



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**QUIMIOTIPOS DE *Calophyllum brasiliense*: DISTRIBUCIÓN  
GEOGRÁFICA EN MÉXICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
HIPOGLUCEMIANTE DEL ÁCIDO APETÁLICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I O L O G O**

**PRESENTA:**

**ALICIA FONSECA MUÑOZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO REYES CHILPA**

**ASESOR INTERNO: M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis Dr. Ricardo Reyes Chilpa por todas sus enseñanzas, sabios consejos, por su tiempo dedicado a este proyecto y sobre todo por su valiosa AMISTAD.

A mi familia que me han apoyado en cada proyecto de mi vida y que nada de lo anterior tendría valor sin el apoyo de mis padres y mis hermanos que fueron un estímulo a lo largo de mi carrera. En especial mi madre que siempre ha estado en todo momento de mi vida.

A mis más queridas amistades que ocupan un espacio muy especial en mi vida: Amor, Beatriz, Inti, Jazmín, Miryam, Romeo y Yazmín entre otros.

A los miembros del jurado: Dra. Alejandrina G. Ávila Ortiz, M. en C. Arturo E. Cano Flores, M. en C. A. Lourdes Castillo Granada y M. en C. Maria de Jesús Sánchez Colín. Por sus recomendaciones y apoyo en mi proyecto.

Al equipo de la Unidad de Investigación en Farmacología. “Hospital de Especialidades” Centro Médico Siglo XXI. IMSS. Dra. Maria Campos Lara y Dra. Marta Oropeza por su apoyo en la culminación de mi estudio y su tiempo dedicado al proyecto.

Al equipo del laboratorio 2-5 del Instituto de Química: Álvaro, Eduardo, Elizabeth, Estrella, Jaquelina y Maira. Por compartir su amistad y enseñanzas.

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN   | 2  |
| 2. ANTECEDENTES   | 4  |
| 2.1. El género <i>Calophyllum</i>   | 4  |
| 2.1.1 <i>Calophyllum brasiliense</i>  | 4  |
| 2.1.2. Quimiotipos de <i>C. brasiliense</i>   | 5  |
| 2.1.3. Actividad biológica de compuestos aislados   |    |
| de <i>C. brasiliense</i>  | 9  |
| 2.2. Diabetes mellitus  | 10 |
| 2.2.1 Tratamiento médico  | 11 |
| 2.3. Diabetes y Medicina Tradicional en México  | 13 |
| 2.3.1. Compuestos Aislados de plantas con efecto hipoglucemiante                              | 14 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA   | 16 |
| 4. HIPÓTESIS  | 17 |
| 5. OBJETIVOS  | 17 |
| 6.- MATERIAL Y METODOS  | 18 |
| 6.1 Distribución geográfica de los quimiotipos de <i>C. brasiliense</i>                       | 18 |
| 6.2 Preparación del extracto hexánico   | 22 |
| 6.3 Aislamiento e identificación del ácido apetalico  | 22 |
| 6.4 Efectos sobre los niveles de glucosa en ratas con diabetes inducidas con estreptozotocina | 23 |
| 6.4.1 Animales  | 23 |
| 6.4.2 Inducción de la diabetes  | 23 |
| 6.4.3 Tratamientos  | 24 |
| 6.4.4 Determinación de niveles de Glucosa   | 25 |
| 6.4.1 Análisis de Datos   | 25 |

|   |    |
|---|----|
| 7. RESULTADOS   | 26 |
| 7.1. Distribución geográfica<br>de los quimiotipos de <i>Calophyllum brasiliense</i>  | 26 |
| 7.1.2 Aislamiento e identificación del Ácido Apetálico  | 28 |
| 7.2. Efecto del extracto hexánico y el ácido apetálico<br>en ratas con diabetes experimental.   | 31 |
| 7.2.1. Efecto sobre el peso corporal y glucemia   | 31 |
| 7.3 Efecto del extracto hexánico de<br><i>Calophyllum brasiliense</i> en la glucemia  | 33 |
| 7.4. Efecto del ácido apetálico aislado de<br><i>Calophyllum brasiliense</i> sobre los niveles de glucosa   | 33 |
| 8. DISCUSIÓN  | 36 |
| 8.1 Distribución geográfica de <i>Calophyllum brasiliense</i>   | 36 |
| 8.2 Efecto del extracto hexánico y el ácido apetálico<br>aislados de <i>Calophyllum brasiliense</i> sobre los niveles de glucosa<br>en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina | 38 |
| 9. CONCLUSIONES   | 41 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA  | 42 |

## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día es patente la necesidad de contar con nuevos fármacos para el tratamiento de padecimientos como la diabetes. Entre las estrategias que se han seguido para lograr estos objetivos se han explorado los posibles efectos hipoglucemiantes de numerosos extractos y compuestos obtenidos de plantas utilizadas en la medicina tradicional. Sin embargo, entre el descubrimiento y la aplicación clínica de estos compuestos se requieren numerosos estudios entre los cuales destacan los de tipo farmacológico y toxicológico.

Entre las especies vegetales que se han utilizado como remedios herbolarios se puede mencionar a *Calophyllum brasiliense*, el cual es un árbol tropical que se distribuye desde México a Sudamérica. En la medicina tradicional se han utilizado las hojas de este árbol combinadas con *Coutarea hexandra* para el tratamiento de la diabetes (Greenard *et al.*, 1987; Mesia-Vela *et al.*, 2001). Su madera se ha utilizado para tratar enfermedades como diarreas y otros malestares gástricos (Vásquez, 1990; Sartori *et al.*, 1999); inflamación, diabetes, hipertensión (Duke *et al.*, 1994). En Brasil, este árbol se conoce como “Guanadi” y se utiliza para tratar el reumatismo, várices, hemorroides y úlceras crónicas (Correa, 1978; Guarim-Neto, 1987; Guimarez *et al.*, 1993).

La corteza de *Calophyllum brasiliense* secreta un látex amarillo que se conoce como “Bálsamo de María” y se utiliza para curar el ombligo a los recién nacidos (García-Barriga *et al.*, 1992). En el sureste de Veracruz, lo utilizan para aliviar el dolor de dientes y prevenir infecciones en heridas (Cottiglia *et al.*, 2004). De sus semillas se obtiene un aceite que algunas comunidades rurales utilizan con fines curativos en enfermedades cutáneas (Pennington y Sarukhan *et al.*, 1968). Por otro lado se ha observado que el extracto metanólico de *C. brasiliense* tiene actividad antimicrobiana sobre las bacterias gram positivas, lo cual coincide con el uso de esta planta para el tratamiento de infecciones (Pretto *et al.*, 2004). Emendörfer *en el* 2005 demostraron que el extracto metanólico de *Calophyllum brasiliense* inhibe la contracción inducida por acetilcolina en íleon de cobayo y en duodeno de rata, estos resultados concuerdan con la actividad antiespasmódica que se ha atribuido a esta especie.

## RESUMEN

Las plantas medicinales juegan un papel fundamental en el tratamiento de muchas enfermedades, entre las que destaca la diabetes mellitus (DM) que es una enfermedad metabólica, considerada como un problema de salud pública en nuestra sociedad, de ahí la necesidad de contar con nuevos fármacos para su tratamiento. En la medicina tradicional se han utilizado las hojas del árbol tropical *Calophyllum brasiliense* para el tratamiento de la diabetes. Estudios previos indican que existen dos variedades químicas de *Calophyllum brasiliense*: quimiotipo 1 (Q1) y quimiotipo 2 (Q2). Puesto que se desconoce la abundancia de ambos quimiotipos y no se han evaluado las propiedades medicas atribuidas a esta especie, los objetivos de esta tesis fueron: 1) conocer la distribución de ambos quimiotipos de *Calophyllum brasiliense* (Q1 y Q2) en México y 2) evaluar el posible efecto hipoglucemiante del extracto hexánico y el ácido apetalico aislados de las hojas de *C. brasiliense* Q2 en ratas macho con diabetes experimental.

Para cumplir con el primer objetivo, se prepararon los extractos hexánicos de 63 muestras de hojas de *Calophyllum brasiliense*, colectadas en varias localidades de la República Mexicana, y se analizaron por cromatografía de capa fina (CCF) para identificar el quimiotipo de cada muestra. Los resultados indicaron que el quimiotipo 1 se localiza principalmente en Veracruz, Guerrero y Oaxaca y el quimiotipo 2 fue localizado en Veracruz, Guerrero, Jalisco y Oaxaca. Se detectó la presencia de un nuevo patrón cromatográfico, pero se requiere un estudio fitoquímico formal para determinar si es un tercer



quimiotipo o una variante de los ya identificados previamente. El quimiotipo 2 fue el más abundante con 32 de las 63 muestras analizadas (51%), seguido por el quimiotipo 3 (36%) y el quimiotipo 1 (13%).

Para estudiar las propiedades medicinales atribuidas a la especie *Calophyllum brasiliense*, se preparó el extracto hexánico de hojas de Q2, se sometió a cromatografía en columna obteniendo el ácido apetalico, el cual fue identificado por RMNP, RMN13C, EM, IR, UV. El modelo experimental consistió en ratas macho con diabetes experimental inducida con estreptozotocina (60 mg/Kg, i.p.). Los animales seleccionados recibieron alguno de los siguientes tratamientos (i.p. 30, 100 o 300 mg/Kg): extracto hexánico, ácido apetalico, glibenclamida (10<sup>-5</sup> M, control positivo) o vehículo. Todas las dosis fueron ajustadas para administrarse en un volumen máximo de 0.2 mL. Se obtuvieron muestras de sangre de la vena cauda. La glibenclamida redujo en el nivel de glucosa a los niveles basales (130 mg/dL) a las 12 y 24 hrs en ratas con diabetes experimental, sin embargo, el extracto hexánico y el ácido apetalico no mostraron efecto hipoglucemiante en el modelo utilizado. Nuestros resultados indican que existe gran variabilidad química de la especie, y que el quimiotipo 2 no posee las propiedades antidiabéticas que se le atribuyen.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. El género *Calophyllum***

El género *Calophyllum* pertenece a la familia Clusiaceae (Guttiferae), y es el más importante desde el punto de vista farmacológico. Está constituido por 187 especies de árboles tropicales, la mayoría (179 especies) se encuentran en el viejo mundo, en especial en la zona Indo-Malasia, las Islas Madagascar y Fiji. Se estima que sólo 8 especies se distribuyen en el continente Americano, desde México hasta las Antillas y Centro América, Venezuela, Colombia, Perú, Bolivia, Brasil y las Guayanas. Las especies de este género se encuentran principalmente en selvas húmedas, tierras bajas y colinas; y ocasionalmente en bosque de montaña, solo algunas especies crecen en hábitats secos (Stevens *et al.*, 1980)

Estudios fitoquímicos previos del género *Calophyllum* han revelado que es una fuente rica en metabolitos secundarios como ésteres de ácidos grasos, saponinas, glucósidos cianogénicos, taninos, terpenoides, triterpenos, esteroides, xantonas, 4-alquil-coumarinas, 4-aril-coumarinas (neoflavonoides) y benzofenonas (Kashman *et al.*, 1992).

#### **2.1.1 *Calophyllum brasiliense***

*Calophyllum brasiliense* es un árbol caducifolio que mide de 20 a 30 m. y tiene un diámetro a la altura del pecho de 40 a 60 cm, algunos ejemplares alcanzan hasta 45 m de alto y 1.3 m de diámetro. Presenta copa redondeada, extensiva y densa.

