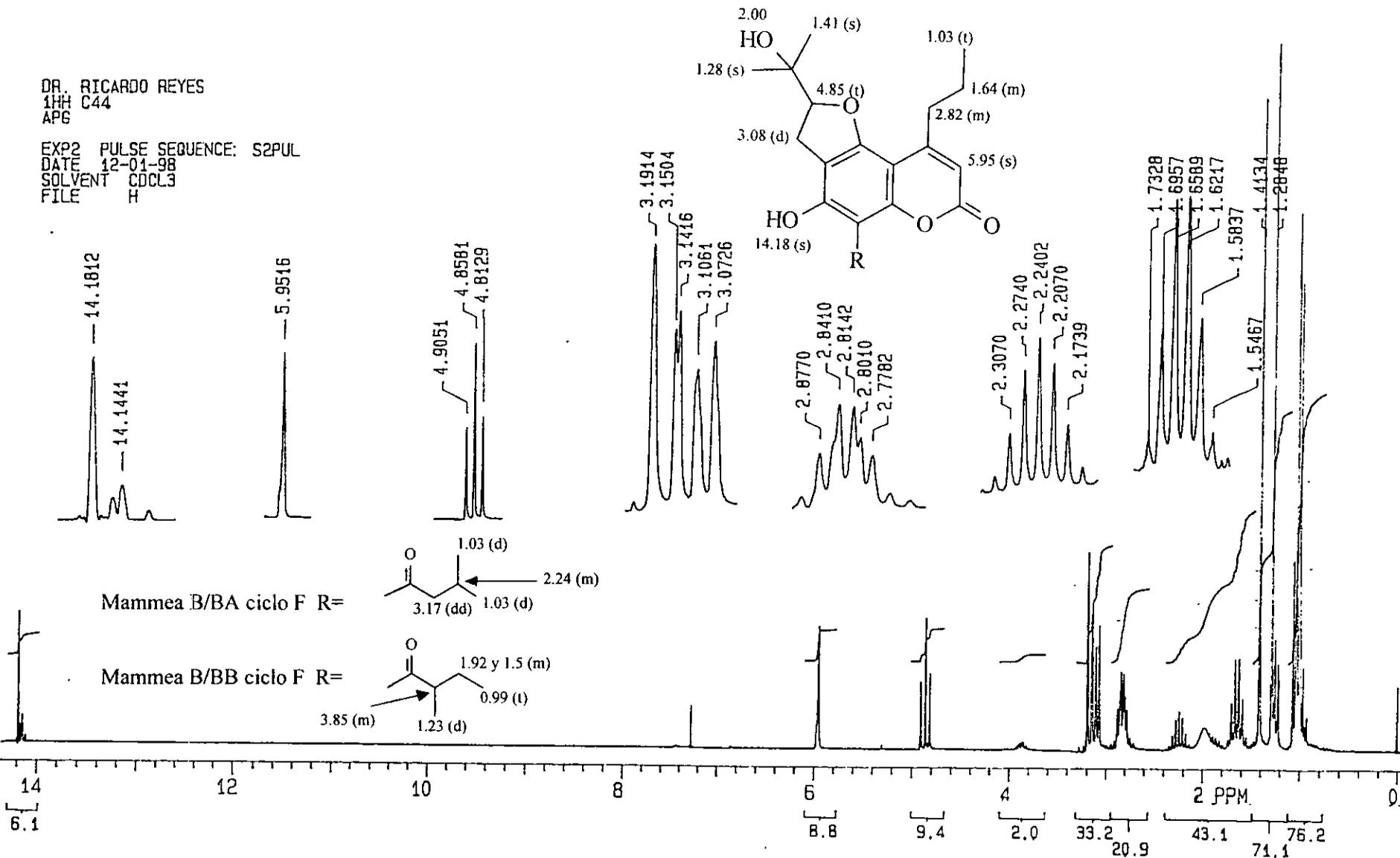
EXP3 PULSE SEQUENCE: S2PUL
 DATE 92-01-98
 SOLVENT CDCL3
 FILE H



Espectro No. 3. Espectro de RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): Mezcla 3: Mammea C/OA + Mammea C/OB

DR. RICARDO REYES
 1HH C44
 APG

EXP2 PULSE SEQUENCE: S2PUL
 DATE 12-01-98
 SOLVENT CDCL3
 FILE H



Espectro No. 4. Espectro de RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) :Mezcla 4: Mammea B/BA ciclo F + Mammea B/BB ciclo F.

