



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biología

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y
ACTIVIDAD ANTIVIRAL (VIH-1) DE
Calophyllum brasiliense DEL ESTADO DE
CHIAPAS, MÉXICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JULIO CÉSAR GARCÍA ZEBADÚA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RICARDO REYES CHILPA

COTUTORA: Dra. PILAR PONCE DÍAZ
COMITÉ TUTOR: Dr. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de diciembre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **GARCÍA ZEBADÚA JULIO CÉSAR** con número de cuenta **509013848** con la tesis titulada: "**Caracterización química y actividad antiviral (VIH-1) de *Calophyllum brasiliense* del Estado de Chiapas, México**", realizada bajo la dirección del **DR. RICARDO REYES CHILPA**:

Presidente:	DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO
Vocal:	DRA. MAIRA ESTRELLA HUERTA REYES
Secretario:	DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
Suplente:	DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
Suplente	DRA. PILAR PONCE DÍAZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 14 de febrero de 2012.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**), por la formación doctoral que me brindó.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca número 199201 (CVU 172367) que me otorgó para la realización de los estudios.

A la **DGAPA-UNAM** (IN203810) por el financiamiento de esta investigación mediante el proyecto “Estudios para el desarrollo de un fitofármaco antiviral (VIH-1) con base en el árbol tropical *Calophyllum brasiliense*”.

A los integrantes del Comité Tutor:

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Dra. Pilar Ponce Díaz

Dr. Manuel Jiménez Estrada

.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A los integrantes de mi **Comité Tutor**, por la conducción de este trabajo y formación como investigador, así como por las permanentes y valiosas aportaciones a la tesis a través de la discusión de los avances.

A los integrantes de mi **Jurado de Grado**, por las valiosas sugerencias y correcciones que hicieron al escrito.

A la **Dra. María Guadalupe Campos Lara** por su valiosa contribución en la revisión del artículo publicado producto de esta Tesis. Así como, a las facilidades otorgadas en el uso del CLAR (HPLC).

Al **Dr. Marius Mumbrú, Dr. Miguel A. Contreras, Dr. Alberto Mendoza y M.C. Elizabeth Estrada**, por su colaboración.

A la **Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH)**, porque a través del convenio de colaboración con la UNAM ingresé al Posgrado en Ciencias Biológicas.

A los integrantes del grupo de investigación del **Laboratorio 2-5 del Instituto de Química (UNAM)**, por su apoyo y amistad.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLA	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. La pandemia del Virus de Inmunodeficiencia Humana/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH/SIDA)	4
2.1.1. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)	5
2.1.1.1. Características del VIH	5
2.1.1.2. Ciclo replicativo del VIH	6
2.2. Fármacos aprobados contra el VIH/SIDA	12
2.3. Productos naturales con actividad anti-VIH	13
2.4. <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess	13
2.4.1. Historia	14
2.4.2. Botánica	16
2.4.3. Distribución y hábitat	19
2.4.4. Etnobotánica	19
2.5. Fitoquímica	20
2.5.1. Compuestos fenólicos simples	20
2.5.2. Triterpenos y esteroides	21
2.5.3. Flavonoides	22
2.5.4. Xantonas	23
2.5.5. Cromanonas	26
2.5.6. Coumarinas	28
2.6. Actividad biológica	32
2.6.1. Efecto gastro-protector	32

2.6.2. Efecto antinociceptivo y analgésico	33
2.6.3. Actividad antiespasmódica	34
2.6.4. Agentes antiparasitarios	34
2.6.5. Agente moluscicida	36
2.6.6. Actividad contra levaduras	37
2.6.7. Actividad antibacteriana	37
2.6.8. Agentes antitumorales	39
2.6.9. Actividad antiviral (Anti-TR VIH-1)	39
2.7. Estudios sobre <i>Calophyllum brasiliense</i> en México	44
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION	47
4. HIPOTESIS	47
5. OBJETIVOS	48
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	49
6.1. Material biológico	50
6.2. Ensayos biológicos	51
6.2.1. Ensayo de actividad anti-transcriptasa reversa del VIH-1	51
6.2.2. Ensayo de viabilidad celular sobre linfocitos humanos	53
6.2.3. Ensayo de citotoxicidad sobre líneas celulares de carcinoma humano	54
6.2.4. Actividad tóxica sobre el crustáceo <i>Artemia salina</i>	55
6.2.5. Toxicidad aguda en ratones cepa CD1 (<i>Mus musculus</i>)	56
6.2.6. Análisis anatómo-histopatológico de los órganos de ratones	57
6.3. Caracterización química	59
6.3.1. Comparación entre las colectas de Chiapas por CCF y CLAR	59
6.3.2. Preparación de extractos orgánicos de la colecta Soconusco	60
6.3.3. Aislamiento de compuestos	62
6.3.3.1. Columna I: Cromatografía en columna en fase normal	62
6.3.3.2. Columna II: Cromatografía en columna en fase reversa	66
6.3.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	68
6.3.3.4. Identificación de compuestos	70
6.3.4. Cuantificación de compuestos por CLAR-UV	70
6.4. Análisis estadístico	72

7. RESULTADOS Y DISCUSION	73
7.1. Análisis biológico	73
7.1.1. Actividad anti-transcriptasa reversa de VIH-1	73
7.1.2. Citotoxicidad sobre líneas celulares de carcinoma humano	75
7.1.3. Citotoxicidad sobre linfocitos humanos	76
7.1.4. Toxicidad sobre el crustáceo <i>Artemia salina</i>	78
7.1.5. Toxicidad aguda en ratones (<i>Mus musculus</i>)	78
7.1.6. Anatómo-histopatología de los órganos de los ratones	81
7.2. Caracterización química	87
7.2.1. Comparación entre las colectas de Chiapas por CCF y CLAR	87
7.2.2. Columna I. Cromatografía en columna fase normal	90
7.2.2.1. Composición de las fracciones <i>F1</i> y <i>F2-41</i>	90
7.2.2.2. Triterpenos	93
7.2.3. Columna II. Cromatografía en columna de fase reversa	98
7.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	102
7.2.4.1. Cromononas	102
7.2.4.2. Dipiranocoumarinas tetracíclicas	105
7.2.4.3. Coumarinas tricíclicas	125
7.2.5. Identificación de compuestos por CLAR-UV-EM	127
7.2.6. Cuantificación de compuestos por CLAR-UV	132
8. DISCUSION	135
9. CONCLUSIONES	150
10. REFERENCIAS	152
ANEXOS	169

LISTA DE ABREVIATURAS

	A		DL₉₀	Dosis letal del 90%
AcOEt		Acetato de etilo	DMSO	Dimetilsulfóxido
ADN		Ácido desoxiribonucleico		
ARN		Ácido ribonucleico		E
ARNm		ARN mensajero	EBV-EA	Virus Epstein-Barr antígeno Earely
ARNt		ARN de transferencia	ELISA	Ensayo inmuno-colorimétrico ligado a enzima
	B		EM	Espectrometría de masas
ButOH		Butanol	EtOH	Etanol
	C			H
c		Concentración	HCT-15	Colon
CC₅₀		Concentración citotóxica del 50%	HETCOR	Correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C
CCF		Cromatografía en capa fina	HMBC	Correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C bidimensional a larga distancia
CDCl₃		Cloroformo deuterado	HMQC	Correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C bidimensional
CE₅₀		Concentración efectiva del 50%	HSQC	Correlación homonuclear ¹ H- ¹ H bidimensional
CEM-SS		Línea celular de linfoblastoide T	Hx	Hexano
CG-EM		Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas		I
CHCl₃		Cloroformo	IEE	Ionización por electro-spray
CH₂Cl₂		Diclorometano	IF	Inhibidores de la fusión
CH₃CN		Acetonitrilo	II	Inhibidores de la integrasa
CI₅₀		Concentración que inhibe el 50%	IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
CLAR		Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	IP	Inhibidores de proteasa
CLAR-EM		CLAR acoplado a masas mediante ionización por electro-spray (IEE)	i.p.	Intraperitoneal
CL₅₀		Concentración letal del 50%	IR	Espectroscopia de infrarojo
CM₁₀₀		Concentración que mata el 100%	ITR	Inhibidores de la enzima transcriptasa reversa de VIH
COSY		Correlación homonuclear ¹ H- ¹ H bidimensional	ITRAN	ITR análogos nucleosídicos
	D		ITRNN	ITR no análogos nucleosídicos
DEPT		Acrecentamiento sin distorsión por transferencia de polarización		K
DI₅₀		Dosis que inhibe el 50%	KBr	Bromuro de potasio
DL₅₀		Dosis letal del 50%	K562	Leucemia

M		U	
MCF-7	Mama	U251	Glía del sistema nervioso central
MeOH	Metanol	UV	Ultra-violeta
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio	V	
Mexu	Herbario Nacional de México	VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
P		X	
PBS	Suero bovino fetal	XTT	(2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilido)
PC3	Próstata	Unidades y símbolos	
P.f.	Punto de fusión	[α]²⁵_D	Rotación específica con respecto a la línea del sodio a 25 °C
PHA	Fitohemaglutinina	c	Cuarteto
Q		cm	Centímetros
QTP	Quimiotipo	°C	Grados centígrados
R		d	Doblete
Rf	Frente de referencia o Factor de retención	dd	Doble de doble
RMN¹H	Resonancia magnética nuclear de protón	δ	Desplazamiento químico
RMN¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono	g	Gramos
R.O.	Rotación óptica	Hz	Hertz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	h	Horas
S		J	Constante de acoplamiento
SC	Colecta Soconusco	λ	Longitud de onda
SKLU-1	Pulmón	l/min	Litros por minuto
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	m	Multiplete
SRB	Sulforrodamina B	[M]⁺	Ion molecular
SS	Solución salina	min	Minutos
SV	Colecta Selva	mg	Miligramos
T		mg/Kg	Miligramos por kilogramo
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato	mg/ml	Miligramos por mililitro
TMS	Tetrametilsilano	ml/min	Mililitros por minuto
TR	Transcriptasa reversa	MHz	Megahertz
		mM	Milimolar
		m/z	Relación masa-carga
		μg	Microgramos
		μl	Microlitros
		μg/ml	Microgramos por mililitro
		μM	Micromolar
		N	Normalidad
		nM	Nanomolar
		nm	Nanómetro
		ppm	Partes por millón
		rpm	Revoluciones por minuto
		s	Singlete
		t	Triplete

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo replicativo del VIH (www.niaid.nih.gov). 11
- Figura 2.** El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*. 17
- Figura 3.** Distribución de poblaciones de *Calophyllum brasiliense* (Quimiotipos) en México (Fonseca, 2008). 46
- Figura 4.** Ubicación de los sitios de colecta: Huehuetán (Región Soconusco), y Ocosingo (Región Selva), Chiapas, México. 51
- Figura 5.** Diagrama de fraccionamiento del extracto de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense*, colecta Soconusco, Chiapas, México (Columna I). 63
- Figura 6.** Cromatofolio de las fracciones F52-68 obtenidas mediante la columna I, observados con luz UV (A) $\lambda = 254$ nm, (B) $\lambda = 366$ nm, y (C) revelado con sulfato cerico 1% en ácido sulfúrico 2 N. 64
- Figura 7.** Cromatofolio (C18) observado con luz UV (A) $\lambda = 254$ nm, (B) $\lambda = 366$ nm, y (C) con sulfato cerico 1 % en ácido sulfúrico 2 N de las fracciones F60-83. 66
- Figura 8.** Diagrama del fraccionamiento de F60-83 (Columna II). 67
- Figura 9.** Diagrama de fraccionamiento de FR5, FR6, FR7 y FR8 por CLAR. 69
- Figura 10.** Actividad anti-TR VIH-1 de los extractos orgánicos de hojas de *Calophyllum brasiliense*. A) Extractos de hexano de la colecta Soconusco (SC), Selva (SV) y Quimiotipos (QTP1 y QTP2); B) Extracto de hexano (HSc), acetona (ASc), metanol (MSc) y metanol sin taninos (MSc-T) de la colecta Soconusco. n=5 ($X \pm E.M.$). 74
- Figura 11.** Curva CI_{50} anti-TR VIH-1 de los extractos de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Soconusco (SC), Selva (SV) y acetona del Soconusco (ASC). n=3 ($X \pm E.M.$). 75
- Figura 12.** Curva CC_{50} de viabilidad celular sobre linfocitos humanos. Extractos de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Soconusco (SC), Selva (SV) y acetona del Soconusco (ASC). n=3 ($X \pm E.M.$). 77

- Figura 13.** Curva de toxicidad aguda (DL₅₀) en ratones cepa CD1. Extracto de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Soconusco (SC), Selva (SV) y acetona Soconusco (ASC). n=6 ($X \pm E.M.$). **79**
- Figura 14.** Pulmón de los ratones tratados con el extracto de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Colecta Soconusco (Dosis= 5.62 g/kg). Observe el cambio de coloración de nacarado (A) a rojo (B) producto de las múltiples petequias. **82**
- Figura 15.** Vasodilatación observada en las orejas de los ratones a los que se les administró el extracto de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Colecta Soconusco (Dosis= 5.62 g/kg). A) Ratón control, B) Ratón tratado. Observe la vasodilatación (flechas). **82**
- Figura 16.** Fotomicrografía de hígado de ratón. (A) Control. (B) Después del tratamiento con 5.62 g/kg i.p. del extracto de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de la colecta Soconusco (X40 y X100). Observe que la arquitectura esta conservada, pero los vasos sanguíneos están dilatados. Hepatocito (H), hepatocito binucleado (Hb, *), núcleo (n), eritrocitos (e), células endoteliales (ec) y células de Kupffer (Kc, •). **84**
- Figura 17.** Fotomicrografía de bazo de ratón. (A) Control. (B) Después del tratamiento con 5.62 g/kg i.p. del extracto de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de la colecta Soconusco (X40). Observe que el número de megacariocitos (MK, *) se incrementa (C y D, zoom X100 de B) mostrando megacariocitos que se han dividido; también hay células con dos núcleos en un solo citoplasma (flecha). Tejido linfoide (L). **85**
- Figura 18.** Fotomicrografía de pulmón de ratón. (A) Control. (B) Después del tratamiento con 5.62 g/kg i.p. del extracto de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de la colecta Soconusco (X40). Observe que los vasos sanguíneos están congestionados y muestran ruptura alveolar (flecha). **86**
- Figura 19.** Cromatofolios de los extractos de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*, observados con Luz UV (A) $\lambda = 254$ nm, (B) $\lambda = 66$ nm, y