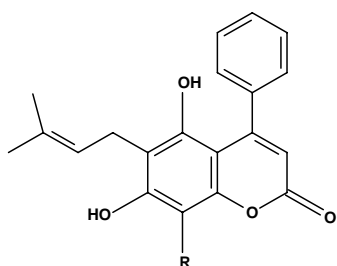
Las hojas son elípticas u oblongas, coriáceas, con el margen entero; el haz es verde oscuro y brillante, el envés es verde pálido y tiene venas secundarias numerosas. Presenta flores blancas y dioicas. El fruto se presenta en drupas de color verde amarillento. En México se distribuye en la vertiente del Golfo desde el sur de Veracruz hasta Quintana Roo y en la vertiente del Pacífico desde Nayarit hasta Chiapas. Crece en los remanentes de Selvas Altas y Medianas Perenne-folias y Subcaducifolias. Es una especie apreciada principalmente por su madera de gran calidad que se usa para hacer mástiles, costillas y armaduras de embarcaciones, así como para muebles finos, triplay, parquet, puentes, carrocerías, amazones, tejamanil, chapas, ebanistería, durmientes y decoración de interiores. (Pennington y Sarukhan *et al.*, 1968)

### **2.1.2. Quimiotipos de *Calophyllum brasiliense***

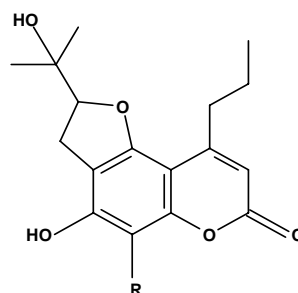
En un estudio realizado para identificar compuestos con actividad antiviral (anti-VIH-1) y antitumoral, se encontró que en México existen dos poblaciones de *C. brasiliense*, debido a su diferencia en cuanto a composición química de los extractos hexánicos de las hojas, los cuales fueron identificados Quimiotipo 1 (Q1) y Quimiotipo 2 (Q2) (Huerta *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2004).

**Quimiotipo 1.** Contiene principalmente coumarinas tipo mammea tales como: mammea A/ABA, A/BB, isomammeigina, mammea B/BA, B/BB, C/A, C/OB, B/BA, ciclo F y B/BB ciclo F (Figura 1). Estos compuestos se identificaron en ejemplares colectados en la sierra de Santa Martha, Volcán de San Martín, Pajapan, Veracruz (Reyes *et al.*, 2004).

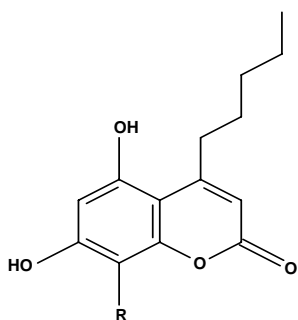
**Figura 1.** Componentes químicos aislados de *Calophyllum brasiliense* Q1



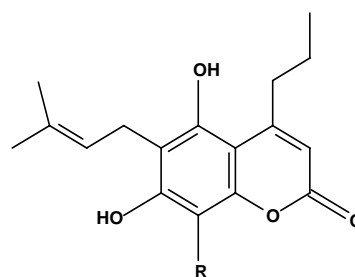
Mammea A/BA, R1  
Mammea A/BB, R2



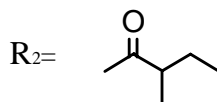
Mammea B/BA ciclo F, R1  
Mammea B/BB ciclo F, R2



Mammea C/OA, R1  
Mammea C/OB, R2



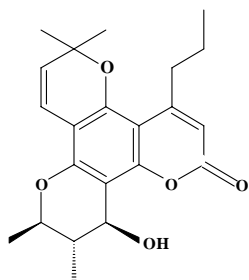
R<sub>1</sub>=  Mammea B/BA, R1  
Mammea B/BB, R2



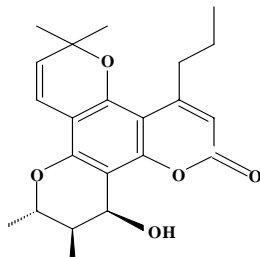
**Quimiotipo 2.** Contiene como componente mayoritario la cromanona ácido apetalico, seguido del ácido isoapetalico. Otros constituyentes minoritarios son dipiranocumarinas tetracíclicas: (+)-calanólido A, (-)-calanólido B, (+)-

calanólido C y soulatrólido (Figura 2). Este quimiotipo se identificó en ejemplares colectados en la Reserva de Biología Tropical (UNAM), en “Los Tuxtlas”, Veracruz (Huerta *et al.*, 2004).

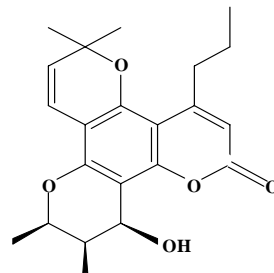
**Figura 2.** Componentes químicos aislados de *Calophyllum brasiliense* Q2.



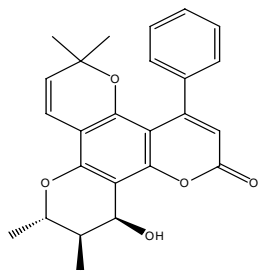
(+)- Calanólido A



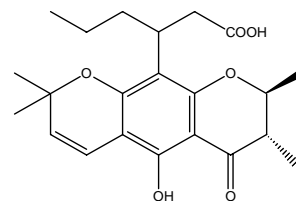
(-)- Calanólido B



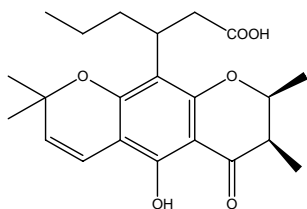
(+)- Calanólido C



Sulatrólido



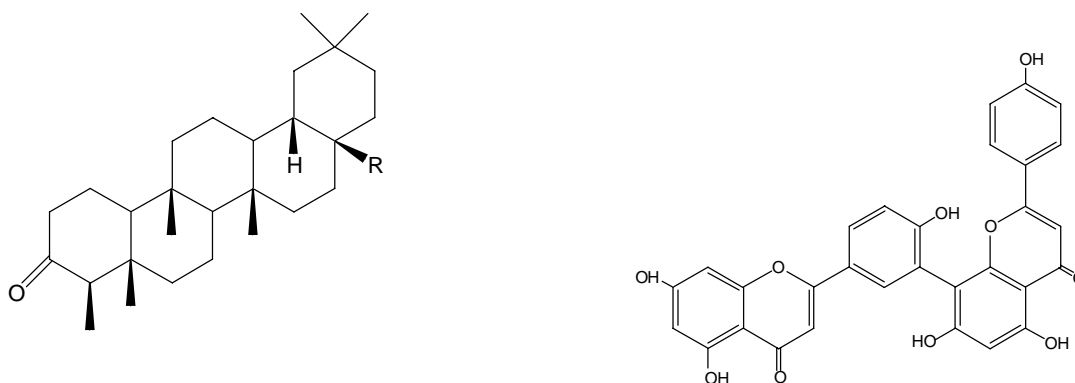
Ácido isoapetálico



Ácido apetálico

Cabe destacar que existen compuestos comunes a ambos quimiotipos, que destacan por su abundancia, estos son: friedelina, el canofilol (triterpenos) y la amentoflavona (biflavonoide).

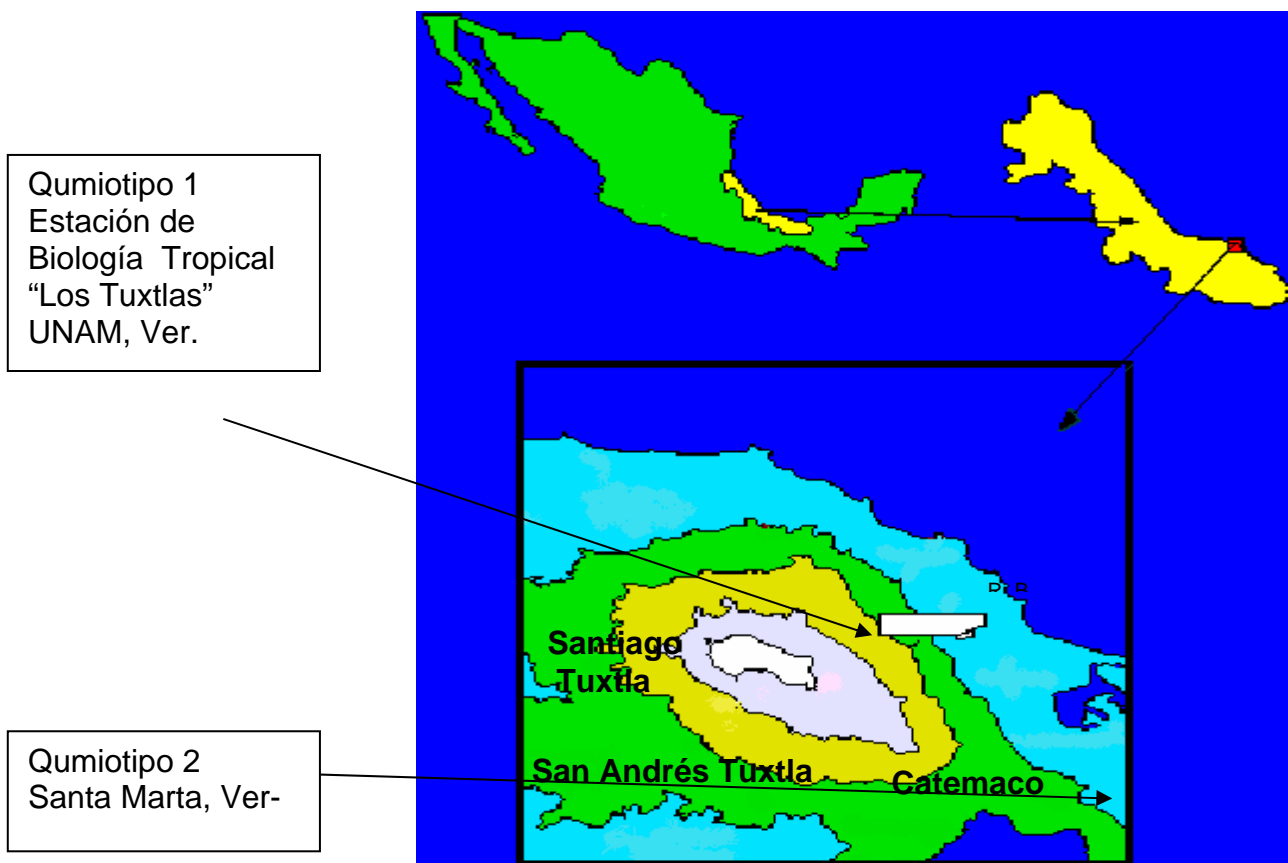
**Figura 3.** Componentes químicos comunes a los quimiotipos 1 y 2 de *Calophyllum brasiliense*. Friedelina, R= Me, Canofilol, R = CH<sub>2</sub>OH.



a) Friedelina, R= Me, Canofilol, R = CH<sub>2</sub>OH

b) Amentoflavona

**Fig. 4.** Localización de los lugares de colecta original.



### **2.1.3. Actividad biológica de los compuestos aislados de *C. brasiliense***

Ninguna de las coumarinas tipo Mammea aisladas del quimiotipo 1 presentó actividad anti-VIH-1, pero si mostraron citotoxicidad contra las líneas celulares tumorales humanas (Reyes *et al.*, 2004). Por el contrario, las coumarinas tetracíclicas aisladas del quimiotipo 2 (calanolidos A, B y C) presentaron actividad antiviral contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, su modo de acción es la inhibición de la enzima transcriptasa reversa del VIH tipo (Huerta, *et al.*, 2004). Cabe señalar que estos compuestos habían sido previamente aislado de las hojas de *Calophyllum lanigerum* colectado en Malasia e informado como un inhibidor de la enzima transcriptasa reversa del VIH-1 (Kashman *et al.*, 1992). Actualmente el (+)-Calanolido A, se encuentra en las últimas fases de evaluación clínica por el Instituto Nacional del Cáncer de los E.U.A., por lo que podría incorporarse próximamente a los fármacos usados clínicamente en el tratamiento del SIDA. Otros constituyentes del extracto hexánico de las hojas de *C. brasiliense* Quimiotipo 2, son el ácido apetalico, isoapetalico, friedelina, canofilol y amentoflavona. Estos compuestos fueron inactivos o mostraron baja actividad antiviral (VIH-1) y contra la enzima transcriptasa reversa de este virus (Reyes *et al.*, 2004; Huerta *et al.*, 2004).