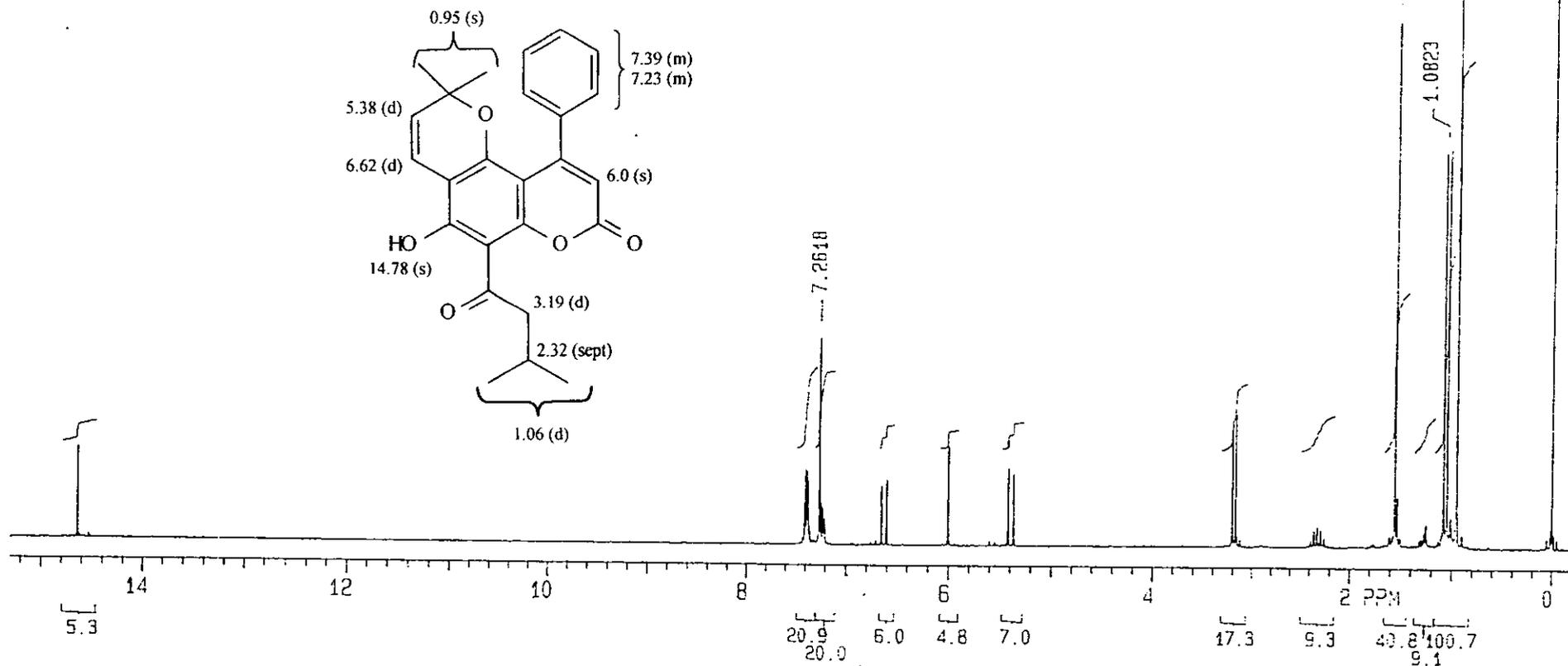
RICARDO REYES CHILPA

3 AH2 C10 (1)

ELIZABETH ESTRADA
INSTITUTO DE QUIMICA
WILBER MATUS MEDINA

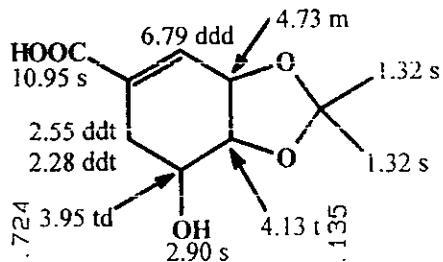
U.N.A.M.

EXP# PULSE SEQUENCE: S2PUL
DATE 02-19-98
SOLVENT CDCL3
FILE H



Espectro No. 5. Espectro de RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) : Isomammeigina

U.N.A.M. Instituto de Quimica
 Dr. R. Reyes
 3AH2C51 en Acetona-d6
 BQG
 500 MHz



6.806
6.802
6.799
6.796
6.792

4.746
4.743
4.740
4.736
4.734
4.732
4.731
4.728
4.724

4.147
4.135
4.122

3.979
3.970
3.967
3.958
3.955
3.946

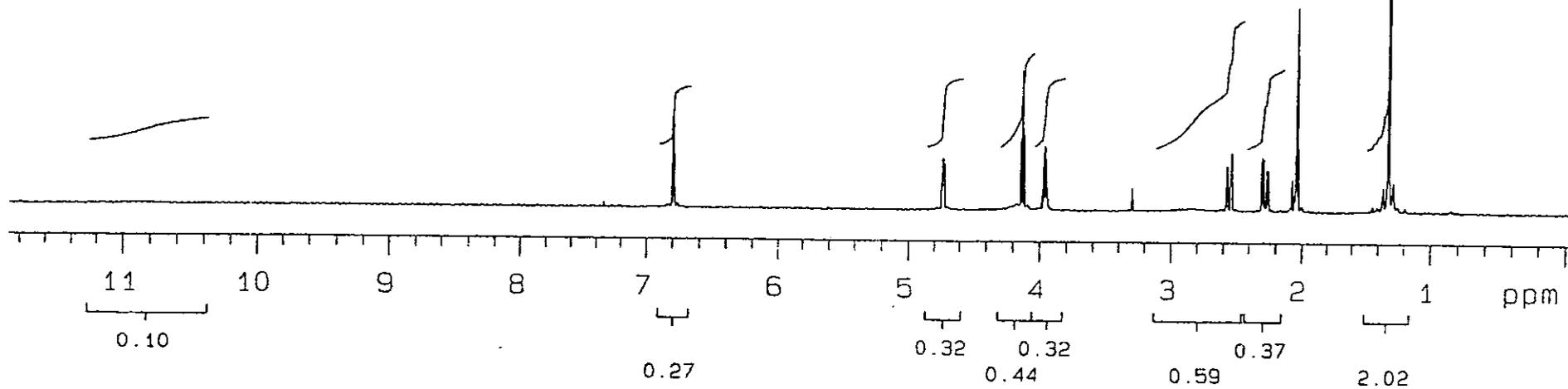
1.326
1.320

6.805 ppm

4.750 4.730 ppm

4.140 ppm

3.99 3.96 ppm



Espectro No. 7. Espectro de RMN¹H (500 MHz, Acetona/D6): Acetónido 3,4 del Ác. Shiquímico