(C) revelado por calentamiento con sulfato cerico 1% en ácido sulfúrico 2 N. 1-Mammeas, 2-Ácido apetálico, 3-Calanólido B, 4-Canofilol, 5-Friedelina, QTP 1 y 2-Quimiotipos 1 y 2, SC-Colecta Soconusco y SV-Colecta Selva. **88**

- Figura 20.** Cromatogramas de los extractos de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de las colectas de Chiapas (Soconusco= SC y Selva= SV), y los quimiotipos (QTP1 y QTP2). (1) Calanólido B, (2) Calanólido C y (3) Ácido apetálico. **89**
- Figura 21.** Cromatograma de la fracción *F1* (Columna I). **91**
- Figura 22.** Cromatograma de la fracción *F2-41* (Columna I). **92**
- Figura 23.** Espectro de RMN ^1H de canofilol. **96**
- Figura 24.** Espectro de RMN ^1H de friedelina. **97**
- Figura 25.** Espectro de RMN ^1H de la fracción *FR5* (ácido apetálico, inofilum y calanólido*). **99**
- Figura 26.** Espectro de RMN ^1H de la fracción *FR7* (inofilum y calanólido*). **100**
- Figura 27.** Espectro de RMN ^{13}C de la fracción *FR7* (inofilum y calanólido*). **101**
- Figura 28.** Espectro de RMN ^1H del ácido apetálico. **104**
- Figura 29.** Espectro de RMN ^1H de la mezcla de calanólidos A, B y C con trazas de Inofilum. **107**
- Figura 30.** Espectro de RMN ^1H del 12-metoxi(-)-calanólido B. **111**
- Figura 31.** Espectro de RMN ^{13}C del 12-metoxi(-)-calanólido B. **112**
- Figura 32.** Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -Experimento HSQC- del 12-metoxi(-)-calanólido B. **113**
- Figura 33.** Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -Experimento HMBC- del 12-metoxi(-)-calanólido B. **114**
- Figura 34.** Espectro de Masas del 12-metoxi(-)-calanólido B. **115**
- Figura 35.** Espectro de RMN ^1H del (+)-inofilum P y 12-metoxi(+)-inofilum P*. **120**
- Figura 36.** Espectro de RMN ^{13}C del (+)-inofilum P y 12-metoxi(+)-inofilum P*. **121**
- Figura 37.** Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -Experimento HSQC- del (+)-inofilum P y 12-metoxi(+)-inofilum P*. **122**
- Figura 38.** Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -Experimento HMBC- del (+)-inofilum P y 12-metoxi(+)-inofilum P*. **123**

Figura 39. Espectro de Masas del (+)-inofilum P y 12-metoxi-(+)-inofilum P.	124
Figura 40. Espectro de RMN ¹ H de GUT-70.	126
Figura 41. Perfil CLAR-UV-EM de ácido apetalico, GUT-70, inofilum P, calanólido B y los derivados 12-metoxilados.	128
Figura 42. Cromatograma de la sub-fracción SF4-5.	129
Figura 43. Cromatograma de la sub-fracción SF6-5.	130
Figura 44. Cromatograma de la sub-fracción SF7-6.	131
Figura 45. Cromatograma de la sub-fracción SF2-7.	131
Figura 46. Cromatograma de la sub-fracción SF4-7.	132

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biogénesis de coumarinas y cromanonas (Ramiandrasoa <i>et al.</i> , 1983 y Gautier <i>et al.</i> , 1972; Sustaita-Aranda, 2006).	143
Esquema 2. Mamea A/BB como precursor hipotético de Inofilum B (Reyes-Chilpa <i>et al.</i> , 2004).	144

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Panorama mundial de la epidemia del VIH, 2011.	4
Tabla 2. Fármacos aprobados contra el VIH/SIDA, 2011.	12
Tabla 3. Actividad biológica de compuestos aislados de <i>Calophyllum brasiliense</i> .	43
Tabla 4. Actividad biológica de extractos de <i>Calophyllum brasiliense</i> .	44
Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular de las líneas tumorales humanas por los extractos orgánicos de hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i> : Soconusco y Selva, Chiapas.	76
Tabla 6. Toxicidad (CL ₅₀) de los extractos de hexano de las hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i> sobre <i>Artemia salina</i> : Soconusco y Selva, Chiapas.	78
Tabla 7. Evaluación de la respuesta conductual de los ratones antes y después de la administración del extracto de hexano de hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i> : Soconusco y Selva, Chiapas.	80
Tabla 8. Peso fresco de los órganos de los ratones tratados con el extracto de hexano de las hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i> de la colecta Soconusco, Dosis= 5.62 g/kg.	81
Tabla 9. Compuestos de las fracciones <i>F1</i> y <i>F2-41</i> (Columna I).	90
Tabla 10. Contenido de calanólidos B y C, y ácido apetalico de los extractos de hexano de las hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i> de la colecta Soconusco, Selva, QTP1 y QTP2.	134
Tabla 11. Contenido de coumarinas y cromanonas del extracto de hexano de las hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i> de la colecta Soconusco, Chiapas.	134
Tabla 12. Compuestos aislados de los extractos de hexano de hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i> colectados en México.	140

RESUMEN

Las especies del género *Calophyllum* son fuentes de dipiranocoumarinas, las cuales inhiben la transcriptasa reversa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (TR HIV-1). Los extractos de hexano de hojas de *C. brasiliense* de las colectas Soconusco (SC) y Selva (SV) de Chiapas (México) inhibieron la actividad de la transcriptasa reversa (TR) de VIH-1. El extracto de hexano de las hojas de *C. brasiliense* de la Región Soconusco presentó potente inhibición contra la TR VIH-1 ($CI_{50} = 30.2 \mu\text{g/ml}$) en comparación con la Región Selva ($CI_{50} = 47.9 \mu\text{g/ml}$), y aunque SC presentó una pobre resolución sobre la viabilidad celular sobre linfocitos humanos ($CC_{50} = 32.36 \mu\text{g/ml}$), no resultó tóxico en el crustáceo *Artemia salina* ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$), como tampoco en ratones ($DL_{50} = 1.99 \text{ g/kg}$). El estudio histológico de los ratones tratados a la más alta dosis del extracto de hexano SC reveló que no hay hepatotoxicidad, pero un incremento en el número de megacariocitos del bazo fue observado, sugiriendo un efecto inmuno-estimulante. Los perfiles CLAR-UV mostraron que los extractos de hexano de hojas de *C. brasiliense* de Chiapas son químicamente diferentes. El perfil químico por RMN y CLAR-UV-EM del extracto de hexano de la Región Soconusco mostró que contenía: canofilol, friedelina, ácido apetalico, (+)-calanólido A, (-)-calanólido B y (+)-calanólido C, (+)-inofilum P, así como los derivados 12-metoxi-(+)-inofilum P, 12-metoxi(-)-calanólido B y la cumarina tricíclica, GUT-70, las cuales se han identificados con actividad anti-TR VIH-1. El contenido de estos compuestos fue (+)-inofilum P > 12-metoxi(-)-calanólido B > isómero de GUT-70 > mezcla de calanólidos A, B y C > 12-metoxi-(+)-inofilum P > GUT-70 > (+)-calanólido D e isómeros > (+)-inofilum C y E e isómeros. Esta es la primera vez que (+)-inofilum P y los derivados metoxilados son aislados de *C. brasiliense*. Estos resultados sugieren continuar con los estudios del extracto para el desarrollo de un fitofármaco contra el VIH/SIDA.

ABSTRACT

Calophyllum species are sources of dipyrano-coumarins, which inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (HIV-1 RT). The hexane extracts of the leaves from *C. brasiliense* collected from Soconusco (SC) and Selva (SV) Region of Chiapas (México) inhibited the activity of reverse transcriptase of HIV-1. However, the hexane extract of the leaves from *C. brasiliense* of Soconusco Region showed potent anti-HIV-1 RT inhibition ($IC_{50}=30.2 \mu\text{g/ml}$) compared with Selva Region ($47.9 \mu\text{g/ml}$), but also SC showed poor resolution on cell viability of human lymphocytes ($CC_{50}= 32.36 \mu\text{g/ml}$), it was not to the crustacean *Artemia salina* ($LC_{50} >1000 \mu\text{g/ml}$) and neither toxic in mice ($LD_{50}= 1.99\text{g/kg}$). The histological study of the mice treated at the highest dose of the hexane extract SC revealed no alteration on hepatocytes, and an increase in the number of spleen megakaryocytes. HPLC-UV profiles showed that the hexane extracts of leaves from *C. brasiliense* collected from Chiapas are chemically different. The chemoprofiling analyzed by NMR and HPLC-UV-MS of the hexane extract from Soconusco Region showed to contain: canophyllol, friedelin, apetalic acid, (+)-calanolide A, (-)-calanolide B or costatolide, (+)-calanolide C, (+)-inophyllum P, as well as, 12-methoxy-(+)-inophyllum P, 12-methoxy-(-)-calanolide B and tricyclic coumarin, GUT-70, which have been identified with anti-RT HIV-1. The content of these compounds were (+)-inophyllum P > 12-methoxy-(-)-calanolide B > isomere of GUT-70 > calanolidos A, B y C mixture > 12-methoxy-(+)-inophyllum P > GUT-70 > (+)-calanolide D and isomers > (+)-inophyllum C and E and isomers. This is the first time that inofilum P and methoxylated derivatives are isolated from *C. brasiliense*. These results suggest this extract is suitable to continue studies for developing a phytodrug against HIV/AIDS.

1. INTRODUCCION

La pandemia del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) sigue constituyendo uno de los desafíos más importantes en enfermedades infecciosas de la Salud Pública. De acuerdo a datos del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA y la Organización Mundial de la Salud (ONUSIDA/OMS), el número estimado de personas que vivían con VIH en todo el mundo en 2010 alcanzó los 33.4 millones (ONUSIDA/OMS, 2011).

Desde que se reconoció el VIH/SIDA en 1983, se han aprobado 25 medicamentos para tratar esta infección (INFOSIDA, 2011; Hupfeld y Efferth, 2009). De los fármacos aprobados, 12 están enfocados a la inhibición de la transcriptasa reversa y 10 para la proteasa (INFOSIDA, 2011; Hupfeld y Efferth, 2009). Sin duda alguna, dentro del ciclo replicativo del virus, uno de los pasos más atractivos para contrarrestar la infección, es la transcripción reversa del ARN viral hacia la formación del ADN complementario, ya que estos fármacos representan 50% del total aprobados. Aunque estos fármacos han mostrado efectividad contra la infección y han permitido incrementar la esperanza de vida del paciente, también presentan limitaciones asociadas a riesgos con su uso prolongado, tales como trastornos metabólicos y reacciones farmacológicas cruzadas, además la inconsistencia en el tratamiento por parte del paciente es un factor para inducir resistencia viral (De Clercq, 2000); por lo que es necesario desarrollar nuevos

fármacos que permitan controlar el VIH/SIDA con menos efectos adversos. En este contexto, muchas investigaciones actualmente se enfocan a la búsqueda de productos naturales con actividad antiviral, los cuales no deben ser tóxicos para las células no infectadas. En la búsqueda de nuevos compuestos potencialmente útiles en el tratamiento de la infección por VIH-1, las especies de árboles tropicales del género *Calophyllum* (Clusiaceae o Guttiferae) son de especial valor, y han despertado gran interés desde que se aislaron de *C. teysmanii* los calanólidos, que son dipiranocoumarinas tetracíclicas activas contra la transcriptasa reversa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (TR VIH-1) (Kashman *et al.*, 1992). El compuesto líder es el (+)-calanólido A, el cual actualmente se encuentra en fase clínica II/III, por lo cual podría ser el primer fármaco de origen natural aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA, siglas en inglés) para el tratamiento del VIH (Butler 2005, 2008; Reyes-Chilpa y Huerta-Reyes, 2009).

En México, *C. brasiliense* es la única especie del género, sin embargo, se ha encontrado que esta especie no es químicamente homogénea, y al menos existen dos poblaciones con distinta composición química en las hojas, a las cuales se les denomina quimiotipos (QTP). El extracto de hexano del primer quimiotipo (QTP1) contiene coumarinas tipo mammea; mientras que el segundo quimiotipo (QTP2) produce principalmente cromanonas, tales como el ácido apetalico, y dipiranocoumarinas, tales como los calanólidos; solamente el quimiotipo 2 es

activo contra la TR VIH-1 (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b, 2004c; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004). Adicionalmente, ejemplares colectados en el estado de Chiapas muestran un patrón cromatográfico diferente a los anteriores, sin embargo, no se han caracterizado desde el punto de vista químico, farmacológico y toxicológico.