Por otra parte, el ácido apetalico presentó actividad contra los hongos fitopatogenos *Curvularia lunata var.* y *Rhizoctonia repens* (Aguilar 2005), así como contra *Aspergillus fumigatus* (Hay *et al.*, 2003). El ácido apetalico también posee actividad antibacterial (Cottiglia *et al.*, 2004). El ester metílico y el 5-O-acetato de ácido apetalico, y el ester metílico del ácido isoapetalico han mostrado efectos anticancerígenos contra las líneas tumorales KB y Hela.

La friedelina tiene actividad citotóxica contra las líneas celulares tumorales K562, PC3, U251 (Reyes *et al.*, 2004), HEP 62, A-431 (Setzer, *et al.*, 2002); sin embargo no inhibió el crecimiento de la línea PC-12 . Por otra parte presentó actividad antiinflamatoria (Geissberger *et al.*, 1991) y antinociceptiva (Isaías *et al.*, 2004), pero no actividad antiulcera (Quiroga *et al.*, 2000).

El canofilol es un inductor de citocinas (Nakagawa *et al.*, 2004) e inhibe la elastasa de leucocitos humanos (Mitaine *et al.*, 2002), pero no presentó actividad como gastroprotector (Navarrete *et al.*, 2002).

## **2.2 Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es una alteración metabólica causada por deficiencia en la secreción pancreática de insulina y/o por una respuesta metabólica deficiente de los tejidos a esta hormona, con las consecuentes alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Esto determina la elevación crónica de los niveles de glucosa sanguínea o hiperglucemia, que es el dato determinante de la enfermedad (Foster *et al.*, 1994) (García-Barriga *et al.*, 1992). De manera muy general se puede decir que hay tres tipos de diabetes:

- 1) Diabetes tipo 1 o insulino dependiente (DMID) generalmente se diagnostica en la infancia. Se presenta cuando se han destruido las células  $\beta$  del páncreas y en consecuencia no hay producción de insulina.

- 2) Diabetes tipo 2 o no-insulino dependiente (DMNID): es más común que el



tipo 1, a esta corresponde aproximadamente el 90% de los casos de diabetes, generalmente se presenta en la edad adulta. Estos pacientes muestran anomalías en la secreción de insulina y/o en la resistencia a la acción de insulina en los tejidos blanco. En este caso, al inicio de la enfermedad los niveles de glucosa pueden permanecer normales y por eso los pacientes pueden ignorar su condición diabética.

- 3) Diabetes gestacional: consiste en la presencia de altos niveles de glucosa en la sangre que se desarrolla en cualquier momento del embarazo en una persona que no tiene diabetes.<sup>1</sup>

### **2.2.1 Tratamiento médico de la diabetes**

El tratamiento de la diabetes mellitus consta básicamente de: dieta, ejercicio físico, tratamiento farmacológico y educación diabetológica. La alimentación tiene una importancia clave en el control y tratamiento de la DM y esto justifica un abordaje específico para cada paciente. El plan dietético debe orientarse a mantener los niveles de glucosa dentro de la normalidad, evitar el desequilibrio que puede producirse como consecuencia del ayuno prolongado y coordinar la ingesta alimenticia con los efectos del ejercicio físico y de los fármacos hipoglucemiantes.

La dieta del paciente diabético con peso normal debe ser acorde con sus necesidades energéticas. Del 55 al 60% de contenido calórico total debe

---

1) <sup>1</sup> <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000896.htm>

provenir de los carbohidratos, el aporte de grasas debe representar como máximo

el 30%, y el de proteínas el 15-20% de las calorías diarias (Salvador *et al.*, 2002)

La práctica regular de ejercicio físico contribuye en forma significativa a mejorar los niveles de glucosa, ya que aumenta la sensibilidad a la insulina, el perfil lipídico y el estado circulatorio

Los agentes hipoglucemiantes orales son fármacos que producen una disminución de los niveles de glucosa en pacientes diabéticos tipo 2, se utilizan cuando el manejo con dieta y ejercicio no es suficiente para alcanzar un buen control metabólico. Los hipoglucemiantes orales pertenecen a alguno de los siguientes grupos: sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas y tiazolidinedionas.

Las sulfonilureas estimulan la secreción de insulina por parte del páncreas. Esta familia de drogas puede ser subdividida de acuerdo a su vida media en tres gru-pos: duración corta (Glibenclamida, Tolbutamida, Glipizidae, Gliquidona y Glicicla-mida), duración intermedia (Glicazida, Acetohexamida y Glibormurida) y duración prolongada (Cloropropamida). Las sulfonilureas estimulan la liberación de insulina por su acción sobre las células  $\beta$  del páncreas. Estos fármacos interactúan con los canales de potasio sensibles a ATP aumentando el tiempo que permanecen abier-tos o evitando que se cierren, así se presenta una mayor entrada de calcio extra-celular que induce la liberación de insulina hacia el torrente sanguíneo. Por este mismo mecanismo las sulfonilureas pueden tener efectos extrapancreáticos como un aumento de los receptores de insulina en monocitos, eritrocitos y adipocitos, y en el número

de transportadores para dicha hormona, la inhibición de la gluconeogénesis hepática y el aumento en el tono del músculo liso.

Las biguanidas incluyen la fenformina, buformina y metformina. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la gluconeogénesis hepática y el incremento de la glucólisis anaeróbica, con la consiguiente elevación de alanina, glicerol y ácido láctico. Otro mecanismo implicado es la disminución de la absorción intestinal de glucosa <sup>2</sup>.

Las  $\alpha$ -glucosidasas incluyen al miglitol y a la acarbosa. Su mecanismo de acción es la inhibición reversible y competitiva de las  $\alpha$ -glucosidasas en el borde en cepillo de la mucosa intestinal, produciendo el retraso en la absorción de los hidratos de carbono complejos, con la consiguiente reducción de la glucemia postprandial. .

Dentro del grupo de las tiazolidinedionas se encuentran la pioglitazona y la ciglitazona. Estas reducen los niveles de glucosa incrementando la sensibilidad hepática y periférica a la acción de la insulina.

### **2.3 Diabetes y medicina tradicional en México**

El uso de las plantas en la medicina tradicional en México tiene una larga tradición, cerca del 62% de una muestra de 573 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 utilizan terapias complementarias para el tratamiento de su enfermedad, y el 94% de estos pacientes utilizan preferentemente remedios herbolarios. En México tenemos documentadas 306 especies, 235 géneros y 93 familias que se han usado como agentes hipoglucemiantes. Las familias más utilizadas son: Asteraceae (47 especies), Fabaceae (27 sp), Cactaceae (16 sp), Solanaceae

---

<sup>2</sup> <http://www.diabetes.org/espanol/diabetes-tipo-2/medicamentos-via-oral.jsp>

y Euphorbiaceae (10 sp) y Laminaceae (9 sp), (Andrade *et al.*, 2005).

A pesar de que son numerosas las especies a las que se atribuyen acciones antidiabéticas, solo algunas han sido objeto de estudios científicos y clínicos adecuados que demuestren dicha actividad. Entre los estudios realizados se han aislado compuestos de especies de las que se ha demostrado un efecto hipoglucemiante. No obstante, en muchos casos se desconoce el mecanismo de acción, sus posibles efectos tóxicos, su interacción con fármacos sintéticos, etc. Todos estos conocimientos son necesarios para que estos compuestos herbolarios se desarrollaran en productos farmacéuticos .

### **2.3.1. Compuestos aislados de plantas con efecto hipoglucemiante**

De acuerdo (Marles-Farnsworth *et al.*,1994) se conocen 582 especies vegetales que han sido usadas en la medicina tradicional para tratar síntomas de la diabetes mellitas. Adicionalmente 541 especies sin antecedentes etnobotánicos que indiquen su uso como antidiabéticos, se han estudiado experimentalmente. En conjunto ambos grupos de plantas equivalen a 1123 especies distribuidas en 725 géneros de 183 familias, abarcando desde las algas marinas hasta las compuestas. Las familias de plantas que mas frecuentemente son citadas por su actividad antidiabética son las Fabaceae, Asteraceae, Lamiaceae con 127, 98 y 36 especies.

El 81% de 293 especies con antecedentes etnobotánicos, mostraron algún tipo de actividad antidiabética en estudios experimentales; mientras que 67% de 541 plantas sin antecedentes etnobotánicos dieron resultados positivos (antidiabéticos). Esto sugiere que efectivamente los informes etnobotánicos

pueden ser una guía eficaz para la investigación de posible actividad hipoglucemiante. En efecto, con base en evidencias experimentales, se estima que 88 (16%) de las plantas que se usan tradicionalmente como antidiabéticas, así como para 62 (11%) de las plantas sin antecedentes etnobotánicos pueden contener constituyentes hipoglucemiantes.

Se han aislado más de 200 compuestos puros de origen vegetal con actividad hipoglucemiante. La tabla 1, muestra las clases químicas a las que pertenecen dichos compuestos. (Marles-Farnsworth *et al.*, 1994).

**Tabla 1.** Productos Naturales hipoglucemiantes (Marles- Farnsworth *et al.*, 1994)

| Clase Química            | No. Activos | Clase Química         | No. Activos |
|--------------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| Alcaloides               | 38          | Péptidos y Aminas     | 15          |
| Carbohidratos            | 66          | Fenoles simples       | 4           |
| Cumarinas                | 4           | Fenilpropanoides      | 1           |
| Gloicosidos cianogénicos | 1           | Esteroides            | 7           |
| Flavonoides              | 7           | Estibenos             | 1           |
| Glicopéptidos            | 20          | Compuestos sulfurados | 2           |
| Sales inorgánicas        | 3           | Terpenoides           | 17          |
| Iridoides                | 4           | Vitaminas             | 2           |
| Lípidos                  | 6           | Xantonas              | 2           |

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Calophyllum brasiliense* se distribuye en México, en la vertiente del Golfo desde el Sur de Veracruz hasta Quintana Roo y en la vertiente del Pacífico desde Nayarit hasta Chiapas. Se han descrito dos quimiotipos de esta especie que difieren en la composición química del extracto hexánico de sus hojas; sin embargo, se desconoce la distribución geográfica de estos dos quimiotipos. El conocimiento de la distribución geográfica de los quimiotipos 1 y 2 de *Calophyllum brasiliense* en nuestro país sería de gran importancia para su preservación y contribuiría a profundizar los conocimientos de esta especie que es utilizada en la medicina tradicional herbolaria. Por otra parte, se sabe que las hojas de *Calophyllum brasiliense* en combinación con *Coutarea hexandra* se usan en la medicina tradicional de Guyana para tratar la diabetes. Sin embargo, no se ha explorado su posible efecto hipoglucemiante. (Greenard *et al.*, 1987). Por lo anterior, el presente estudio pretende conocer la distribución geográfica de los dos quimiotipos conocidos de *Calophyllum brasiliense* en México y determinar si el extracto hexánico de sus hojas tiene acción hipoglucemiante en un modelo experimental de diabetes.

#### **4. HIPOTESIS**

En México los quimiotipos 1 y 2 de *Calophyllum brasiliense* deben distribuirse en regiones geográficas diferentes, puesto que su composición química deber reflejar adaptaciones al medio ambiente.

El extracto hexánico de las hojas *Calophyllum brasiliense*, quimiotipo 2 y su derivado, ácido apetalico tienen efecto hipoglucemiante en ratas con diabetes experimental inducida con estreptozotocina.

## 5. OBJETIVOS

- 5.1. Determinar la distribución geográfica de los quimiotipos 1 y 2 de *Calophyllum brasiliense*.
- 5.2. Obtener el extracto hexánico y aislar el ácido apetalico de las hojas de *C. brasiliense*, quimiotipo 2.
- 5.3. Investigar si el extracto hexánico y el ácido apetalico aislado de hojas de *Calophyllum brasiliense*, quimiotipo 2 tienen efecto hipoglucemiante en ratas con diabetes experimental inducida por estreptozotocina.



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Distribución geográfica de los quimiotipos de *Calophyllum brasiliense*

Para conocer la distribución de los quimiotipos de *Calophyllum brasiliense* se analizaron tres grupos de muestras. El primer grupo fueron 45 muestras proporcionadas por el Dr. Mario Souza, curador del Herbario Nacional de México (MEXU); el segundo grupo fueron 10 muestras proporcionadas por el Biol. Esteban Martínez del Herbario Nacional, que fueron colectadas en la Selva Lacandona (junio de 2003) y en el estado de Guerrero (febrero y abril de 1986); el tercer grupo (8 muestras) fueron colectadas por el Dr. Ricardo Reyes en el Estado de Veracruz (Ejido Benigno Mendoza, Santa Martha y Los Tuxtles) en septiembre de 1999. Los datos de colecta de los tres grupos de muestras de *Calophyllum brasiliense* aparecen en las Tablas 2, 3 y 4.

Los quimiotipos se determinaron por análisis cromatografía en capa fina de las hojas de cada muestra. Se realizó una extracción utilizando fragmentos de hoja de 1 cm<sup>2</sup> que se colocaron en frascos ámbar con hexano a temperatura ambiente, durante 48 horas. La cromatografía se realizó en cromatofolios de sílica gel de 0.25 mm de espesor. Las muestras fueron eluidas con hexano:acetato de etilo (8:2) y fueron reveladas con luz UV y con una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N. Las muestras fueron comparadas con patrones de los Quimiotipos 1 y 2, obtenidos previamente en el Instituto de Química de la UNAM a partir de colectas analizadas fitoquímicamente (Reyes *et al*, 2004; Huerta *et al*, 2004). Se determinó como quimiotipo 1 a las muestras que revelaron la presencia de coumarinas tipo mammea, principalmente

mammea A/BA y A/BB. Se determinó como quimiotipo 2 a las que presentaron cromononas, principalmente ácido apetélico y el ácido isoapetélico (Figura 4). Una vez identificado el quimiotipo de cada muestra, se señaló su localización de colecta en un mapa de la República Mexicana.

**Tabla 2.** Muestras de *Calophyllum brasiliense* proporcionadas por el MEXU.

| Clave | Registro MEXU | Estado    | Municipio          | Fecha     | Quimiotipo |
|-------|---------------|-----------|--------------------|-----------|------------|
| 1     | 59382         | Oaxaca    | Tuxtepec           | 19/09/47  | 3          |
| 2     | 94995         | Veracruz  | Coatzacoalcos      | Jul-62    | 3          |
| 3     | 149642        | Guerrero  | Acapulco           | 03-Feb-71 | 2          |
| 4     | 168416        | Veracruz  | Catemaco           | 04-Mar-75 | 2          |
| 5     | 171333        | Oaxaca    | Pluma Hidalgo      | 22-Nov-77 | 2          |
| 6     | 199144        | Jalisco   | El Tuito           | 20-Sep-76 | 2          |
| 7     | 223241        | Jalisco   | El Tuito           | 24-Nov-76 | 2          |
| 8     | 232775        | Veracruz  | Sta. Ma. Soteapan  | 02-Ene-72 | 3          |
| 9     | 260826        | Veracruz  | Coatzacoalcos      | 26-Oct-73 | 3          |
| 10    | 267853        | Tabasco   | **                 | 08-Dic-75 | 3          |
| 11    | 394409        | Veracruz  | San Andres Tuxtla  | 29-Oct-83 | 2          |
| 12    | 396815        | Veracruz  | Veracruz           | 22-Oct-81 | 3          |
| 13    | 402200        | Veracruz  | San Andres Tuxtla  | 30-Mar-84 | 2          |
| 14    | 402201        | Veracruz  | San Andres Tuxtla  | 13-Jun-84 | 2          |
| 15    | 403521        | Veracruz  | San Andres Tuxtla  | 30-Mar-84 | 2          |
| 16    | 412833        | Oaxaca    | Juquila            | 19-Mar-83 | 2          |
| 17    | 425484        | Oaxaca    | Sta. Ma. Chimalapa | 23-Feb-82 | 3          |
| 18    | 426320        | Oaxaca    | Jamiltepec         | 22-Oct-82 | 2          |
| 19    | 449190        | Jalisco   | Tlapa de Allende   | **        | 2          |
| 20    | 464585        | Nicaragua | **                 | 19-Mar-84 | 3          |
| 21    | 486220        | Oaxaca    | Sta. Ma. Chimalapa | 29-Sep-84 | 2          |
| 22    | 486605        | Veracruz  | Hidalgotitlan      | 11-Mar-82 | 1          |
| 23    | 501894        | Oaxaca    | Sta. Ma O          | 21-Ene-88 | 3          |
| 24    | 520955        | Veracruz  | Catemaco           | 22-Ene-85 | 3          |
| 25    | 521387        | Veracruz  | Catemaco           | 25-Jun-84 | 2          |
| 26    | 521522        | Guerrero  | Atoyac de Alvarez  | 05-Jun-83 | 1          |

|    |        |           |                    |           |   |
|----|--------|-----------|--------------------|-----------|---|
| 27 | 530255 | Oaxaca    | Tehuantepec        | 06-May-91 | 2 |
| 28 | 541291 | Jalisco   | El Tuito           | 26-Dic-76 | 2 |
| 29 | 606437 | Oaxaca    | Sta. Ma. Chimalapa | 27-Feb-86 | 1 |
| 30 | 606490 | Oaxaca    | Sto. Domingo       | 19-Nov-85 | 3 |
| 31 | 608084 | Oaxaca    | Sta. Ma. Chimalapa | 07-Dic-85 | 3 |
| 32 | 612099 | Jalisco   | Cuautitlán         | 26-Jul-88 | 3 |
| 33 | 681964 | Veracruz  | Catemaco           | 25-Jul-84 | 2 |
| 34 | 696212 | Veracruz  | San Andres Tuxtla  | 18-Nov-83 | 2 |
| 35 | 699118 | Veracruz  | San Andres Tuxtla  | 22-Jul-83 | 2 |
| 36 | 739269 | Jalisco   | Casimiro Castillo  | 03-Ago-83 | 3 |
| 37 | 742489 | Jalisco   | El Tuito           | 25-Feb-79 | 2 |
| 38 | 744044 | Jalisco   | Casimiro Castillo  | 03-Ago-93 | 3 |
| 39 | 748867 | Guerrero  | Atoyac de Alvarez  | 13-Dic-85 | 2 |
| 40 | 748904 | Tabasco   | **                 | 09-Ago-71 | 2 |
| 41 | 750875 | Veracruz  | **                 | **        | 2 |
| 42 | 756689 | Michoacan | Aquila             | 08-Dic-79 | 2 |
| 43 | 766535 | Veracruz  | Catemaco           | 30-Oct-84 | 2 |
| 44 | 780152 | Michoacan | Aquila             | 01-Mar-80 | 2 |
| 45 | 877342 | Michoacan | Aquila             | 04-Dic-79 | 2 |

\*\*Datos faltantes de las fichas de registro.

**Tabla 3.** Muestras proporcionadas por el Biól. Esteban Martínez .

| CLAVE | No de colecta | Localidad en el Estado de Chiapas                 | Fecha    | Quimiotipo |
|-------|---------------|---|----------|------------|
| I     | 25198-1       | Mun. Ocosingo a 2 Km al NO del crucero San Javier | 21/06/03 | 3          |

|      |          |  |          |   |
|------|----------|--|----------|---|
| II   | 25198-2  | Mun. Ocosingo a 2 Km al NO del cruceo San Javier                   | 21/06/03 | 3 |
| III  | 7186-3   | Mun. Ocosingo a 2.04 Km al NO del cruceo San Javier                | 21/06/03 | 3 |
| IV   | 7180-4   | Mun. Ocosingo a 2.04 Km al NO del cruceo San Javier                | 21/06/03 | 3 |
| V    | 7180-5   | Mun. Ocosingo a 2.04 Km al NO del cruceo San Javier                | 21/06/03 | 3 |
| VI   | 9083-6   | Mun. Ocosingo a 1.98 Km al NE del cruceo San Javier                | 22/06/03 | 3 |
| VII  | 25208-7  | Mun. Ocosingo a 2 Km al NO del cruceo San Javier                   | 22/06/03 | 3 |
| VIII | 25208-8  | Mun. Ocosingo a 2 Km al NO del cruceo San Javier                   | 22/06/03 | 3 |
| IX   | 12461-9  | Mun. Azueta.Loc.En san Antonia a 9 Km al NE de<br>Vallcito de Zar. | 17/04/86 | 2 |
| X    | 12254-10 | Mun. Petatlán Loc. 2 Km al NE de la Guayabera.                     | 05/02/86 | 2 |

**Tabla 4.** Muestra colectadas por el Dr. Ricardo Reyes en el estado de Veracruz

| CLAVE | No de Muestra | Localidad            | Fecha     | Quimiotipo |
|-------|---------------|----------------------|-----------|------------|
| A     | SMII          | Sta Martha           | 09-Sep-99 | 1          |
| B     | SMI2          | Ejido Benigno Méndez | 09-Sep-99 | 1          |
| C     | SM13          | Ejido Benigno Méndez | 09-Sep-99 | 1          |
| D     | SM14          | Sta Martha           | 09-Sep-99 | 1          |
| E     | LT11          | Tuxtlas              | 10-Sep-99 | 1          |
| F     | LT12          | Tuxtlas              | 10-Sep-99 | 2          |
| G     | LT13          | Tuxtlas              | 10-Sep-99 | 2          |
| H     | LT14          | Tuxtlas              | 10-Sep-99 | 2          |

## 6.2. Preparación del extracto hexánico de *Calophyllum brasiliense* Q2

Se utilizaron hojas de *C. brasiliense* colectadas en el río Chumiapan y la laguna de Sotecomapan, Municipio de Los Tuxtlas, Veracruz en septiembre de 1999, que se indentificaron por cromatografía capa fina como quimiotipo 2 (Q2). Los

ejemplares se identificaron en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social, un ejemplar quedó depositado e identificado con el número 14425.

El extracto se preparó utilizando 140 g de hojas secas y maceradas de *C. brasiliense* Q2. El material vegetal se colocó en el matraz y se agregó 1 L de hexano. La extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente en matraz de vidrio de 1 L forrado con papel aluminio. Cada 24 h se concentró y destiló el extracto, este proceso se repitió consecutivamente hasta agotar la extracción, se requirió un total de 10 extracciones. El extracto se concentró en un rotavapor y se colocó en un frasco ámbar etiquetado y tarado.

### **6.3. Aislamiento e identificación del Ácido apetalico**

El sobrenadante del extracto hexánico se concentró en un rotavapor y se obtuvieron 35.69 g de una resina de color verde ámbar. Una parte de este material se pre-absorbió en celita y se separó en sus constituyentes químicos con cromatografía fase normal, en gel de sílice 70-230 (Merck, 300g), eluida con hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones de polaridad creciente. Se obtuvieron 182 fracciones de 200 mL que fueron analizadas por Cromatografía Capa Fina (CCF) y reunidas con base en su similitud. Las fracciones 40-43 eluidas con hexano:acetato de etilo (9:1) presentaron una sola mancha en CCF fase normal. Se obtuvieron 10.04 g de esta sustancia aceitosa de color ámbar que se identificó por espectroscopia (IR, RMNP) como ácido apetalico con trazas de ácido isoapetalico.