El desarrollo de un fitofármaco con propiedades anti TR VIH-1 requiere de la investigación de su perfil químico, farmacológico y toxicológico, por lo que la diversidad química de *C. brasiliense* resulta de suma importancia en la obtención de un fitofármaco, ya que se requiere de poblaciones con alto contenido de dipiranocoumarinas activas. Además el aprovechamiento sustentable de este recurso fitogenético permitiría a países en desarrollo, como México, aprovechar su riqueza natural en la posible solución a un problema de salud complejo como es el VIH/SIDA. Esto también ayudaría a la conservación de la especie, la cual está catalogada en México como en peligro de extinción (NOM-059-SEMARNAT-1999), además de la necesidad de impulsar el desarrollo de programas de investigación sobre los recursos bióticos nacionales (Reyes-Chilpa y Huerta-Reyes, 2009). Desde esta perspectiva, en el presente trabajo se determinó la composición química de las hojas de *C. brasiliense* de la Región Soconusco del estado de Chiapas, así como la actividad *in vitro* contra la TR VIH-1, su toxicidad *in vitro* (linfocitos humanos) e *in vivo* (ratones), el perfil neuro-farmacológico y el análisis anatomo-histopatológico de los órganos de los ratones expuestos al extracto de hexano.

2. ANTECEDENTES

2.1. La pandemia del Virus de Inmunodeficiencia Humana/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH/SIDA)

La pandemia del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) sigue constituyendo uno de los desafíos más importantes en enfermedades infecciosas de la Salud Pública. De acuerdo a datos del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA y la Organización Mundial de la Salud (ONUSIDA/OMS), el número estimado de personas que vivían con el VIH en todo el mundo en 2010 alcanzó los 33.4 millones, de las cuales 2.7 millones corresponden a nuevas infecciones. Aunado a esto, se estima que 2 millones de personas murieron a causa del SIDA; lo que significa que cada día más de 7000 personas contraen infección por VIH y más de 5000 fallecen a causa del SIDA (ONUSIDA/OMS, 2011) (Tabla 1).

Tabla 1. Panorama mundial de la epidemia del VIH, 2011

Número de personas viviendo con VIH	Total	33.4 millones [31.5 – 35.8 millones]
	Adultos	31.3 millones [29.2 – 31.7 millones]
	Mujeres	15.7 millones [14.2 – 17.2 millones]
	Niños menores 15 años	2.1 millones [1.2 – 2.9 millones]
Personas infectadas por el VIH	Total	2.7 millones [2.4 – 3.0 millones]
	Adultos	2.3 millones [2.0 – 2.5 millones]
	Niños menores 15 años	430 000 [240 000 – 610 000]
Muertes por SIDA	Total	2.0 millones [1.8 – 2.3 millones]
	Adultos	1.7 millones [1.4 – 2.1 millones]
	Niños menores 15 años	280 000 [150 000 – 410 000]

A nivel Latinoamérica, México ocupa ya el segundo lugar en personas infectadas con VIH/SIDA (ONUSIDA/OMS, 2011), y se estima que existen alrededor de 225, 000 personas infectadas (CONASIDA/CENSIDA, 2011), y el costo anual por tratamiento individual asciende a los 6000 dólares (CONASIDA/CENSIDA, 2011). Desde esta perspectiva el VIH/SIDA se ha convertido en un problema de Salud Pública complejo y de Seguridad Nacional, por lo cual es necesario llevar a cabo investigaciones que puedan ofrecer alternativas en la terapia contra el VIH/SIDA (González-Paredes, 2006).

2.1.1. Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

2.1.1.1. Características del VIH

A la fecha se conocen 2 tipos de VIH. Los estudios filogenéticos sobre el VIH-1 indican que está muy relacionado con el virus que de forma natural infecta a los chimpancés (SIVcpz), mientras que el VIH-2 está más emparentado con el virus que infecta a los monos mangabey (SIVsmm), por ello se cree que ha habido una transmisión cruzada de los virus que producen inmunodeficiencia de los monos a los humanos (Weiis *et al.*, 2000). En la presente tesis nos enfocamos solo a VIH-1.

El VIH pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia Lentiviridae; se trata de un retrovirus con un diámetro de 100 a 120 nm, cubierto por una membrana que rodea la cápside y la núcleo cápside de forma cónica (Luciw, 1996; Sierra *et al.*, 2005); es relativamente termosensible; puede alojarse en un segmento del

cromosoma del hospedador y permanecer latente durante muchas generaciones celulares. El genoma de este virus consta de tres genes (*gag*, *pol* y *env*) que codifican para proteínas estructurales y seis genes (*vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* y *nef*) que codifican para proteínas accesorias. Las proteínas estructurales son sintetizadas inicialmente como precursores de poliproteínas, que subsecuentemente son procesadas por proteasas virales o celulares hacia proteínas maduras. Las proteínas accesorias participan en procesos de regulación de la expresión/replicación viral (Luciw y Shacklett, 1993; Levy, 1998).

2.1.1.2. Ciclo replicativo del VIH

Existen dos tipos de células humanas linfoides que son blancos principales de la infección por VIH, los linfocitos T CD4+ y los macrófagos. El ciclo de multiplicación del VIH, es regulado tanto por proteínas virales como celulares. De forma esquemática se reconocen 7 etapas (Figura 1).

1) Acoplamiento y fusión de la membrana viral-celular. El virus interacciona con al menos dos tipos de receptores en la célula hospedadora; el receptor específico y común a todos los VIH-1 es una proteína que se encuentra en la superficie de la célula diana, denominada CD4+ se cree que esta molécula es específica y la afinidad de la gp120 viral por la CD4+ es mayor que la afinidad por su ligando natural, una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase

II. Las principales células que poseen este receptor son los linfocitos y los monocitos/macrófagos (CD4+) (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984).

Se han caracterizado otros co-receptores del virus como son los receptores celulares del tipo CC o CXC de ciertas quimioquinas (Fauci, 1996). El co-receptor CCR5 es utilizado principalmente por las cepas de VIH con tropismos por los monocitos, denominadas monocitotrópicas, mientras que el CXCR4 lo es para las que presentan linfocitotropismo (Cos *et al.*, 2004). Una vez que interaccionan la gp120 y los receptores, se produce la fusión entre las membranas celular y viral que tiene como responsable a la gp41, que se insertará en la membrana celular, permitiendo la internalización de la nucleocápside del virus y la desencapsidación de su genoma (Luciw, 1996).

2) Transcripción inversa o retrotranscripción. Tras la entrada del virus se inicia la replicación del virus (multiplicación) por transcripción inversa o retrotranscripción, mediada por la enzima transcriptasa reversa del virión y que conduce a la formación de la primera cadena de ADN a partir del ARN viral. La segunda cadena de ADN requiere la acción de la ribonucleasa H. La doble cadena así generada es integrada al genoma celular (Hu y Temin, 1990; Freed y Martin, 2001). La retrotranscripción es el principal proceso responsable de la diversidad antigénica del virus ya que la retrotranscriptasa carece de la actividad exonucleasa 3'-5', presente en las ADN polimerasas celulares, por lo que la tasa de mutaciones

es muy superior a la que se registra en células eucariotas. Se estima que el genoma viral experimenta de una a tres mutaciones por ciclo de replicación (Luciw, 1996).

3) Integración. Por medio de la integrasa viral, el ADN formado es acoplado al ADN de la célula, aunque parte del ADN formado puede persistir en el citoplasma de la célula sin integrarse dentro del genoma celular. Una vez integrado en el genoma celular el provirus puede permanecer latente o empezar a multiplicarse de una forma controlada o de una forma masiva, en cuyo caso ocasionará efectos citopáticos, mientras que en la latencia no se producen alteraciones patológicas (Pullen y Champoux, 1990).

4 y 5) Transcripción y Traducción. El ARN del virus sintetizado a partir del ADN proviral integrado en la célula, es el único que debe volver al citoplasma de la célula para procesarse en transcritos de diferente tamaño. Las primeras rondas de transcripción llevadas a cabo por la ARN polimerasa II celular sobre el ADN viral integrado, generan varios transcritos que migran al citoplasma mediante una vía independiente de Rev (Evans y Levy, 1993).

Durante esta fase de replicación temprana se producen múltiples cortes y empalmes de los ARNm, y sólo las proteínas regulatorias Tat, Nef y Rev se expresan. Cuando Rev alcanza niveles adecuados, se une a una estructura de los

transcritos denominada elemento de respuesta a Rev (RRE) facilitando su paso a través de la membrana nuclear y protegiéndolos de la escisión, de manera que se generan ARNm sin cortes o con uno solo que producen el ARN genómico y otras proteínas virales (Sierra *et al.*, 2005).

El gen *env*, que codifica para las proteínas de unión a CD4 (gp120) y para las proteínas virales transmembranales (gp41) se expresa inicialmente como una poliproteína precursora denominada gp160, esta es glicosilada dentro del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, donde una endoproteasa escinde la proteína para generar gp120 y gp41 (Luciw, 1996). Estas proteínas son transportadas por vesículas celulares hasta la membrana plasmática. Los genes *gag-pol* se traducen para generar la poli proteínas Gag y Gag-pol que son las precursoras de las 6 proteínas estructurales codificadas por *gag* y las proteasas, integrasas y retro-transcriptasas codificadas por *pol*. Estas poli proteínas son procesadas proteolíticamente durante la maduración (Sierra *et al.*, 2005).

6) Ensamblaje. Después de la traducción, las proteínas Gag y Gag-pol migran hacia la membrana celular y empiezan a ensamblarse dirigidas por Gag. Debido a que las proteínas virales se expresan sobre la superficie celular, se puede producir la fusión entre células infectadas y células sanas que expresen el receptor CD4 generando células gigantes multinucleadas (sincicios). La formación de sincicios constituye uno de los mecanismos de propagación del virus y es parcialmente

responsable de la disminución progresiva del número de linfocitos T característico del SIDA (Geleziunas y Greene, 2000).

Durante el ensamblaje de las partículas virales, se asocian las enzimas virales, el genoma viral y el cebador celular ARN^{t_{lys}} y otros compuestos celulares. De esta forma los viriones inmaduros geman a partir de la membrana plasmática, lo que activa la proteasa viral que escinde a las poliproteínas Gag y Gag-pol, liberando las proteínas estructurales y las enzimas (Sierra *et al.*, 2005). Todas ellas interactúan con las proteínas de la cápside y núcleo cápside para generar los viriones maduros.

7) El virión maduro. El proceso de ensamblaje y gemación requiere de la disminución del número de moléculas CD4 celulares para evitar su interacción con las proteínas gp120 recién sintetizadas. En este proceso intervienen las proteínas Env, Nef y Vpu. La primera se une a las moléculas de CD4 que pasan por el retículo endoplasmático durante su maduración, mientras que la segunda acelera la endocitosis y la degradación subsecuente de CD4. La proteína Vpu produce canales iónicos en la membrana plasmática que incrementan la tasa de liberación de virus (Luciw, 1996. Sierra *et al.*, 2005). La partícula viral madura está compuesta por una membrana, que incluye las proteínas virales gp120 y gp41, además de varias proteínas celulares, un centro que contiene ARN viral, las enzimas transcriptasa reversa e integrasa. Otras proteínas no son empaquetadas

en los viriones y sólo actúan en los pasos que preceden a la liberación de los virus. La vida libre de los viriones es muy corta, aproximadamente de 0.3-0.5 días (8 a 12 horas), y en 2.6 días se realiza un ciclo viral completo con salida desde la célula infectada hasta la infección de otro linfocito, multiplicación y salida de nuevos viriones (Flint *et al.*, 2000 y Goff, 2001).

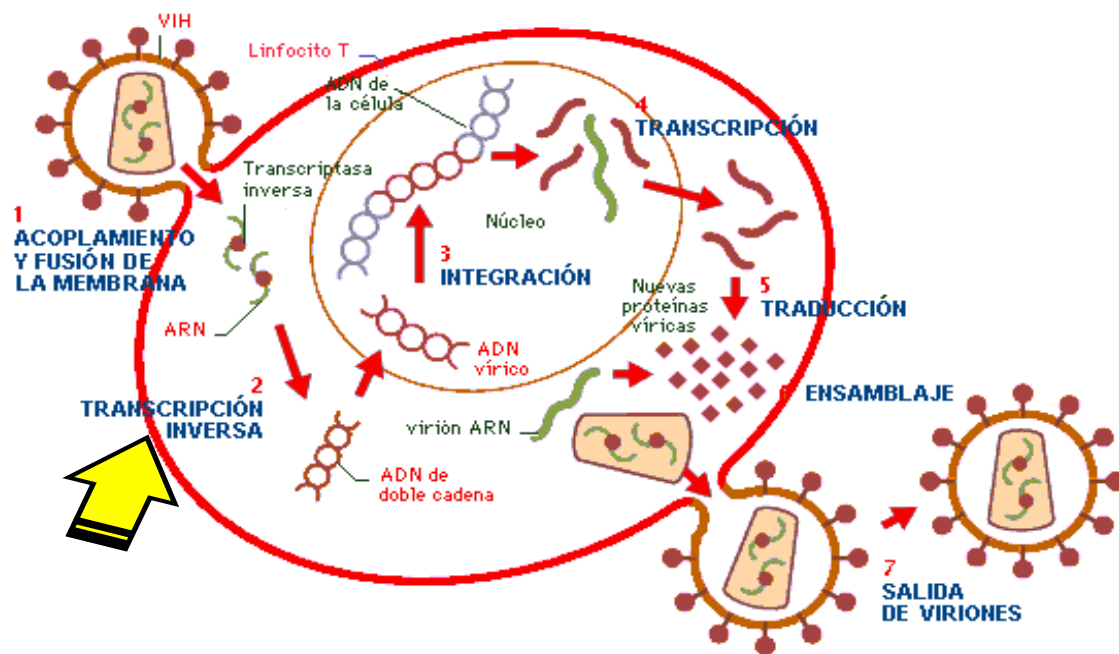


Figura 1. Ciclo replicativo del VIH (www.niaid.nih.gov).

Conociendo el mecanismo molecular mediante el cual el virus lleva a cabo su multiplicación, muchas investigaciones se han enfocado en el desarrollo de terapias que bloqueen algunos de los pasos antes descritos. Entre las líneas de investigación se encuentra el interés en estudiar cómo actúan los diferentes compuestos naturales con propiedades anti-VIH aislados de plantas.