### **6.4. Efectos sobre los niveles de glucosa de ratas con diabetes inducida con estreptozotocina**

#### **6.4.1. Animales**

Se utilizaron ratas macho, adultos de la cepa Sprague-Dawley, de 250 a 300 g de peso corporal que se mantuvieron en grupos de 3 animales, con libre acceso a agua y alimento y en condiciones controladas de temperatura (22 °C) e iluminación (12:12 h luz:oscuridad).

#### **6.4.2. Inducción de la diabetes**

La diabetes se indujo con estreptozotocina que se disolvió en buffer de citratos 0.1M, pH 4.5. Los animales se pesaron y se determinaron sus niveles de glucosa en sangre. Para esto se tomó una gota de sangre de la vena caudal que se colocó en un glucómetro portátil Medisense, Optium (laboratorios Abbott) y a continuación recibieron una dosis intraperitoneal de 60 mg/Kg de estreptozotocina recién disuelta. Después de la inyección, durante la noche del mismo día se sustituyó el agua de los animales por agua glucosada el 5% para evitar la hipoglucemia inducida por el tratamiento con estreptozotocina.

A los 14 días de la inducción de la diabetes se pesaron los animales y se midieron nuevamente sus niveles de glucosa. Aquellos animales con hiperglucemia, es decir, niveles superiores a 200 mg/dL, se incluyeron en el estudio y se asignaron al azar a alguno de los tratamientos experimentales. La glucosa determinada antes del tratamiento se consideró como tiempo cero ( $t_0$ ). Los animales permanecieron en ayuno desde la noche anterior y durante las 24 h en que se determinaron los niveles de glucosa.

### 6.4.3. Tratamientos

Los tratamientos administrados a los animales fueron los siguientes:

- I. Aceite de maíz, volumen de acuerdo al peso (control negativo)
- II. Extracto hexánico, 30 mg/Kg
- III. Extracto hexánico, 100 mg/Kg
- IV. Extracto hexánico, 300 mg/Kg
- V. Ácido apetalico, 10 mg/Kg
- VI. Ácido apetalico, 30 mg/Kg
- VII. Ácido apetalico, 100 mg/Kg
- VIII. Glibenclamida, 600 µg/Kg (control positivo)

El extracto hexánico de *Calophyllum brasiliense* se disolvió en un volumen mínimo de diclorometano y se agregó el aceite de maíz necesario para tener las concentraciones señaladas en un volumen total de 0.25 a 0.3 mL por rata, a continuación se evaporó el diclorometano y el extracto en aceite se administró por

vía intraperitoneal (i.p.) El ácido apetalico se disolvió en un volumen equivalente

de agua carbonatada el 5% y también se administró por vía i.p. Al grupo I, control negativo se le administró el volumen equivalente por peso corporal de aceite de maíz. Al grupo VIII se le administró glibenclamida que disuelta en un volumen equivalente de agua inyectable. Esta droga se seleccionó porque es un hipoglucemiante ampliamente utilizado en el tratamiento de la diabetes.

#### **6.4.4. Determinación de los niveles de glucosa**

Los niveles de glucosa se determinaron como se mencionó anteriormente, en gotas de sangre que se obtuvieron de la vena caudal en tiempos después del tratamiento, 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h.

#### **6.4.5. Análisis de los resultados**

El peso de los animales antes de la inducción de la diabetes (inicial) y previo al tratamiento experimental (final) y los niveles de glucosa (basal, antes de inducir la diabetes e inicial,  $t_0$ ) se reportan como promedio de 3 animales  $\pm$  error estándar de la media. Ambas variables se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y de haber diferencia entre los grupos se realiza una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para conocer los grupos que tienen diferencias entre sí. Una  $P < 0.05$  se consideró significativa.





## 7. RESULTADOS

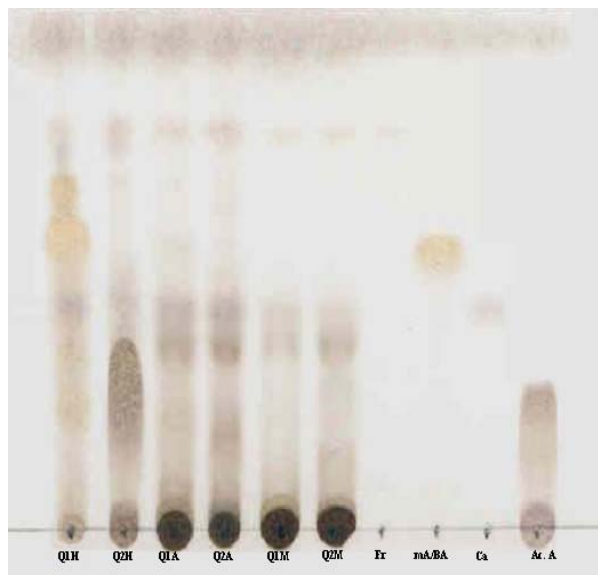
### 7.1 Distribución geográfica de los quimiotipos de *Calophyllum brasiliense*

En la figura 6 se muestra el mapa donde se señala la distribución geográfica de los quimiotipos encontrados. Con base a dicha figura y a las tablas (2,3 y 4) se puede observar que el quimiotipo 1 se encuentra básicamente restringido a la zona sur del Estado de Veracruz, que comprende la Sierra de Santa Martha y se extiende a la zona de los Chimalapas en el estado de Oaxaca. Sin embargo un ejemplar se encuentran en Guerrero (Atoyac). El 13% de las muestras correspondieron al quimiotipo 1, por lo cual este quimiotipo es un tanto escaso y posiblemente endémico.

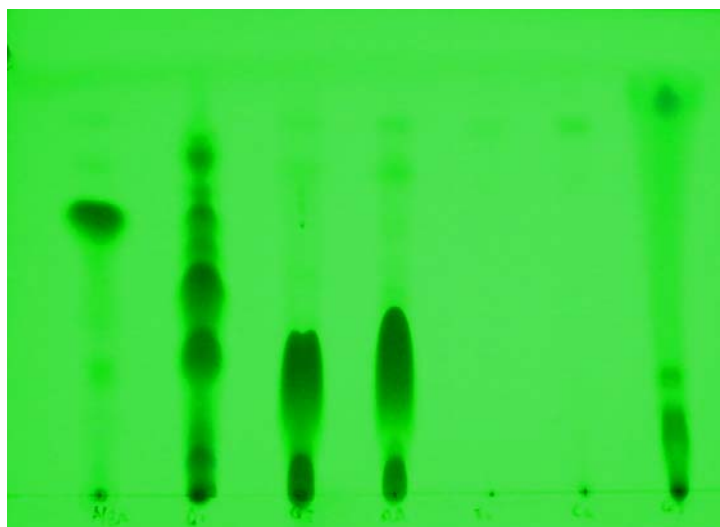
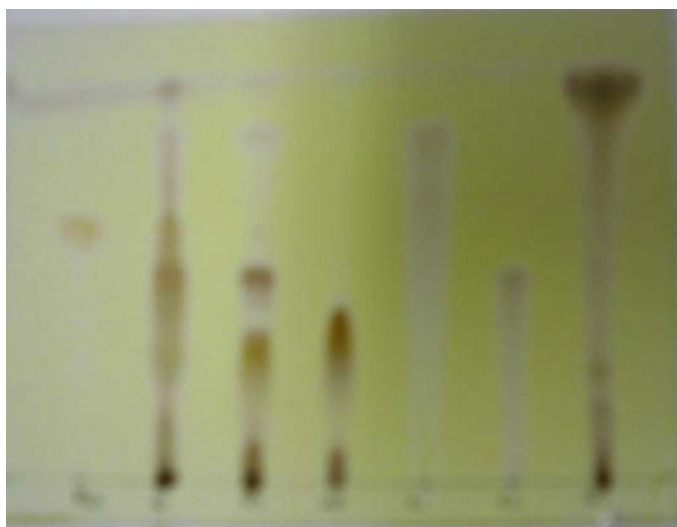
En el caso del quimiotipo 2, presenta una amplia distribución en ambas vertientes, tanto del Pacífico (Guerrero, Jalisco, Michoacán), como del Atlántico (Tabasco y Veracruz). El 51% de las muestras analizadas corresponden al quimiotipo 2, por lo tanto se puede afirmar es el mas abundante.

El análisis cromatográfico de las muestras reveló la presencia de un tercer quimiotipo que tiene un perfil cromatográfico diferente del de los dos ya descritos. (Figuras 4 y 5) Este fue denominado como quimiotipo 3 y se encontró primordialmente en los estados de Veracruz, Chiapas y Oaxaca. El 36% de las muestras correspondieron a este quimiotipo.

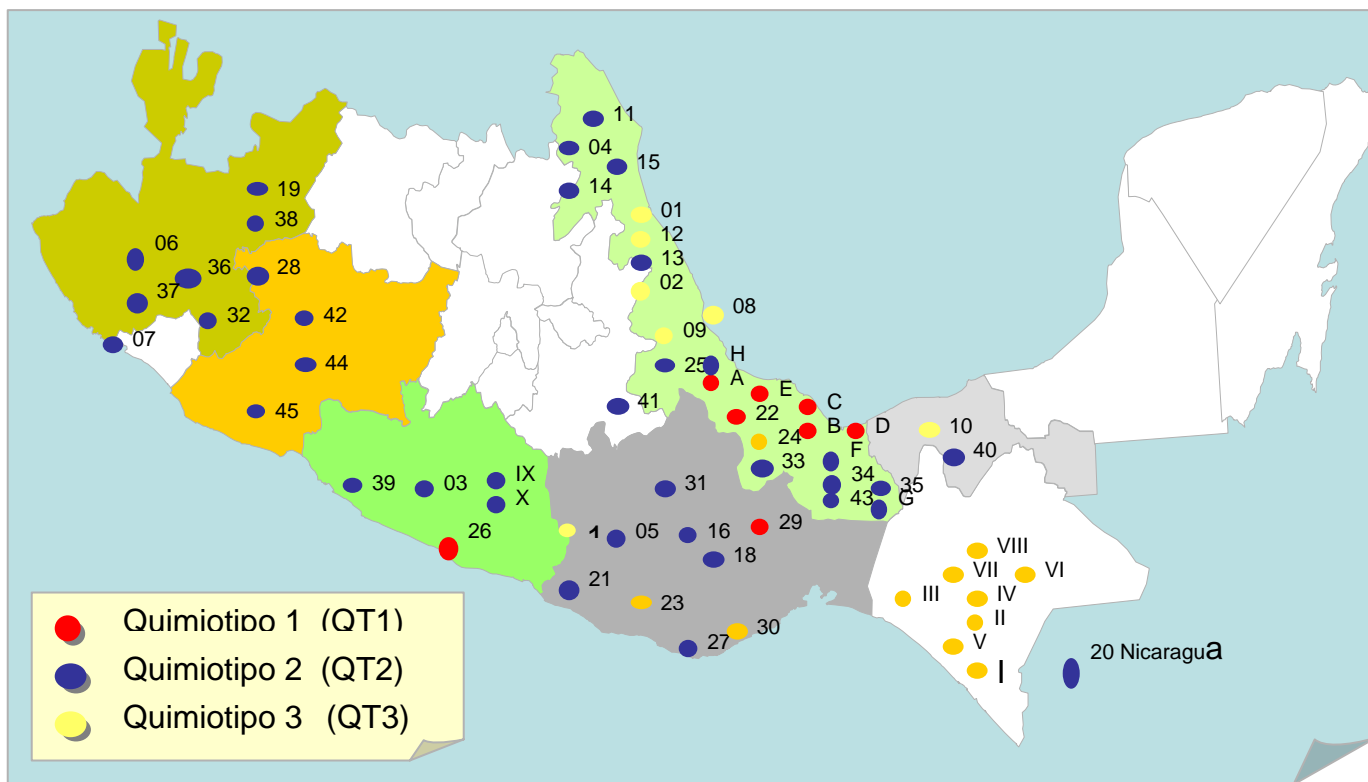
**Fig. 4. Cromatografía en capa fina de los extractos de las hojas de *C. brasiliense*. Q1H, hexánico quimiotipo 1, Q2H, hexánico quimiotipo 2, Q1A, Acetónico quimiotipo 1, Q2A, Acetónico quimiotipo 2, Q1M, Metanólico quimiotipo 1, Q2M, Metanólico quimiotipo 2, Fr Friedelina, mA/BA Mammea A/BA, Ca Canofilol, AcA Acido Apetálico. Silica Gel. Hexano/Acetato de etilo (8:2) Revelador: Sulfato sérico.**