2.2. Fármacos aprobados contra el VIH/SIDA

Actualmente existe diversidad de fármacos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, EUA) y respaldados por la OMS para emplearse en el tratamiento del VIH/SIDA (Tabla 2). Dichos fármacos pueden ser clasificados en cuatro grupos de acuerdo a sus mecanismos de acción: A) Inhibidores de transcriptasa reversa (ITR), B) Inhibidores de proteasa (IP), C) Inhibidores de la unión y la fusión (IF) y D) Inhibidores de la integración (II). Los ITR se dividen en dos grupos: 1) Análogos de nucleósidos (ITRN) y 2) No análogos de nucleósidos (ITRNN). Los ITR inhiben por interacción específica con el sitio activo o un sitio de unión alostérico de la enzima transcriptasa reversa (De Clerq, 2000); los IP se unen al sitio activo de la proteasa viral y evitan el procesamiento de las proteínas virales a enzimas funcionales; los IF evitan la unión y fusión virus-célula (Kilby *et al.*, 1998).

Tabla 2. Fármacos aprobados contra el VIH/SIDA, 2011

Inhibidores de la transcriptasa reversa	Inhibidores de la proteasa	Inhibidores de la fusión	Inhibidores de la Integrasa
Análogos de Nucleósidos	Ritonavir*	Enfuvirtida (T20)*	Raltegravir*
Zidovudina (AZT)*	Saquinavir*	Maraviroc*	
Didanosina (ddI)*	Indinavir*		
Stavudina (d4T)*	Amprenavir		
Lamivudina (3TC)*	Nelfinavir		
Abacavir (ABC)*	Lopinavir*		
Tenofovir*	Atazanavir*		
Emtricitabina*	Fosamprenavir*		
Análogos No-nucleósidos	Tripnavir*		
Delavirdina	Darunavir*		
Nevirapina*			
Efavirenz*			
Etravirina*			
Rilpivirina**			

*Cuadro básico de medicamentos (Secretaría de Salud de México, 2011), **Aprobado por la FDA en 2011 (INFOSIDA, 2011)

2.3. Productos naturales con actividad anti-VIH

Los productos naturales han proporcionado sustancias químicas potencialmente útiles en el tratamiento del VIH/SIDA, además de constituir moldes para diseñar y sintetizar nuevos fármacos. En la actualidad hasta 2011, han sido descritos alrededor de 164 productos naturales anti-VIH (Singh y Bodiwala, 2010). Estos han sido extraídos principalmente de plantas, pero también de bacterias, hongos, algas e invertebrados marinos y mamíferos (Huang *et al.*, 1997; Matthée *et al.*, 1999; Singh, 2005, Singh y Bodiwala, 2010; Vlietnick *et al.*, 1998). Los productos naturales anti-VIH presentan gran diversidad estructural y mecanismos de acción, entre ellos, terpenos, coumarinas, alcaloides, taninos, flavonoides, los cuales actúan sobre diversas etapas del ciclo replicativo (Huang *et al.*, 1997; Hupfeld y Efferth, 2009; Singh, 2005, Singh *et al.*, 2010; Vlietnick *et al.*, 1998) destacando aquellos que inhiben la actividad de la transcriptasa reversa (Matthée *et al.*, 1999).

2.4. *Calophyllum brasiliense* Cambess

El género *Calopyllum* (Clusiaceae o Guttiferae) está compuesto por cerca de 187 especies de árboles, que se distribuyen en las regiones tropicales del mundo, principalmente la región Indo-pacífica. Ocho especies del género se encuentran en el continente americano (Stevens, 1980). *Calophyllum brasiliense* es la de mayor distribución, principalmente en los bosques lluviosos tropicales, desde México hasta Argentina (Stevens, 1980; Pennington y Sarukhán, 1968; Rodríguez *et al.*,

2009). En cuanto a diversidad de especies de *Calophyllum* destacan Cuba con cinco (Bisse, 1981) y Colombia con tres (García-Barriga, 1992).

2.4.1. Historia

El género *Calophyllum* es complejo y difícil de clasificar. Los taxónomos que lo han estudiado experimentan confusión al tratar de establecer límites para diferenciar sus especies. En este sentido, *C. brasiliense* no es la excepción (Sustaita-Aranda, 2006). Etimológicamente, *Calophyllum* significa “hoja bonita” y *brasiliense* a “de Brasil” por su origen geográfico (Ferreira 1975, citado en Do Souza, 2006). Es conocida trivialmente como: bari, palo santa maría (México); cedro maría (Centroamérica); ocuje (Cuba); bari (Rep. Dominicana); dalemarie (Haiti); jacareuba, guanandi o guarandi (Brasil) y balsamaría (Bolivia), entre otros (Buffon-Isaias, 2005; Chudnoff, 1984; Echenique-Manrique, 1970; Noldin *et al.*, 2006; OFI-CATIE, 2008; Ortega-Escalón *et al.*, 1991; Splitter, 1997).

Calophyllum brasiliense fue descrita por vez primera por Jacobo Cambessedes en 1827, en “*Flora Brasiliae Meridionalis*”. En 1923, Paul C. Standley en su obra “*Trees and Shrubs of Mexico*” describe dos especies mexicanas de *Calophyllum*: *C. reko* Standl. en honor al Dr. Reko colector del espécimen y *C. chiapense* Standl. colectada en Chiapas (México). Sin embargo, en 1932, tras coleccionar especímenes en México, Centroamérica, Sudamérica y las Antillas, decide integrar la especie *C. chiapense* a la especie *C. reko* y reducir esta última a una variedad

geográfica de *C. brasiliense*, nombrando al taxón México-Centroamericano como *C. brasiliense*, var. *rekoi* Standl (Sustaita-Aranda, 2006).

Años después, D'Arcey y Keating (1979), como resultado de los estudios de las poblaciones de *Calophyllum* americano, consideran que el taxón México-Centroamericano es una especie y no una variedad de *C. brasiliense*, por lo cual retoman el nombre original de la especie *C. rekoi* (Sustaita-Aranda, 2006). En un estudio más reciente, Hammel (2001) reconoce en "flora de Nicaragua" al taxón México-centroamericano como *C. brasiliense* var. *rekoi* Standl. Se considera que *C. brasiliense* es la especie más importante del continente americano y probablemente que este taxón es el origen de todos (o la mayoría) de los otros taxa americanos de este género (Sustaita-Aranda, 2006). En el siguiente cuadro se muestra la clasificación taxonómica actual de *C. brasiliense*.

Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

Phylum: *Tracheophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Hypericales*

Familia: *Clusiaceae (Guttiferae)*

Subfamilia: *Calophylloideae*

Tribu: *Calophylleae*

Género: *Calophyllum*

Especie: *Calophyllum brasiliense* Cambess (1825)

Basado en Flores *et al.*, 2008

2.4.2. Botánica

Morfología. *Calophyllum brasiliense* es un árbol de 20 a 30 m (hasta 50 m) de altura y diámetro a la altura del pecho de 40 a 60 cm (hasta 1.8 m), de tronco cilíndrico y recto con ramas ascendentes de copa redondeada, extendida y densa (Joker y Salazar, 2000; Kearns *et al.*, 1998; OFI-CATIE, 2008; Pennington y Sarukhán, 1968) (Figura 2). La corteza es una capa externa longitudinalmente fisurada, pardo morena a café, laminada, fibrosa, amarga con un exudado lechoso intensamente amarillo y grosor de 10 a 20 mm. La madera de duramen de color rosa claro a café rojizo, frecuentemente marcado por bandas finas más oscuras de parénquima; la albura es de un espesor aproximado de 3.5 a 6.5 cm de color claro, la zona de transición entre albura y duramen está bien definida. Su textura es parecida a la caoba (Chudnoff, 1984; Kearns *et al.*, 1998; Pennington y Sarukhán, 1968).

Las hojas son coriáceas, decusadas, elípticas u oblongas, simples, opuestas, glabras, con el margen entero, ápice agudo; haz verde oscuro y brillante, envés verde pálido; venas secundarias numerosas y paralelas; laminas de 6 x 2.5 cm a 14 x 5.5 cm (Kearns *et al.*, 1998; OFI-CATIE, 2008; Pennington y Sarukhán, 1968). Presenta Inflorescencias en forma de panículas axilares, de 2 a 5 cm de largo, sus flores son pequeñas, numerosas y blancas, cada una con 2-10 flores; esta especie es andromonóica, es decir, puede presentar flores masculinas y bisexuales en el mismo árbol, ligeramente perfumadas actinomórficas, 4 sépalos, crema-amarillos,

redondas y cóncavas (Joker y Salazar, 2000; Kearns *et al.*, 1998; OFI-CATIE, 2008; Pennington y Sarukhán, 1968). Los frutos son drupas de 1 a 3 cm de largo, ovoides o esféricos, verde-amarillo, en la madurez de olor fragante, con el endocarpio duro, y una semilla grande por fruto. El endocarpio contiene fibras que se contraen y arrugan cuando seco (Kearns *et al.*, 1998; OFI-CATIE, 2008; Pennington y Sarukhán, 1968), contienen semillas esféricas u ovoides de 1 a 2.3 cm de largo y ancho, testa color crema-café, suave, esponjosa de 1 mm de grosor; el embrión es recto, de color blanco-amarillos, sin endospermo, ocupando toda la cavidad de la semilla, mide de 1.5 a 1.3 cm (Joker y Salazar, 2000; Pennington y Sarukhán, 1968; Kearns *et al.*, 1998).



Figura 2. El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*

Fenología. *Calophyllum brasiliense* es caducifolio. Algunos árboles tiran sus hojas en abril o mayo en las zonas más secas, pero en otros lugares las hojas permanecen (Joker y Salazar, 2000). La floración es anual, aunque en gran parte de su ámbito geográfico tiene lugar de junio a julio, pero en Centroamérica hay una segunda floración de noviembre a diciembre. En México ocurre de julio a diciembre, en Honduras de febrero a marzo y de agosto a septiembre, mientras que en Costa Rica sucede en mayo. La polinización es entomófila (Betancourt, 1987; OFI-CATIE, 2008; Splitter, 1997; Thirakul, 1992).

La producción de los frutos es anual y se inicia cuando el árbol tiene aproximadamente 5 años de edad. La fructificación ocurre de octubre a diciembre e incluso se pueden encontrar frutos hasta enero; en América Central puede ocurrir una segunda fructificación entre mayo y julio (en Honduras de marzo a abril y de septiembre a octubre y en Costa Rica de diciembre a febrero y de junio a julio). La diseminación de las semillas se realiza por animales silvestres quienes consumen los frutos, especialmente murciélagos (Quiropterócora) y son de tipo recalcitrante (Betancourt, 1987; Joker y Salazar, 2000; Splitter, 1997; Thirakul, 1992). Herrera *et al.* (2008) observaron que su índice de germinación es proporcional al contenido de humedad; así que debido a ello, la germinación varía entre 3 a 8 semanas y es de tipo hipogea, con dos cotiledones carnosos y radícula corta. Tiene un porcentaje de germinación de 70 a 80 % sembradas sin endocarpio; con endocarpio quebrado 95 % y con el fruto entero 75 %.

2.4.3. Distribución y hábitat

Calophyllum brasiliense se encuentra desde el nivel del mar hasta 1700 msnm, con precipitaciones de 1350 a 4000 mm y temperaturas medias anuales de 20 a 28 °C. Crece en las faldas de pequeñas colinas con suelos aluviales, arcillosos o sílico arcillosos, muy húmedos o saturados de agua y ácidos (pH 4.5 a 6.0) e incluso en suelos secos. En América Central vive en las faldas de colinas costeras. Estos suelos son ricos en hierro y aluminio, pero pobres en potasio y fósforo. También se encuentra en planicies cercanas a ríos, lagunas y ciénegas, pero ahí su crecimiento es menor (Chudnoff, 1984; Betancourt, 1987; Joker y Salazar, 2000; OFI-CATIE, 2008; Splitter, 1997; Thirakul, 1992).

2.4.4. Etnobotánica

Algunas partes de la planta son usadas en la medicina tradicional por su actividad en diversas afecciones que incluyen actividad antimicrobiana, gastro-protección, analgesia, diabetes, entre otros. En Brasil, esta planta es usada frecuentemente en la medicina popular para el tratamiento de inflamaciones y úlceras (Da Silva *et al.*, 2001). La corteza es empleada en forma de infusión o como baños en el tratamiento de reumatismo, várices, hemorroides y úlceras (Sartori *et al.*, 1999). También se emplea en el tratamiento de afecciones hepáticas, gástricas, dolor, diabetes, hipertensión y herpes (Pretto *et al.*, 2004). En Perú, se dice es empleada por la población para tratar afecciones virales y tumorales (Flores *et al.*, 2008). En México, se ha reportado que en la cuenca del Río Balsas (Guerrero) se emplea el

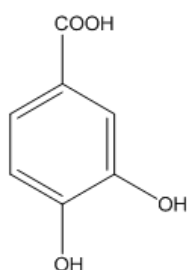
aceite de semillas para combatir enfermedades cutáneas (González-Paredes, 2006); mientras que en la sierra de Átoyac (Guerrero) se utiliza la corteza para preparar un té que se da de beber a las parturientas por nueve días para limpiar la matriz (Soto-Núñez, 1995). El látex es usado por los indígenas de Popoluca (Sur de Veracruz) para tratar el dolor de dientes y prevenir infecciones por microorganismos (González-Paredes, 2006).

2.5. Fitoquímica

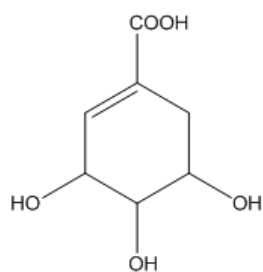
Los compuestos aislados del árbol tropical *C. brasiliense* pueden clasificarse de acuerdo a sus componentes, en seis grupos principales: compuestos fenólicos simples, triterpenos, flavonoides, xantonas, cromanonas, y coumarinas, las cuales se subdividen en tipo mammea, dipiranocoumarinas tetracíclicas y tricíclicas.

2.5.1. Compuestos fenólicos simples

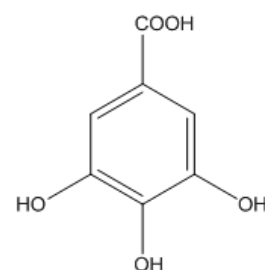
Este tipo de compuestos se han aislado de las hojas, en donde se ha reportado la presencia de viperina, ácido gálico, ácido protocatechuico (Buffon, 2005; Cechinel-Filho, 2009; Da Silva *et al.*, 2001; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004) y ácido shikímico (Brenzan *et al.*, 2007; Cechinel-Filho, 2009; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004). El ácido gálico y protocatechuico, también se han aislado de los frutos (Buffon-Isaias, 2005), mientras que este último también se ha aislado de los extractos de flores, raíces y tallos (Buffon-Isaias, 2005; Noldin *et al.*, 2006; Pretto *et al.*, 2004). A continuación se presentan las estructuras de estos compuestos.



Ácido protocatechuico



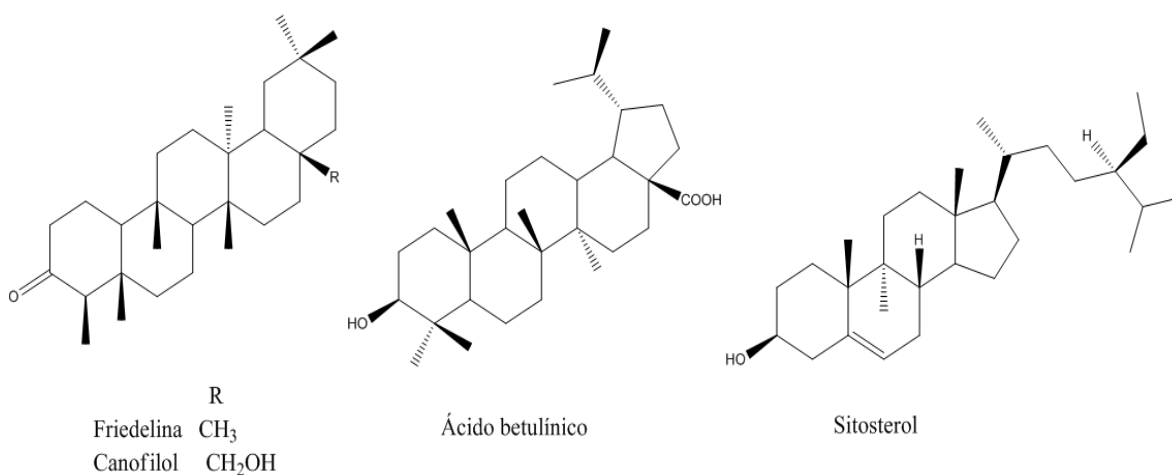
Ácido shiquímico



Ácido gálico

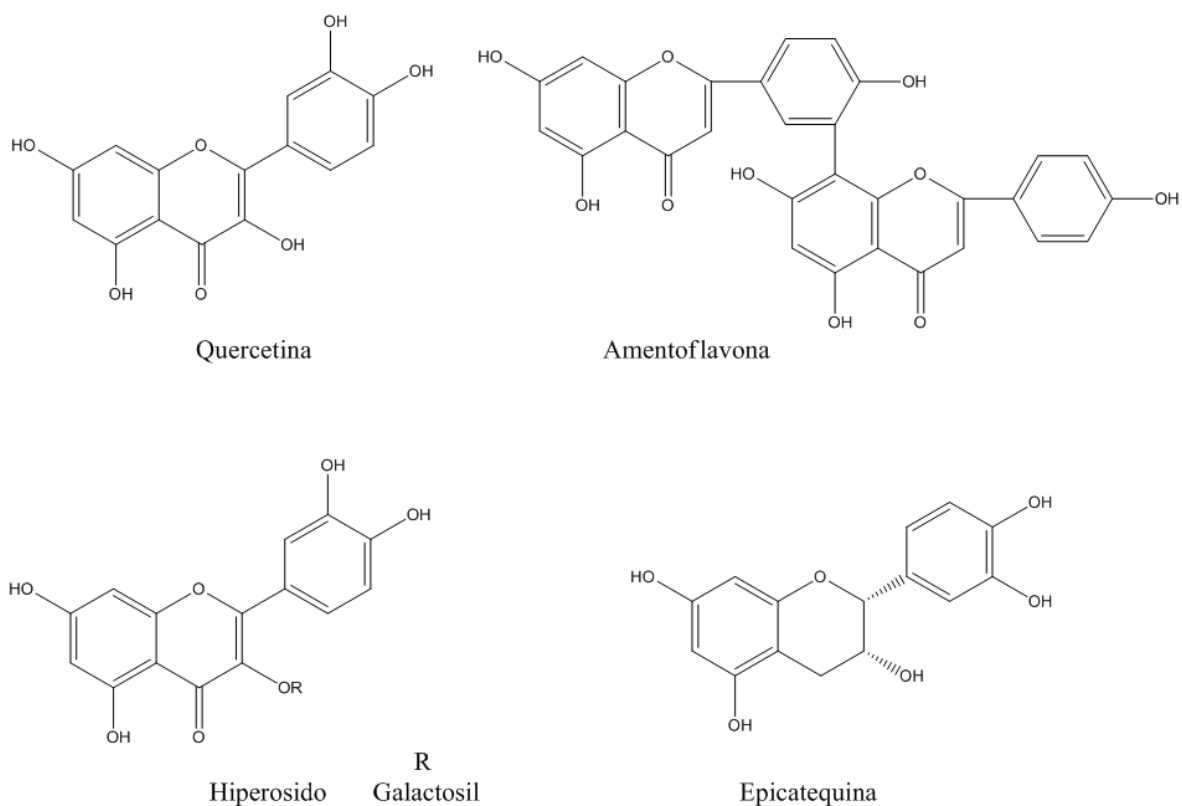
2.5.2. Triterpenos y esteroides

Los triterpenos, friedelina y canofilol, de la familia de los friedelanos se han aislado del duramen (Pereira *et al.*, 1966; 1967; Reyes-Chilpa *et al.*, 1997; Estrada-Muñiz, 2001; Abe *et al.*, 2004). En las hojas además de estos dos triterpenos se ha identificado el β -sitosterol (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b, 2004c; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004; Buffon-Isaias, 2005; Noldin *et al.*, 2006). En sus raíces se ha encontrado friedelina y ácido betulínico (Brenzan *et al.*, 2008; Cechinel-Filho, 2009). Las estructuras de estos compuestos se presentan a continuación.



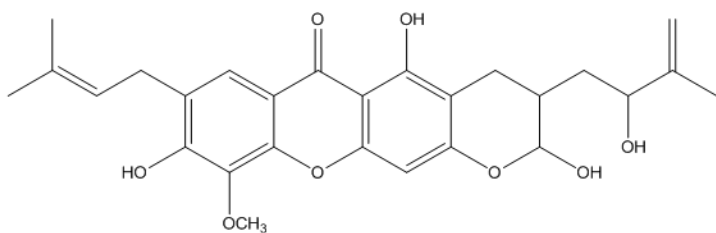
2.5.3. Flavonoides

En las hojas se ha reportado la presencia de los flavonoides, hiperósido (quercetin-3-O-galactósido) y quercetina, el flavanol (±)-epicatequina, estos últimos también identificados en frutos (Buffon-Isaias, 2005). De los extractos de hojas y flores se ha aislado el biflavonoide, amentoflavona (Da Silva *et al.*, 2001; Buffon-Isaias, 2005; Cechinel-Filho, 2009; Huerta-Reyes *et al.*, 2004b, 2004c; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004). A continuación se muestran las estructuras de estos compuestos.

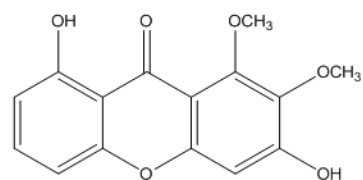


2.5.4. Xantonas

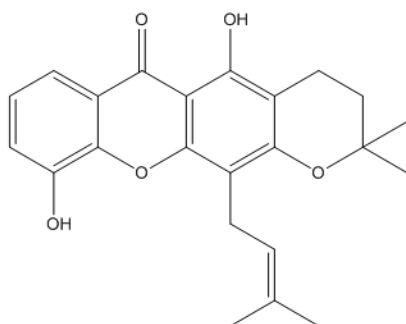
Son sustancias con una estructura núcleo C6-C1-C6. Sobre ella pueden existir sustituyentes de diversa naturaleza química dando lugar a distintos tipos de xantonas: simples y complejas. Estudios con la madera de duramen proveniente de ejemplares colectados en Brasil (Pereira *et al.*, 1966; 1967) y con la madera de un ejemplar de México (Chiapas), han sido realizados (Reyes-Chilpa *et al.*, 1997; 1999; Estrada-Muñiz, 2001). La muestra mexicana presentó cinco xantonas preniladas, mientras que la de Brasil contenía ambas. Las xantonas preniladas de la muestra mexicana fueron: jacareubina, 6-desoxijacareubina (=6-oxijacareubina), 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)xantona, 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)xantona y 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-metoxixantona (Reyes-Chilpa *et al.*, 1997; 1999). También se ha aislado calofilina B o guanandina y dehidrocicloguanandina (Gottlieb *et al.*, 1968 citado en Xiao-Hui *et al.*, 2008). En la corteza de muestras de Brasil se encontraron: brasixantonas A, B, C, D, E, F y G (Buffon-Isaias, 2005; Ito *et al.*, 2003; Noldin *et al.*, 2006), jacareubina, 6-dehidroxi jacareubina, piranojacareubina, toxiloxantona A, 3,8-dihidroxi-1,2-dimetoxixantona, 1,2-dimetoxixantona, garcinina B, 8-desoxigartanina, 4-hidroxixantona, cudraxantona F, latisxantona C y 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3-metil-2-butenil)xantona (Abe *et al.*, 2004; Brenzan *et al.*, 2008; Buffon-Isaias, 2005; Noldin *et al.*, 2006; Cechinel-Filho, 2009). En raíces, 1,5-dihidroxixantona (Buffon-Isaias, 2005; Noldin *et al.*, 2006). Las estructuras de estos compuestos se muestran a continuación.