**Fig. 5. Cromatografía en capa fina de los extractos hexánicos de las hojas de *C. brasiliense*. Mammea A/BA, Q1H, quimiotipo 1, Q2H, quimiotipo 2, Acido Apetálico, Friedelina, Canofilol,. Q3H quimiotipo 3. Silica Gel. Hexano/Acetato de etilo (8:2) Revelador: Sulfato sérico y Radicación UV (365 nm)**



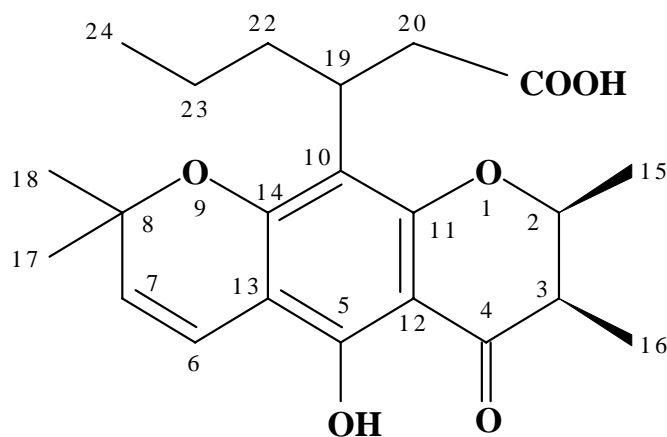
**Figura 6.** Mapa de la distribución geográfica en México de los quimiotipos 1, 2 y 3 de *Calophyllum brasiliens*



### 7.1.2. Aislamiento e identificación del Ácido apetalico

Las fracciones 40-43 eluidas con hexano:acetato de etilo (9:1) de la cromatografía en columna (Silica Gel) presentaron una sola mancha en CCF fase normal. Se obtuvieron 10.04 g de un aceite de color ámbar que se identificó por espectroscopia (RMNP) como ácido apetalico con trazas de ácido isoapetalico. Los datos espectroscópicos se muestran a continuación y el espectro a continuación.

Figura 7. Estructura química del Ácido Apetálico



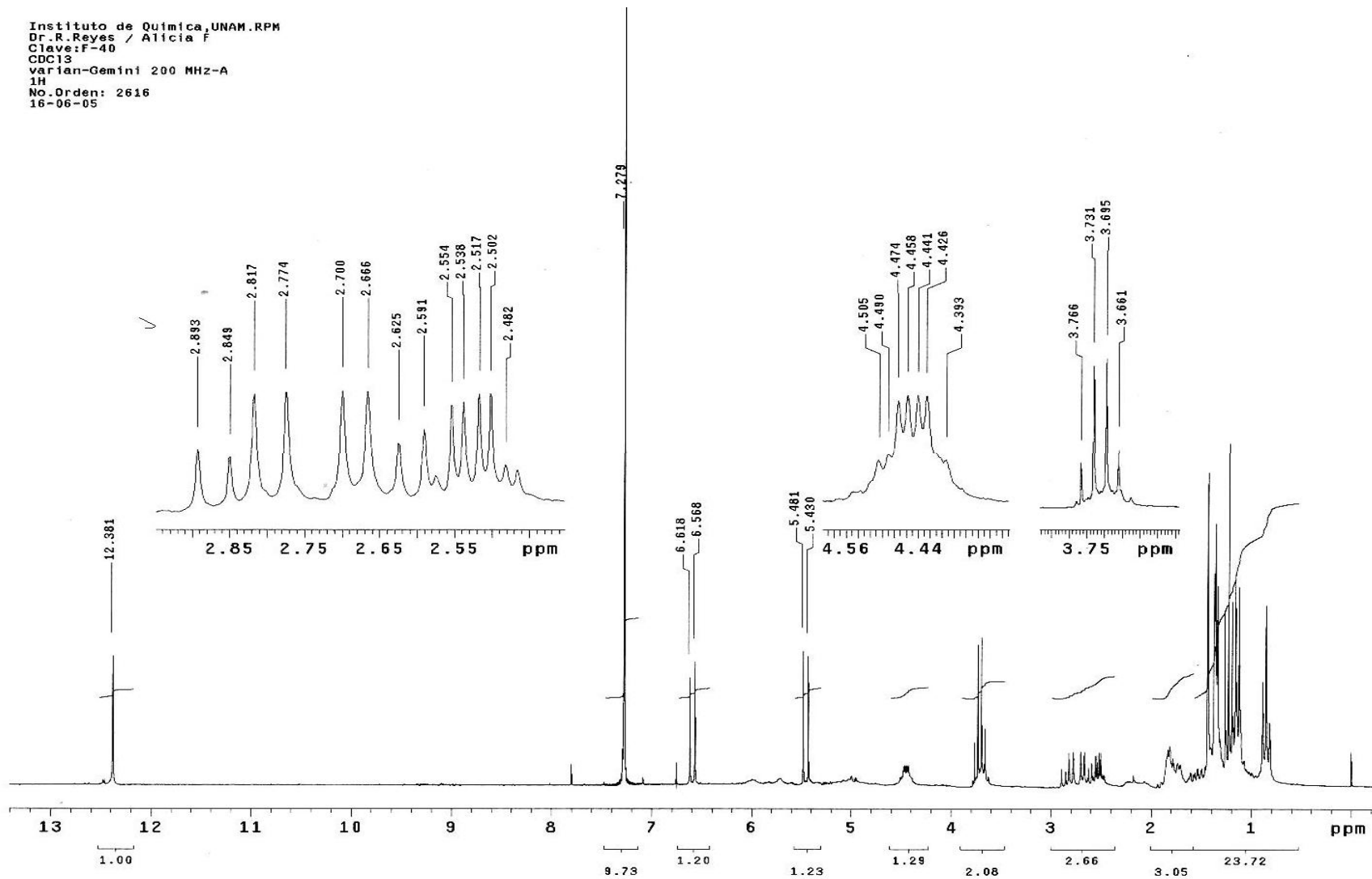
Acido Apetálico  $C_{22}H_{28}O_6$ , aceite amarillo.

$[\alpha]_D^{25} = -74.85^{\circ}$  ( $c=1.75$ ,  $CHCl_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda$  max nm ( $\log \epsilon$ ): 2.74 (4.33) y 298 (3.95); IR ( $CHCl_3$ , película)  $\nu_{max}$ : 2976; 2932 y 2872 (CH), 1707 (C=O), 1645, 1626 (C=C), 1443 ( $CH_2$ ), 1386 ( $CH_3$ ) y 1291 (C-O)  $cm^{-1}$ .

Datos de RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ),

| Protón              | $\delta$ (ppm) | Multiplicidad | Constante de acoplamiento $J$ (Hz) | Número de H |
|---------------------|----------------|---------------|------------------------------------|-------------|
| CH <sub>3</sub> -24 | 0.85           | t             | 7.2                                | 3           |
| CH <sub>3</sub> -16 | 1.14           | d             | 7.5                                | 3           |
| H-23                | 1.17           | m             | -                                  | 2           |
| CH <sub>3</sub> -15 | 1.35           | d             | 6.4                                | 3           |
| CH <sub>3</sub> -18 | 1.36           | s             | -                                  | 3           |
| CH <sub>3</sub> -17 | 1.43           | s             | -                                  | 3           |
| H-22                | 1.52           | m             | -                                  | 1           |
| H-22                | 1.81           | m             | -                                  | 1           |
| H-3                 | 2.52           | cd            | (7 y 3)                            | 1           |
| H20                 | 2.64           | dd            | (14.8 y 6.6)                       | 1           |
| H20'                | 2.83           | dd            | (14.8 y 8.5)                       | 1           |
| H19                 | 3.71           | m             | -                                  | 1           |
| H-2                 | 4.44           | cd            | (6.2 y 3.6)                        | 1           |
| H-7                 | 5.45           | d             | 9.9                                | 1           |
| H-6                 | 6.59           | d             | 9.9                                | 1           |
| OH-5                | 12.38          | s             | -                                  | 1           |

Instituto de Química, UNAM, RPM  
Dr. R. Reyes / Alicia F.  
Clave: F-40  
CDCl<sub>3</sub>  
Varian-Gemini 200 MHz-A  
1H  
No. Orden: 2616  
16-06-05



**Espectro 1. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del Ácido Acético.**

## **7.2. Efecto del extracto hexánico y el ácido apético ratas con diabetes experimental.**

### **7.2.1. Efecto sobre el peso corporal y glucemia**

El peso de los animales antes de la inducción de la diabetes fue similar en todos los grupos, no hubo diferencias iniciales entre ellos. En cuanto el peso que se registró antes del tratamiento experimental los grupos que recibieron extracto hexánico 100 mg/Kg y los que recibieron ácido apético 10 y 30 mg/Kg disminuyeron significativamente su peso durante las dos semanas transcurridas entre la inducción de la diabetes y la inclusión al tratamiento experimental ( $P < 0.05$ ). En el resto de los grupos la disminución no fue significativa o mantuvieron el mismo peso, en ningún caso los animales experimentaron el aumento de peso característico de los animales sanos (Tabla 5).

En cuanto a los niveles de glucosa se observó que antes de la inducción de la diabetes todos los animales tuvieron valores similares. Para el estudio se seleccionaron solamente los animales que resultaron hiperglucémicos ( $> 200$  mg/dL) de manera que los niveles de glucosa al iniciar el tratamiento fueron mayores que los niveles basales ( $P < .05$ ). La hiperglucemia de las ratas también fue similar entre los grupos de tratamiento (Tabla 6).