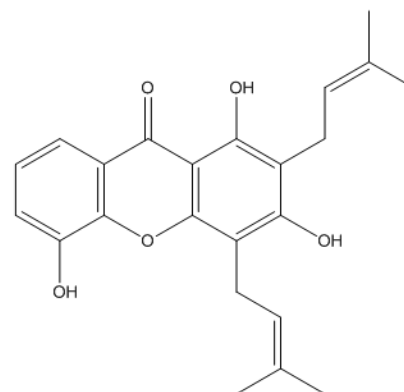
Brasixantona G



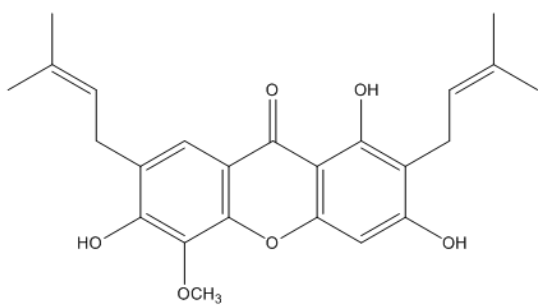
3,8-dihidroxi-1,2-dimetoxixantona



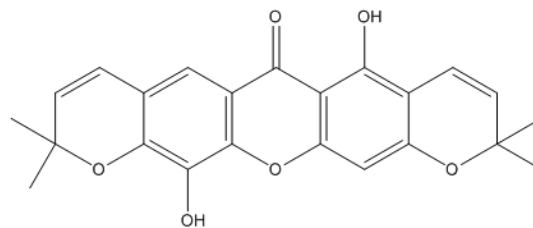
Toxiloxantona A



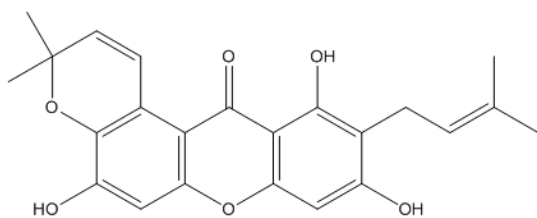
8-desoxigartani



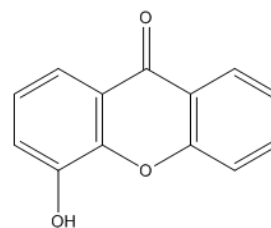
Cudraxantona F



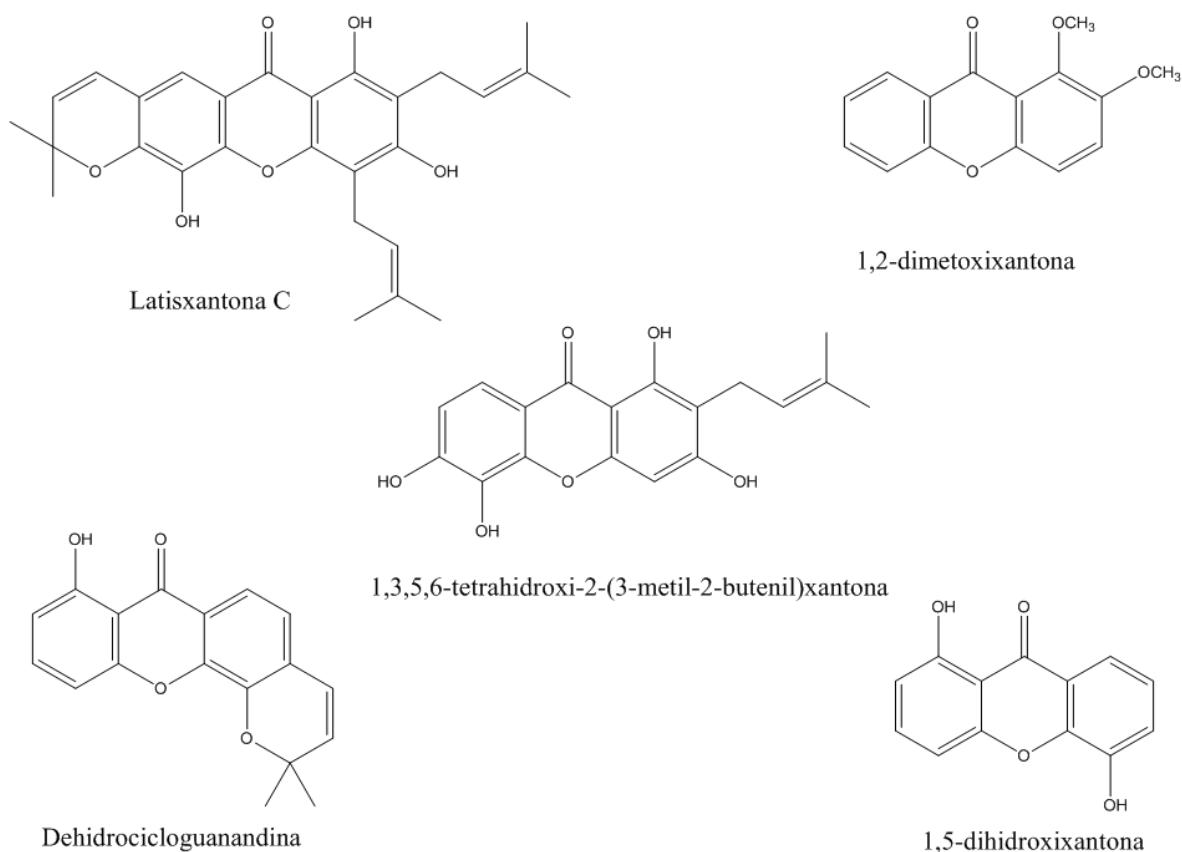
Piranojacareubina



Garcinina B

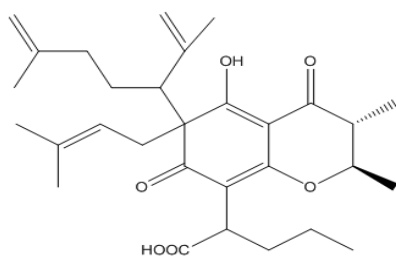


4-hidroxixantona

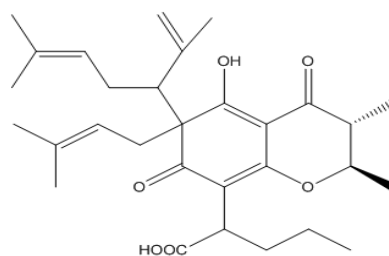


2.5.5. Cromanonas

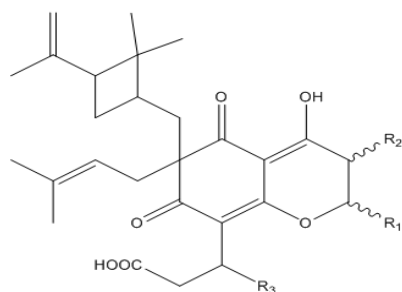
De la resina de la corteza se aislaron dos isómeros: el ácido brasiliensico y el ácido isobrasiliensico (Buffon-Isaias, 2005; Cechinel-Filho *et al.*, 2009; Noldin *et al.*, 2006; Stout *et al.*, 1968); ácido brasiliemsofilico A, B y C e isobrasiliemsofilico A, B y C (Cottglia *et al.*, 2004). En el aceite de la semilla se encontraron ácido apetalico e isoapetalico (Plattner *et al.*, 1974); mientras que en las hojas se ha reportado, además de estas dos cromanonas, su isómero estructural, el ácido calolóngico (Brenzan *et al.*, 2008; Cechinel-Filho, 2009; Huerta-Reyes *et al.*, 2004b, 2004c; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004). Loss cuales se muestran a continuación.



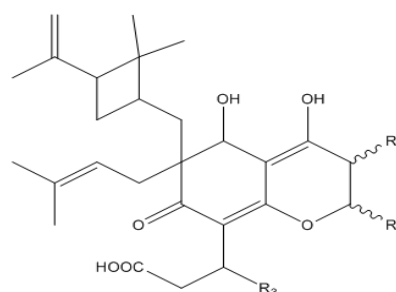
Ácido brasiliensico



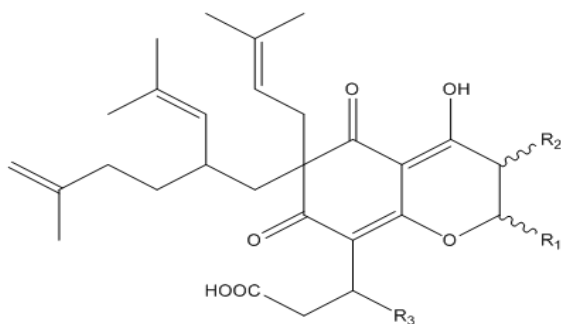
Ácido isobrasiliensico



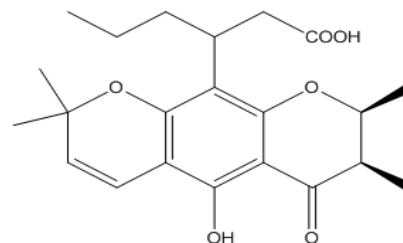
	R ₁	R ₂	R ₃
Acido brasiliensofilico A	α-CH ₃	β-CH ₃	-Fenil
Acido isobrasiliensofilico A	β-CH ₃	β-CH ₃	-Fenil



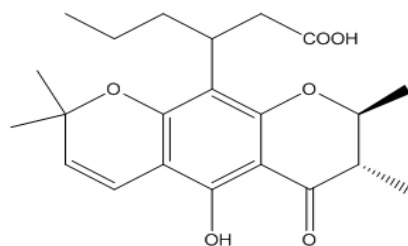
	R ₁	R ₂	R ₃
Acido brasiliensofilico B	α-CH ₃	β-CH ₃	-Fenil
Acido isobrasiliensofilico B	β-CH ₃	β-CH ₃	-Fenil



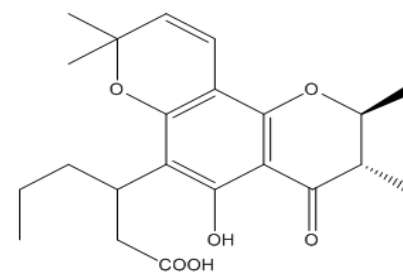
	R ₁	R ₂	R ₃
Acido brasiliensofilico C	a-CH ₃	b-CH ₃	-Fenil
Acido isobrasiliensofilico C	b-CH ₃	b-CH ₃	-Fenil



Ácido apetalico



Ácido isoapetalico

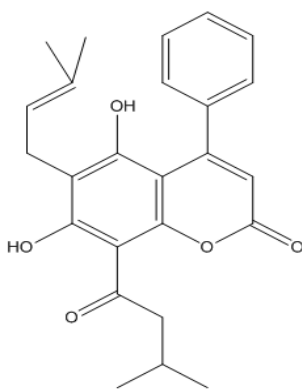


Ácido calolónico

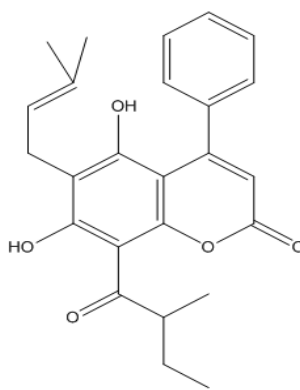
2.5.6. Coumarinas

Compuestos con esqueleto benzo- α -pirona (2H-1-benzopiran-2-ona) denominado coumarina (Xiao-Hui *et al.*, 2008).

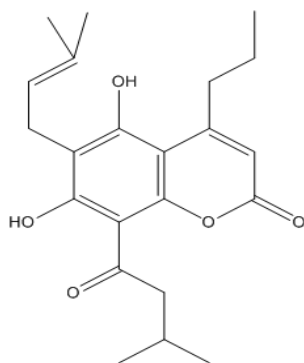
Coumarinas tipo mammea. En extractos de hojas se ha encontrado las mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/OA, C/OB, B/BA ciclo F, B/BB ciclo F e isomammeigina (Brenzan *et al.*, 2007; Cechinel-Filho, 2009; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004). De los frutos se han aislado, mammea A/BA, A/BB, epi A/BB (González-Paredes, 1999). Las estructuras de los compuestos se presentan a continuación.



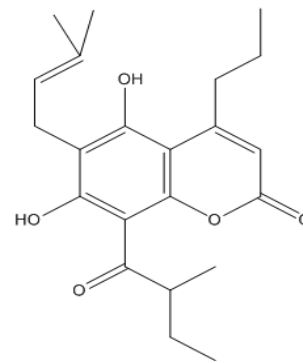
Mammea A/BA



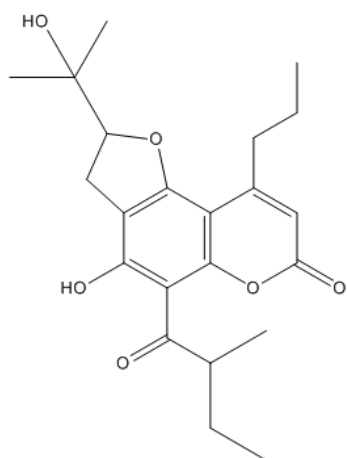
Mammea A/BB



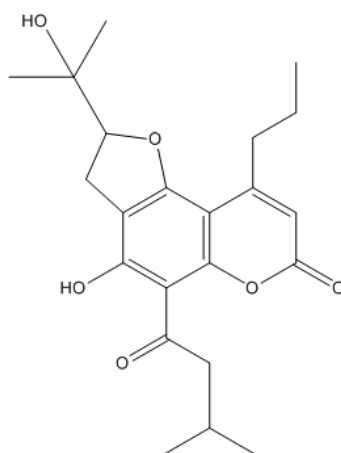
Mammea B/AB



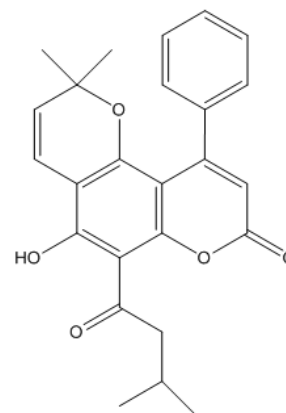
Mammea B/BB



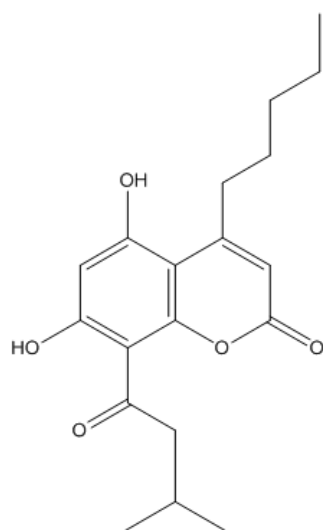
Mammea B/BB ciclo F



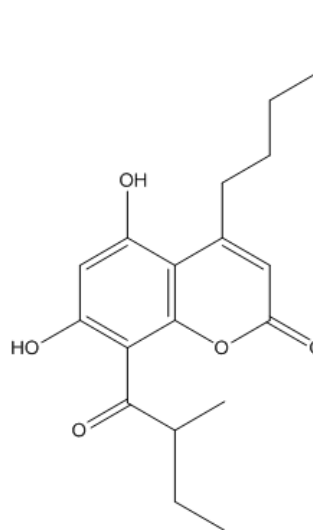
Mammea B/BA ciclo F



Isomammeigina



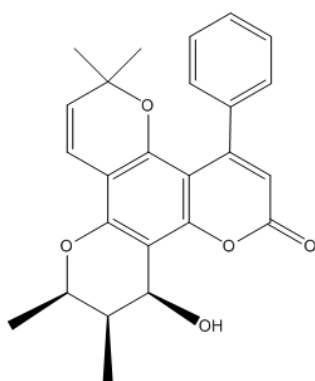
Mammea C/OA



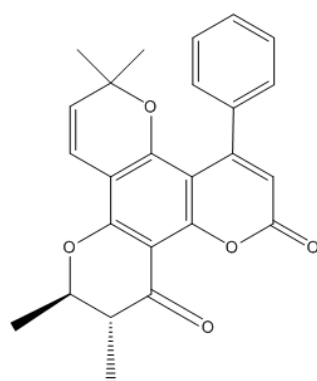
Mammea C/OA

Dipiranocoumarinas tetracíclicas y coumarinas tricíclicas. Las dipiranocoumarinas tetracíclicas están estructuralmente relacionadas entre sí. Estos compuestos difieren en el sustituyente del carbono C4, de tal manera que se han descrito 4 grupos denominados: inofilums (fenilo en C-4), calanóidos (prenilo en C-4), y cordatólidos (metilo en C-4) (Ishikawa, 2000). Los **inofilums** A,

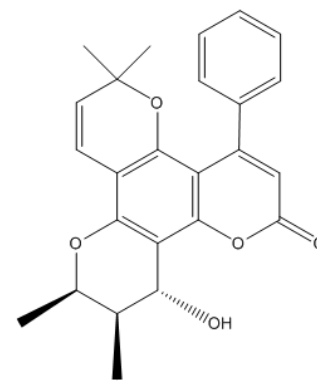
C, D y E se han extraído de los extractos de la corteza de ramas de muestras de Brasil (*Ito et al.*, 2003). Los **calanólidos**: (+)-calanólido A, (-)-calanólido B o costatólido, (+)-calanólido C, y el soulatrólido se han aislado de los extractos de hojas de muestras de México y Brasil (*Brenzan et al.*, 2007; *Huerta-Reyes et al.*, 2004b, 2004c; *Reyes-Chilpa et al.*, 2004). A continuación se presentan las estructuras de estos compuestos.



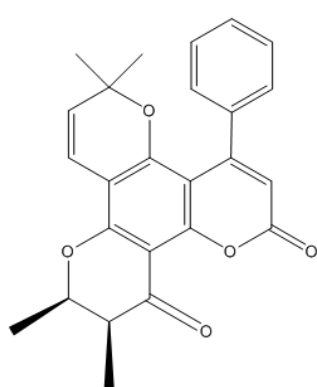
Inofilum A



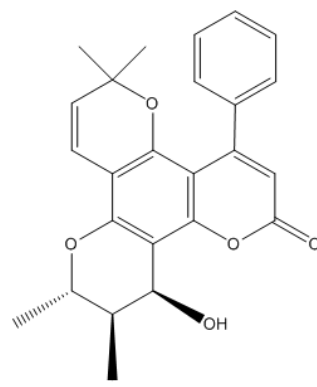
Inofilum C



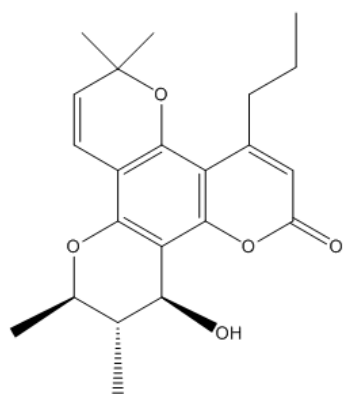
Inofilum D



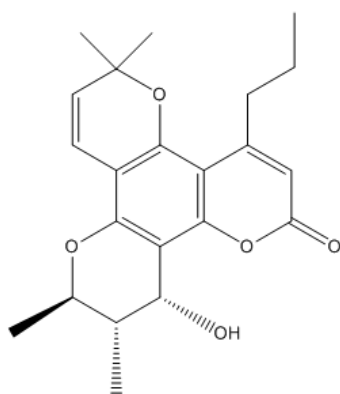
Inofilum E



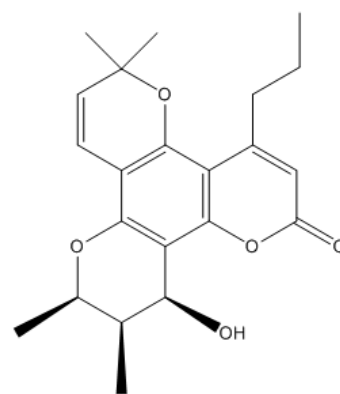
Soulatrólido



Calanolido A

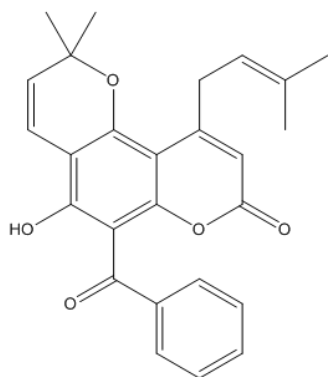


Calanolido B

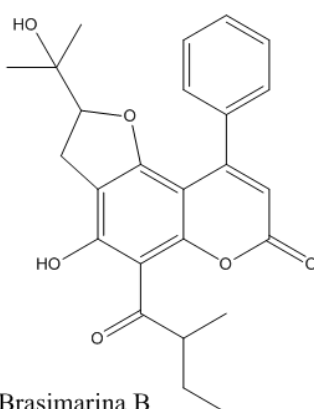


Calanolido C

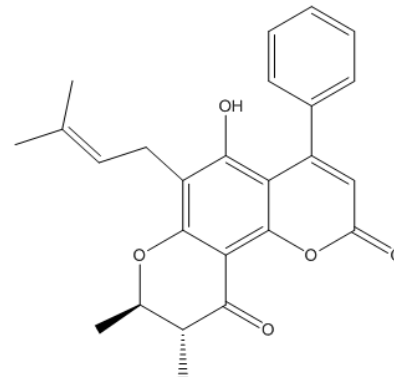
Otras coumarinas aisladas de este árbol tropical son las **brasimarinas** A, B y C, las cuales se han aislado de la resina de la corteza (Buffon-Isaias, 2005; Cechinel-Filho, 2009; Noldin *et al.*, 2006). La coumarina tricíclica, denominada trivialmente como GUT-70, (5-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metil-1-oxo-2-butenil)-10-propil-2H, 8H-benzol[1,2-b;3,4-b]dipirano-8-ona, se ha obtenido de la resina de la corteza (Ito *et al.*, 2003; Buffon-Isaias, 2005; Cechinel-Filho, 2009). Calofilolido, calanona y calocoumarina A, se han extraído de la corteza de las ramas (Ito *et al.*, 2003). A continuación se presentan las estructuras de los compuestos.



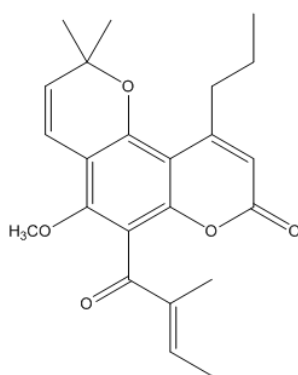
Brasimarina A



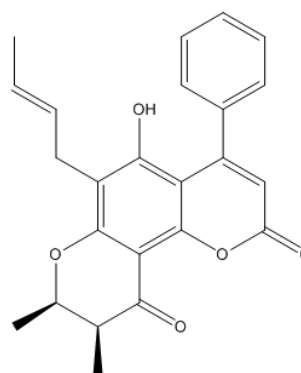
Brasimarina B



Brasimarina C



GUT-70



Calocoumarina A

2.6. Actividad biológica

Las investigaciones sobre los compuestos y extractos obtenidos de *C. brasiliense* indican que poseen diversas propiedades farmacológicas, destacando su actividad antiviral, antitumoral y antiprotozoaria; sin embargo, también presentan efecto gastroprotector, antiespasmódico, antinociceptivo y antibacteriano (Tabla 3 y 4). Los estudios se han enfocado en compuestos con actividad antiviral, por lo que con base en la información disponible de importancia, se dirige la atención en las propiedades anti VH-1 de los calanólidos, en especial del (+)-calanólido A.

2.6.1. Efecto gastroprotector

Los extractos orgánicos de la corteza de las ramas de *C. brasiliense* han mostrado actividad gastroprotectora (Buffon-Isaias, 2005; Sartori *et al.*, 1999). Por ejemplo, la administración oral en ratones y ratas de la fracción diclorometano en dosis de 12.5 a 250 mg/ml mostró potente inhibición de las lesiones gástricas inducidas por etanol, y también las redujo en modelos inducidos por estrés hipotérmico e

indometacina, observándose propiedades citoprotectora, antiúlceras y antisecretora. Por otra parte, la fracción de hexano inhibió significativamente la formación de úlceras únicamente en el modelo de inducción por indometacina.

2.6.2. Efecto antinociceptivo y analgésico

Las fracciones de hexano y acetato de etilo del extracto metanólico de las hojas de *C. brasiliense* exhibieron efecto analgésico en el modelo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético en ratones; en este mismo modelo los compuestos quercetina y amentoflavona causaron importante inhibición. Por otra parte, en el modelo de contorsiones inducidas con formalina, las fracciones antes mencionadas exhibieron actividad sólo en la segunda fase (inflamatoria) pero no en la primera (neurogénica) (Da Silva *et al.*, 2001).

En un estudio más reciente se observó que en los mismos modelos de contorsiones abdominales, tanto el extracto metanólico, como las fracciones polares y apolares de flores, frutos y raíces (10 mg/kg, v.i.p.) presentaron efecto analgésico significativo; este efecto se incrementó en las fracciones polares, en el modelo con ácido acético, esto posiblemente por la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides. En el caso de las raíces el extracto apolar fue más eficaz, mientras que la fracción polar fue más potente con $DI_{50} \approx 1$ mg/kg, cerca de 25 veces más activa que la aspirina (ácido acetilsalicílico) y el paracetamol (acetaminifeno), su efecto inhibitor fue dosis-dependiente. Los compuestos

friedelina y 1,5-dihidroixantona presentaron un efecto inhibidor dosis-dependiente de las contracciones abdominales. La epicatequina presentó un efecto analgésico considerablemente más potente que los fármacos de referencia, lo que indica que es uno de los compuestos responsables del efecto analgésico. El extracto de raíces, así como sus fracciones polar y apolar (10 mg/kg, i.p.) resultaron más efectivas en la segunda fase (inflamatoria) del modelo con formalina en comparación con los fármacos, ácido acetilsalicílico e indometacina (Buffon-Isaias, 2005; Isaias *et al.*, 2004).

2.6.3. Actividad antiespasmódica

Los extractos metanólicos de hojas, raíces, flores y frutos causaron un efecto inhibitorio significativo en la respuesta contráctil producida por la acetilcolina en ileon de cobayo, el cual ocurrió en forma no competitiva y dependiente de la concentración, con una CI_{50} de 1.47 mg/ml. También causó un efecto relajante en preparaciones de músculo liso de duodeno de rata, con una CI_{50} de 0.18 mg/ml (Emendörfen *et al.*, 2005).

2.6.4. Agentes antiparasitarios

Tripanosoma cruzi

Abe *et al.* (2004) investigaron la actividad del extracto metanol-acetona del duramen de *C. brasiliense* contra epimastigotes y tripomastigotes de *Tripanosoma cruzi*, cuasante de la enfermedad de Chagas. Aislaron cuatro xantonas de las

cuales jacareubina ($CM_{100} = 50 \mu\text{g/ml}$, $153 \mu\text{M}$), 6-desoxijacareubina ($MC_{100} = 50 \mu\text{g/ml}$, $161 \mu\text{M}$) y 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3-metil-2-butenil)xantona ($MC_{100} = 70 \mu\text{g}$, $213 \mu\text{M}$) presentaron actividad tripanocida; esta actividad se incrementa por la presencia de la función pirocatecol. También Reyes-Chilpa *et al.* (2008) llevaron a cabo bioensayos en *T. cruzi*, tanto en su etapa epimastigote como tripomastigote, encontrando que las coumarinas tipo mammea presentan mayor actividad contra epimastigotes que con los tripomastigotes, observando que las mammeas con sustituyentes isoprenilos en C6 presentan mayor actividad que cuando dicho sustituyente esta ciclizado.

La mayor actividad la presentó mammea B/BA ($MC_{100} = 15$ y $25 \mu\text{g/ml}$, respectivamente), seguido de mammea A/BA, A/BB, A/AA, y A/BD; mientras que mammea B/BA ciclo F, B/BB ciclo F y A/BA ciclo D (isomammeigina) fueron menos activas contra ambas etapas de *T. cruzi* ($CM_{100} > 200 \mu\text{g/ml}$). A diferencia de las mammeas, el control, cloruro de berberina, fue más potente contra tripomastigotes que epimastigotes ($CM_{100} = 7$ y $300 \mu\text{g/ml}$, respectivamente).

Leshmania amazonensis

Brenzan *et al.* (2008) realizaron bioensayos empleando extractos de diclorometano de hojas y una fracción de hexano de este extracto, los cuales mostraron actividad sobre las formas promastigotes y amastigotes axénicas de *Leishmania amazonensis* ($CI_{50} = 40 \mu\text{g/ml}$ y $3.69 \mu\text{g/ml}$, $17 \mu\text{g/ml}$ y $3.25 \mu\text{g/ml}$;

respectivamente). De la fracción obtenida con hexano se aisló la coumarina (-)-mammea A/BB, la cual presentó mejor actividad ($CI_{50}= 3 \mu\text{g/ml}$ vs. promastigotes y $0.88 \mu\text{g/ml}$ vs amastigotes), además resultó ser poco tóxica para los macrófagos J774G8 ($CC_{50}= 25 \mu\text{g/ml}$), esto significa que es selectiva para los protozoarios. Las formas promastigotes tratadas con este compuesto (72 h, $3 \mu\text{g/ml}$) exhibieron por microscopia electrónica de transmisión, alteraciones ultraestructurales como: células binucleadas, múltiple vacuolización del citoplasma, intensa actividad exocítica en la región de la bolsa flagelar y protuberancias en mitocondrias con presencia de membranas concéntricas en la matriz mitocondrial. Estos resultados son promisorios ya que los fármacos actuales empleados en el combate a la leishmaniasis son extremadamente tóxicos y los parásitos han desarrollado resistencia.

2.6.5. Agente moluscicida

Gasparotto *et al.* (2005) evaluaron la actividad de los extractos hidroalcohólicos de hojas y ramas colectadas en Brasil contra el molusco *Biomphalaria glabrata* que es un vector del protozoario *Schistosoma* sp causante de la elefantiasis. Los extractos a una concentración de 25 ppm causaron 100% de mortalidad del molusco. El compuesto aislado de estos extractos fue una coumarina denominada (-)-mammea A/BB, la cual presentó una DL_{50} de 0.67 ppm y DL_{90} de 1.47 ppm después de 24 horas, la cual es comparable en potencia con el moluscicida de referencia niclosamida ($DL_{50}= 0.77$ ppm y $DL_{90}= 1.75$ ppm). Es decir, puede ser un

sustituto potencial de esta sustancia que es utilizada en el combate de los hospederos intermediarios de *Schistosoma* sp.