**Tabla 5 . Peso corporal de los animales**

| Tratamiento                      | Peso corporal inicial<br>(inducción de la diabetes)<br>(g) | Peso corporal final<br>(tratamiento experimental)<br>(g) |
|----------------------------------|--|--|
| Extracto hexánico 30 mg/Kg       | 279 ± 9.81   | 275 ± 2.89   |
| Extracto hexánico 100 mg/Kg      | 284 ± 10.97  | 229 ± 12.70  |
| Extracto hexánico 300 mg/Kg      | 266 ± 5.20   | 258 ± 17.90  |
| Ácido apetalico 10 mg/Kg         | 271 ± 12.12  | 219 ± 9.81   |
| Ácido apetalico 30 mg/Kg         | 282 ± 5.77   | 240 ± 15.01  |
| Ácido apetalico 100 mg/Kg        | 268 ± 5.77   | 236 ± 12.12  |
| Glibenclamida 10 <sup>-5</sup> M | 287 ± 16.17  | 274 ± 15.59  |
| Vehículo (vol. Equivalente)      | 286 ± 11.55  | 286 ± 7.51   |

n = 3

Los datos representan el promedio ± error estándar

P < 0.05

**Tabla 6 . Glucemia de los animales**

| Tratamiento                      | Glucemia base<br>(inducción de la diabetes)<br>(mg/dL) | Glucemia inicial<br>(tratamiento experimental)<br>(mg/dL) |
|----------------------------------|--|---|
| Extracto hexánico 30 mg/Kg       | 120 ± 6.93   | 362 ± 21.39   |
| Extracto hexánico 100 mg/Kg      | 116 ± 3.47   | 404 ± 41.04   |
| Extracto hexánico 300 mg/Kg      | 109 ± 4.62   | 389 ± 33.53   |
| Ácido apetalico 10 mg/Kg         | 111 ± 3.47   | 379 ± 26.59   |
| Ácido apetalico 30 mg/Kg         | 110 ± 4.62   | 403 ± 16.18   |
| Ácido apetalico 100 mg/Kg        | 111 ± 6.36   | 377 ± 21.39   |
| Glibenclamida 10 <sup>-5</sup> M | 130 ± 4.05   | 330 ± 22.54   |
| Vehículo (vol. equivalente)      | 103 ± 12.14  | 360 ± 28.32   |

n = 3

Los datos representan el promedio ± error estándar

P < 0.05

### 7.3. Efecto del extracto hexánico de *C. brasiliense* sobre los niveles de glucosa

La administración i.p. de 30, 100 o 300 mg/Kg de extracto hexánico de hoja de

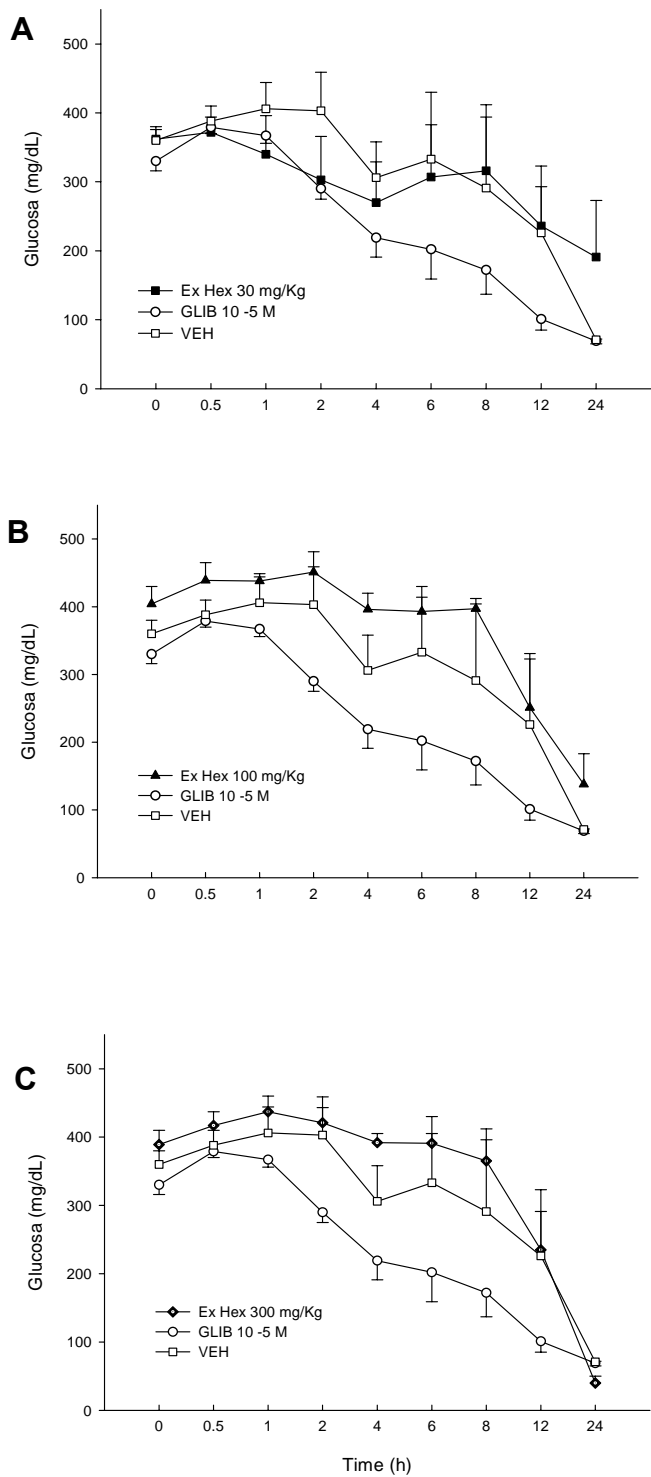


*C. brasiliense* no disminuyó los niveles de glucosa en ratas en ayuno con diabetes experimental. Los niveles de glucosa desde el tiempo cero hasta las 8 horas en los animales que recibieron 100 y 300 mg/Kg de extracto hexánico, fueron más altos que los de los animales tratados con el vehículo, aunque esta diferencia no fue significativa. El tratamiento con glibenclamida disminuyó los niveles de glucosa, esta disminución es más evidente a las 1 o 2 horas después del tratamiento.

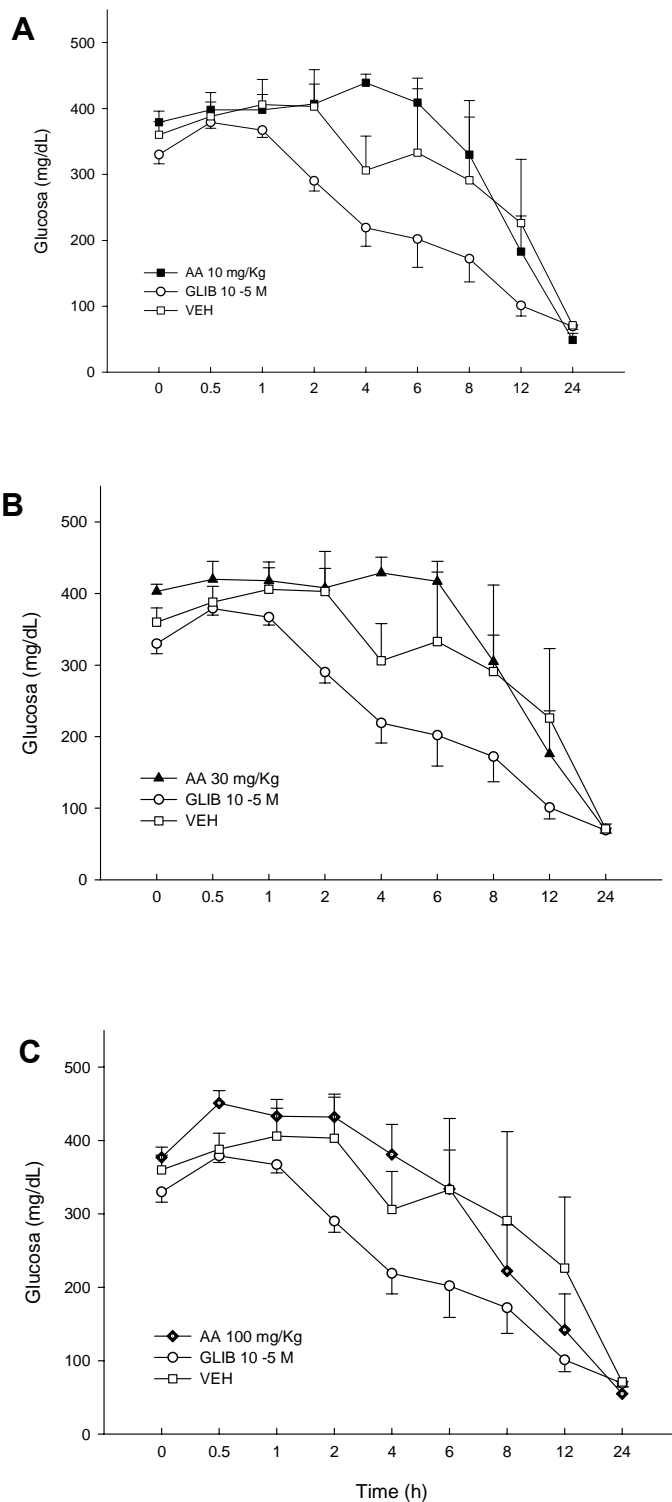
A las 12 y 24 horas se observó una disminución mas pronunciada en los niveles de glucosa, que puede estar relacionada con el ayuno prolongado a que se sometieron los animales durante la evaluación del efecto del extracto (Figura 8).

#### **7.4. Efecto del ácido apetalico aislado de *C. brasiliense* sobre los niveles de glucosa**

El ácido apetalico (10, 30 y 100 mg/Kg) no disminuyó los niveles de glucosa, por el contrario a las 4 y 6 horas desde el tratamiento (10 y 30 mg/Kg) los niveles están en su valor máximo, aún mayores que en el grupo control (vehículo). Los valores de glucosa fueron menores en todas las evaluaciones, en el grupo tratado con glibenclamida. Al igual que en la evaluación del extracto hexánico se observó una disminución drástica de los niveles de glucosa a las 12 y 24 h (Figura 9).



**Figura 8.** Efecto del extracto hexánico (Ex Hex) de *C. brasiliense* sobre los niveles de glucosa de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (60 mg/Kg). Los puntos representan el promedio de 3 evaluaciones y las barras verticales el error estándar de la media.



**Figura 9.** Efecto del ácido apetálico (AA) aislado de *C. brasiliense* sobre los niveles de glucosa de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (60 mg/Kg). Cada punto representa el promedio de tres ratas y las barras verticales el error estándar de la media.



## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1. Distribución geográfica de *Calophyllum brasiliense***

El análisis por cromatografía capa fina de los extractos hexánicos de las hojas de los tres grupos de muestras de *Calophyllum brasiliense* permitió determinar la distribución geográfica de los quimiotipos de la especie. Este conocimiento es importante para la preservación y el adecuado uso de esta especie en la medicina tradicional. El Quimiotipo 1 contiene como constituyentes mayoritarios Coumarinas tipo mammea, especialmente la mammea A/BA, friedelina y canofilol. El Quimiotipo 2 contiene como constituyentes mayoritarios cromanonas, especialmente ácido apetalico, friedelina y canofilol. Además se detecto otro patrón cromatográfico que sugiere la existencia de otro quimiotipo que difiere de los dos previamente reportados. Éste se denominó Quimiotipo 3 a reserva de confirmarlo, al aislar e identificar los compuestos contiene, lo cual será motivo de una nueva investigación.

En nuestro país, el quimiotipo 2 es el más abundante y se distribuye en la vertiente del Océano Pacífico desde Jalisco hasta Chiapas y en la vertiente del Océano Atlántico (Golfo de México) en Veracruz y Tabasco. El quimiotipo 3 le sigue en abundancia, y se distribuye desde el Estado de Chiapas a Veracruz y Oaxca. El quimiotipo 1 es el mas escaso y se encuentra principalmente en el sur del Estado de Veracruz. Lo anterior sugiere que existe diferenciación química en las

poblaciones de *Calophyllum brasiliense* de México, o bien que se trata de un complejo de especies que hasta ahora han sido consideradas como una sola.

Sin

embargo por el momento no se han investigado si existen diferencias morfológicas entre los distintos quimiotipos. Es interesante señalar que estudios realizados en Sri Lanka, han indicado que existen dos grupos químicamente diferentes de especies de *Calophyllum*. Un grupo presenta coumarinas, mientras que el otro cromononas Tabla 7 (Bandara et.,al 1986).

Nuestros datos, así como los antes citados sugieren que las especies del genero *Calophyllum* se encuentra en proceso de diferenciación química, tal vez como una forma de adaptación a diferentes condiciones ambientales y de interacción con otros organismos. Se sabe por ejemplo que los metabolitos mammea A/BA y ácido apetalico inhiben *in vitro* el crecimiento de las especies fúngicas: *Curvularia lunata var. aerea* y *Rhizoctonia repens*. En contraste, los triterpenos friedelina y canofilol, no inhibieron el crecimiento de las estos hongos así como otros que se encuentran en las hojas de *Calophyllum brasiliense*. (Aguilar 2005).

**Tabla 7.** Grupos químicamente diferentes de especies de *Calophyllum* de Sri Lanka (Bandara *et al.*, 1986).

| <b>Especies</b>          | <b>Coumarinas</b>                | <b>Cromanonas</b>          |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| <i>C calaba</i>          |                                  | ácido canofílico           |
|                          |                                  | cis-ácido chapelierico     |
|                          |                                  | ácido chapelierico         |
| <i>C cordatooblongum</i> | Cordatolido-A (8)                |                            |
|                          | Cordatolido-B (9)                |                            |
|                          | Oblonguido (10)                  |                            |
| <i>C lankaensis</i>      |                                  | ácido calozeilánico (4)    |
|                          |                                  | ácido thwaitésico (11)     |
|                          |                                  | iso-ácido thwaitésico (12) |
| <i>C mooni</i>           | (+)-cis-Dihidroinofilolido (1)   |                            |
|                          | (-)-trans-Dihidroinofilolido (2) |                            |
| <i>C thwaitessi</i>      |                                  | ácido calozeilánico (4)    |
|                          |                                  | ácido thwaitésico (11)     |
| <i>C trapezifolium</i>   |                                  | ácido calozeilánico (4)    |
| <i>C walkeri</i>         |                                  | ácido calozeilánico (4)    |

## **8.2. Efecto del extracto hexánico y el ácido apetalico aislados de *C.***

### ***brasiliense* sobre los niveles de glucosa en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina**

La mayoría de los estudios de actividad biológica de *Calophyllum brasiliense* se habían enfocado a la evaluación de su actividad antimicrobiana y antiviral, esto porque en la medicina tradicional esta especie se utiliza para tratar infecciones.

Sin embargo, hasta ahora no se había explorado su posible efecto hipoglucemiante.

Con base en el uso de esta especie en combinación con *Coutarea hexandra* para tratar la diabetes, se evaluó el efecto de la administración intraperitoneal del extracto hexánico y el ácido apetalico aislados de *C. brasiliense* sobre los niveles de glucosa en ratas macho con diabetes experimental inducida con estreptozotocina, durante las 24 horas siguientes al tratamiento. El ácido apetalico es el compuesto más abundante en las hojas de *C. brasiliense* Q2, por lo que se obtiene fácilmente y en grandes cantidades, esta fue la razón por la que se consideró una buena opción para buscar un compuesto hipoglucemiante y se seleccionó para el estudio.

En el modelo utilizado, la administración del extracto hexánico y la del ácido apetalico no mostraron actividad hipoglucemiante. Por el contrario, desde el tiempo cero hasta las 8 horas en los animales que recibieron 100 y 300 mg/Kg de extracto hexánico, y a las 4 y 6 horas en los animales tratados con 10 y 30 mg/Kg de ácido apetalico, los niveles de glucosa tuvieron valores máximos, aún por arriba de los registrados para el grupo control (vehículo). Esto fue sólo una tendencia pues la diferencia no resultó significativa. Sería necesario aumentar el número de experimentos por grupo para descartar que esta fuera una diferencia real y que la planta en lugar de disminuir los niveles de glucosa, provocara hiperglucemia.



Del uso en medicina tradicional, se esperaría que el efecto fuera hipoglucemiante pero aparentemente hay una tendencia contraria. Estos resultados sugieren que tal vez sea *Coutarea hexandra* y no *C. brasiliense* la responsable del efecto antidiabético, sería necesario estudiar el posible efecto hipoglucemiante de *Coutarea hexandra* para confirmar esta posibilidad. Respecto a *C. brasiliense*, en vista de los resultados obtenidos podemos decir que no se recomienda el uso de esta especie para el tratamiento de la diabetes.

## 9. CONCLUSIONES

1. *Calophyllum brasiliense* se distribuye en la vertiente del Océano Pacífico desde Jalisco hasta Chiapas y en el Golfo de México, en los estados de Veracruz y Tabasco.
2. El quimiotipo 1 se encuentra preferentemente en Veracruz, Guerrero y Oaxaca.
3. El quimiotipo 2 se localiza en Veracruz, Guerrero, Jalisco y Oaxaca.
4. El quimiotipo 3 se encuentra en Jalisco, Oaxaca y Chiapas. Se identificó un tercer quimiotipo que no se había descrito previamente.
5. Ni el extracto hexánico ni el ácido apetalico aislados de *Calophyllum brasiliense* mostraron efecto hipoglucemiante en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina.

## 10. REFERENCIAS

Aguilar-Bañuelos, E., 2005. Efecto de los metabolitos secundarios de *Calophyllum brasiliense* en los hongos colonizadores de las hojas: Estudio *in vivo*. Tesis para optar por el grado de Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Alarcón-Aguilar, F.J., Banderas-Dorantes T., Gutierrez-León A., Vazquez-Carrillo L., Flores-Saenz J.L., Roman-Ramos R., 2003, Study of the Anti-Hyperglycemic Effect of Anti-Diabetic Plants in Rabbits with impaired Glucose Tolerance. *Proc. Wets. Pharmacol. Soc.* 46:148-152

Andrade Cetto A. Heinrich M. 2005 Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethno pharmacology* 99:325-348.

Bandara B. M. ; Dharmaratne H. R. W. ; Subramaniam Sotheeswaran ; Sinnathamby. 1986. Two chemically distinct groups of *Calophyllum* species from Sri Lanka. *Phytochemistry* . vol. 25, n<sup>o</sup>2, pp. 425-428

Correa, M.P., 1978. *Diccionario das Plantas Uteis do Brasil e das exoticas cultivadas*. Imprenta Nacional. Ed. Rio de Janeiro. Brazil

Cottiglia, F., Dhanapal, B., Stitche, O., Heilman J., 2004. New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. *J. Natural Prod.*, 67:537-541.

Duke, J. A., 1994. *Amazonian Ethno botanical Dictionary*. CRC Press. England.

Emendörfer, F., Emendörfer, F., Bellato, F., Noldin, V.F., Niero, R., Cechinel-Filho, V., Maia, C.A., 2005. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 8(1):63-68.

Foster D.W. Isselbacher, E. Braunwald, JD Wilson, JB Martin, AS Fauci, DL Kasper 1994 *Diabetes Mellitus*. En: *Harrison Principios de Medicina Interna*. Vol II (Eds.) 13<sup>a</sup> Ed. Interamericana Mc Graw Hill. Madrid; pp.2281-2305

García-Barriga, H., 1992. *Flora medicinal de Colombia*. 2<sup>a</sup>. Ed. Tercer Mundo Editores. Bogotá, Colombia. Tomo 2. pp. 21-212.

Geissberger, P., Sequin, U., 1991. Constituents of *Bidens pilosa* L.: Do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? *Acta Trop.* 48(4):251-261.

Greenard, P., Moretti, C., Jacquemen, H., 1987. *Pharmacopées Traditionnels en Guyane: Creoles, Palikur, Wayapi*. Editorial 1-ORSTROM, Coll. Mem., 108, pp.569.

Guarim-Neto, G., 1987. *Plantas utilizadas na medicina popular do estado de Mato Grosso*. CNPq Assesoria. Brasilia, Brazil. pp.58.

Guimarez, E.F., Mautone, L., Rizzini, C.T., Matos-Filho, A., 1993. Arvores do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Jardim Botânico Rio de Janeiro. Ed. Rio de Janeiro, Brazil, pp. 99-100.

Hay, A.E., Guillet, D., Morel, C., Larcher, G., Macherel, D., Le Ray, A.M., Litaudon, M., Richomme, P. 2003. Antifungal chromans inhibiting the mitochondrial respiratory chain of pea seeds and new xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Med.* 69(12):1130-1135.

Huerta, M., Basualdo, M.C., Abe, F., Jiménez-Estrada, M., Soler, C., Reyes-Chilpa, R., 2004. HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biol. Pharm. Bull.*, 27(9):1471-1475.

Isaías D.E., Niero, R., Noldin, V.F., De Campos-Buzzi, F., Yunes, R.A., Delle-Monache, F., Cechinel-Filho, V., 2004. Pharmacological and phytochemical investigations of different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). *Pharmazie* 59(11):879-881.

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., Boyd, M.R., 1992. The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *J. Med. Chem.*, 35(15):2735-2743.

Lopez- Vega E., Tapia-Tapia E. del C. 2005 *Economía de Productos Forestales No Maderaables: Aprovechamiento Sustentable de un Recurso Fitoquímico en México*. Tesis para optar por el grado de Economista, Facultad de Economía, UNAM. México.

Marles R.J. and Farnsworth N.R. 1994. Plants as sources of antidiabetic agents. In: Wagner H. Farnsworth N.R. *Economic and Medicinal Plant Research Chapter 4*. Vol 6. Academic Press. p150-180.

Mesía-Vela, S., Sánchez, R.I., Estrada-Muñiz, E., Alavez-Solano, D., Torres-Sosa, C., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., Kauffman, F.C., 2001. Natural products isolated from Mexican medicinal plants: novel inhibitors of sulfotransferases SULT1A1 and SULT2A1. *Phytomedicine* 8:481-488.

Mitaine-Offer, A.C., Hornebeck, W., Sauvain, M., Zeches-Hanrot, M., 2002. Triterpenes and phytosterols as human leukocyte elastase inhibitors. *Planta Med.* 68(10):930-932.

Nakagawa, H., Takaishi, Y., Fujimoto, Y., Duque, C., Garzon, C., Sato, M., Okamoto, M., Oshikawa, T., Ahmed, S.U., 2004. Chemical constituents from the Colombian medicinal plant *Maytenus laevis*. *J. Nat. Prod.* 67(11):1919-1924.

Navarrete A, Trejo-Miranda JL, Reyes-Trejo. 2002. L Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *J Ethnopharmacol.*;79(3):383-8.

Pennington, T.D., Sarukhan J. 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. México.

Peter V.Ching Hong., 2006 Infections in Patients with Diabetes Mellitus: Importance of Early Recognition, Treatment and Prevention. Infections diseases. Vol. 6, No 2; 71-81.

Pretto J.B., Cechinel-Filho V., Noldin V.F., Sartori M.R., Isaias D.E., Cruz A.B., 2004. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). Z. Naturforsch [C] 59(9-10):657-662.

Ratnayake Bandara B.M. 1986 Two chemically distinct groups of *Calophyllum* species from Sri Lanka Phytochemistry vol. 25, n<sup>o</sup>2, pp. 425-428

Reyes-Chilpa R., Estrada-Muñiz E., Apan, T.R., Amekraz, B., Aumelas, A., Jankowski, C.K., Vazquez-Torres, M., 2004. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. Life Sci., 75(13):1635-1647.

Reyes-Chilpa, R., Fumiko, A., Maki, J., Estrada-Muñiz, E., Huerta-Reyes M., 2003. Trypanocidal activity and chemistry of several Guttiferae species from Mexico. The bulletin of Central Research Institute Fukoka University. 1:157-165.

Román-Ramos R., Flores-Sáenz J.L., Alarcón-Aguilar F.J., 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants, Journal of Etnopharmacology 48: 25-32.

Salvador-Rodriguez J., 2002 La diabetes Editorial Alfaomeoga 91-135.

Sartori, N.T., Canepelle, D., De Sousa, P., Martins, D.T.O., 1999. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. J. Ethnopharmacol., 67:149-156.

Setzer, W.N., Shen, X., Bates, R.B., Burns, J.R., McClure, K.J., Zhang, P., Moriarity, D.M., Lawton, R. O., 2002. A phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. Fitoterapia 71(2):195-198.

Stevens, P.F., 1980. A revision of the Old World species of *Calophyllum* (Guttiferae) J. Arnold Arboretum 61(2):117-171.

Vásquez, M.R., 1990. Useful plants of Amazonian Peru. Spanish Typescript. Filled with USDA's National Agricultural Library Ed.

Ya-Ching Shen., Li-Tang Wang., Ashraf Taha Khalil., Yahoo-Haur Kuo., 2004 Chromanones and Diphydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*., Cchem.Pharm.Bull 52; 402-405.