2.6.6. Actividad contra levaduras

Flores *et al.* (2008) observaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Candida albicans* cuando fueron tratadas con extracto acuoso y etanólico (100 mg/ml y 200 mg/ml) de las hojas de *C. brasiliense* colectado en Perú. Por otro lado, Pretto *et al.* (2004) también evaluaron actividad de los extractos metanólicos de diferentes partes de este árbol colectado en Brasil, sobre *Candida albicans*, y *Candida tropicalis*, sin embargo no observaron actividad con los extractos metanólicos, como tampoco con las fracciones de cloroformo y acetato de etilo de estos extractos. Empero, el ácido protocatechuico a una concentración de 400-500 µg/ml (2.6-3.2 mM) mostró moderada actividad contra estos microorganismos.

2.6.7. Actividad antibacteriana

Pretto *et al.* (2004) prepararon el extracto metanólico de hojas, tallo, raíces, flores y frutos colectados en Brasil, así como las fracciones de cloroformo y acetato de etilo de estos extractos, y evaluaron su efecto sobre los microorganismos: *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*. Todos los extractos fueron activos contra una o más bacterias Gram-positivas (*B. cereus*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *S.*

agalactiae) en un rango de concentraciones de 100-1000 µg/ml, pero no observaron actividad contra las bacterias Gram-negativas (*E. cloacae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. typhimurium*). De los compuestos aislados de estos extractos, el ácido protocatechuico presentó actividad contra ambos grupos de bacterias; mientras que 1,5-dihidroxixantona únicamente fue activa contra bacterias Gram-positivas. Los compuestos ácido gálico, epicatequina y friedelina no exhibieron actividad microbicida.

Reyes-Chilpa *et al.* (2004) aislaron de las hojas los compuestos: mammea A/BA, A/BB, C/OA, C/OB, B/BA ciclo F, B/BB ciclo F, friedelina, canofilol y los ácidos protocatechuico y shikímico. La actividad inhibitoria fue realizada sobre 14 cepas de enterobacterias: *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC/029358, ETEC/050933), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC/28918), *E. coli* (ATCC/25922), *E. coli* agregativa (AGG/049766), *Salmonella typhi* (RRE/095426), *S. typhi* (ATCC/6539), *S. typhimurium* (074289), *Shigella dysenteriae* (Dys 3), *Staphylococcus aureus* (2 cepas), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC/27853), *Bacillus subtilis* y *S. epidermidis*; sin embargo, sólo la mezcla de mammea A/BA+A/BB y C/OA+C/OB redujeron el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Bacillus subtilis*, aunque en menor medida que el cloramfenicol.

2.6.8. Agentes antitumorales

Las xantonas aisladas de las ramas de *C. brasiliense* (colectado en Brasil), mostraron actividad citotóxica; siendo las brasixantonas A, B, C, D, 8-desoxigartanina y cuadraxantona F las que inhibieron el 100% la actividad de promoción del tumor en un modelo *in vitro* denominado TPA-activación inducida en EBV-EA en células Raji, la CI_{50} de las brasimarinas fueron 349, 342 y 348 mol/32 pmolTPA, respectivamente (Ito *et al.*, 2002; 2003; Buffon-Isaias, 2005).

Las coumarinas tipo mammea (mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/OA, C/OB, B/BA ciclo F, B/BB ciclo F e isomammeigina) mostraron citotoxicidad a 31 μ M en mayor o menor grado sobre tres líneas celulares de tumor humano (PC3, K562 y U251), mientras que la friedelina solo inhibió el crecimiento de PC3. Los compuestos canofilol, ácido shikímico y protocatechuico fueron inactivos. La alta actividad citotóxica está determinada por la presencia de un grupo propilo, pentilo o fenilo sobre C4. Por otro lado, la presencia de un sustituyente isoprenilo en C6 incrementa la citotoxicidad, pero disminuye si este se cicliza a dihidrofurano o pirano (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004).

2.6.9. Actividad antiviral (Anti-TR VIH-1)

Los calanólidos son dipiranocoumarinas tetracíclicas con potente actividad contra el VIH-1 causante del SIDA, actúan como inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa reversa. Existen diversos compuestos de este tipo, de los cuales el

más activo y ampliamente estudiado es el (+)-calanólido A. Dicho compuesto fue aislado por primera vez del árbol tropical *C. langinerum* de Malasia (Kashman *et al.*, 1992). El (+)-calanólido A es el compuesto líder de tres series de dipiranocumarinas tetracíclicas estructuralmente relacionadas, denominadas calanólidos (prenilo en C-4), inofilums (fenilo en C-4) y cordatólidos (metilo en C-4) (Kashman *et al.*, 1992; Patil *et al.*, 1993; Dharmaratne *et al.*, 1998, Ishikawa, 2000).

Las propiedades anti TR VIH-1 del (+)-calanólido A se describieron por primera vez mediante dos ensayos de viabilidad celular *in vitro* en células linfoblásticas T humanas infectadas con el virus (Kashman *et al.*, 1992). En el ensayo con XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilido), tetrazolium-formazan, detuvo la replicación del VIH-1 y confirió 100% de protección contra los efectos citopáticos ($CE_{50} = 0,1 \mu M$) del virus. La citotoxicidad del compuesto contra células no infectadas se manifestó a concentraciones 200 veces mayores ($CI_{50} = 20 \mu M$), resultando con un buen índice terapéutico ($CI_{50}/CE_{50} = 200$). Resultados similares se obtuvieron con un segundo método, estableciendo además que el (+)-calanólido A inhibía la actividad de TR y de la proteína viral gp24. También se demostró que inhibe específicamente la actividad de la TR VIH-1 mediante ensayos sobre moldes homopoliméricos de poliA y poliT. Sin embargo, el (+)-Calanólido A fue inactivo en células infectadas con VIH-2 (Kashman *et al.*, 1992). Además del (+)-calanólido A, se aisló (-)-calanólido B, el cual presentó actividad

anti VIH, pero requirió concentraciones cuatro veces mayores para lograr niveles de citoprotección equivalentes al (+)-calanólido A (Kashman *et al.*, 1992). El primer ensayo de actividad del (+)-calanólido A *in vivo* se realizó con un modelo de células CEM-SS humanas infectadas con VIH-1 IIIb, implantadas dentro de una fibra plástica hueca en ratón. El compuesto, administrado oral o parenteralmente, inhibió la replicación del virus (Xu *et al.*, 1999). Posteriormente se examinó su perfil de seguridad en animales, así como su farmacocinética en voluntarios humanos VIH negativos con dosis única (Creagh *et al.*, 2001). En los estudios clínicos de fase I, el (+)-calanólido A fue administrado en dosis de hasta 800 mg dos veces al día durante cinco días, encontrándose que era bien tolerado aunque se observaron efectos adversos transitorios de baja intensidad tales como mareo, cefalea, náuseas y mal sabor en boca. Los niveles en plasma fueron variables, pero a las dosis más altas se alcanzaron niveles de posible eficacia terapéutica (Eiznhamer *et al.*, 2002). Los estudios realizados indican que el (+)-calanólido A es un inhibidor no nucleosídico de la TR VIH-1, con características tales como: (Huerta-Reyes, 2004c; Reyes-Chilpa y Huerta-Reyes, 2009):

(a) Selectividad contra el VIH-1.

(b) Actividad contra cepas VIH-1 resistentes a AZT y 3TC, los cuales son dos de los fármacos ITRAN generalmente prescritos y cepas con la mutación Y181C (Tirosina por Cisteína), que confiere resistencia a la mayoría de los ITRNN, la cual

es una características única e importante de este compuesto, además no se presentaron cepas resistentes después de una monoterapia de 14 días en la fase clínica IB en pacientes infectados, sugiriendo que el (+)-calanólido A puede retardar la emergencia de mutaciones virales.

(c) En estudios preclínicos el (+)-Calanólido A presentó interacción sinérgica en combinaciones dobles (con AZT, 3TC o d4T), así como en combinación triple que involucra IP+ITRAN como nelfinavir + 3TC. Este sinergismo puede tener implicaciones terapéuticas importantes.

(d) Debido a su naturaleza lipofílica se distribuye rápidamente en el sistema nervioso central y sistema linfático, penetrando en los reservorios virales.

(e) No se presentan efectos adversos importantes, lo que significa que es bien tolerado por los humanos. La tolerancia favorable y el perfil farmacocinético del (+)-calanólido A, demostrados en la fase IA y IB, sugieren que puede ser desarrollado como un fármaco de ingesta de 1-2 veces por día, lo cual favorecería el apego de los pacientes al tratamiento.

(f) El (+)-calanólido A, es el único agente anti VIH que también inhibe el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (Xu *et al.*, 2004), una de las principales infecciones oportunistas en pacientes con SIDA.

Tabla 3. Actividad biológica de compuestos aislados de *Calophyllum brasiliense*

Compuesto	Parte de la planta	Actividad biológica/farmacológica
Triterpenos		
Friedelina	duramen, hoja y raíz	citotoxicidad /inhibición de tumores y analgesia
Flavonoides		
Epicatequina	hojas	antinoinceptivo (analgesia)
Brasixantonas A, B, C y D	ramas	citotoxicidad /inhibición de tumores
Jacareubina	duramen	tripanocida (<i>T. cruzi</i> / Chagas)
6-desoxijacareubina		
8-desoxigartanina,	ramas	citotoxicidad /inhibición de tumores
Cudraxantona F	ramas	citotoxicidad /inhibición de tumores
1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3-metil-2-butenil) xantona	corteza	tripanocida (<i>T. cruzi</i> / Chagas)
1,5-dihidroixantona	raíz	bactericida (<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. agalactiae</i>)
Coumarinas tipo mammea		
Mammea A/BA	hojas, flores y frutos	antileishmaniasis, citotóxico, antibacterial, antiespasmódica/relajante.
Mammea A/BB	hojas, flores y frutos	Antileishmaniasis, citotóxico, antibacterial, antiespasmódica/relajante
Isomammeigina	ramas	citotóxico
Mammea B/BA, B/BB,	hojas, flores y frutos	citotóxico/inhibición de tumores
Mammea B/BA ciclo F, B/BB ciclo F		
Mammea C/OA y C/OB	hojas, flores, frutos	bactericida y citotóxicas/inhibición de tumores
Mammea A/BA+A/BB	hojas	Bactericida (enterobacterias): <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> y <i>B. subtilis</i>
Mammea C/OA+C/OB		
Coumarinas tricíclicas		
(+)-Calanolido A, (-)-Calanolido B o Costatolido, (+)-Calanolido C y Soulatrolido	hojas, ramas, frutos	antiviral (TR VIH-1) y contra la bacteria oportunista <i>M. tuberculosis</i>
Compuestos fenólicos		
Ácido protocatechuico	hojas	Contra levaduras: <i>C. albicans</i> Bactericida: <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. agalactiae</i>

Tabla 4. Actividad biológica de extractos de *Calophyllum brasiliense*

Extractos	Parte de la planta	Actividad biológica/farmacológica
Diclorometano y hexano	corteza y hojas	Gastroprotección (citoprotección, antiulceración y antisecreción), antileshmaniasis
Hexano y acetato de etilo	hojas	antinoniceptivo (analgésico)
Metanol (fracción polar y apolar)	flores, frutos y raíz	analgesia (>>acido acetilsalicílico), antiespasmódica
Metanol-acetona	duramen	tripanocida (<i>T. cruzi</i> / Chagas)
Metanol, cloroformo y acetato de etilo	hojas, tallos, raíz, flores y frutos	Bactericida (<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. agalactiae</i>)
Hidroalcohol	hojas y ramas	Antileshmaniasis (<i>Leshmania amazonensis</i>)
Hexano, acetona y metanol	hojas	Antiviral (TR VIH-1) y contra la bacteria oportunista <i>Micobacterium tuberculosis</i>
Acuoso y etanol	hojas	fungicida/levadura (<i>Candida albicans</i>)

2.7. Estudios sobre *Calophyllum brasiliense* en México

En México se realizó un estudio bioprospectivo donde se evaluaron los efectos inhibitorios sobre la enzima TR VIH-1 de los extractos orgánicos de las hojas de 21 especies de Clusiaceae presentes en México, encontrando que la especie más activa fue *C. brasiliense*. Tanto el extracto de hexano (77.9 %) como el de acetona (81.3 %) y el de metanol (83.3 %) presentaron actividad contra la TR VIH-1 (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a). Como resultado del fraccionamiento bio-dirigido aislaron las dipiranocoumarinas: (+)-calanólido A, (-)-calanólido B, (+)-calanólido C

y soulatrólido. Estos compuestos fueron identificados como los responsables de las propiedades antiVIH (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b). Además, en dicho estudio el extracto de *C. brasiliense*, inhibió la replicación del VIH-1 en linfocitos CD4+ y resultó poco tóxico sobre linfocitos CD4+ cultivados *in vitro*. Curiosamente esta especie no había sido considerada como posible fuente de compuestos anti VIH en un estudio bioprospectivo previo, debido a que no presentó dipiranocoumarinas (calanólidos) (McKee *et al.*, 1998), lo cual pudo deberse a que en México, existen al menos dos quimiotipos (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004).

En efecto, en México se han descrito con base en la composición de las hojas dos poblaciones o variedades químicas de *C. brasiliense*. La primera, denominada quimiotipo 1, contiene como constituyentes mayoritarios coumarinas tipo mammea, tales como: mammea A/ABB, A/BB, B/BB, C/CA, COB, B/BA ciclo F y B/BB ciclo F e Isomammeigina (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004); mientras que el segundo quimiotipo presenta como componentes mayoritarios cromanonas, tales como: ácido apetalico y ácido isoapetalico, además sintetiza otros constituyentes minoritarios como las dipiranocoumarinas tetracíclicas, (+)-calanólido A, (-)-calanólido B, (+)-calanólido C y soulatrólido (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b). Ambos quimiotipos contienen los triterpenos friedelina y canofilol, así como el biflavonoide, amentoflavona. Se han analizado por cromatografía en capa fina los extractos de hexano de numerosos ejemplares colectados en la República Mexicana, encontrando que el quimiotipo 1 es escaso con pocos ejemplares y

tiene una distribución muy restringida, principalmente el sur de la región de los Tuxtlas en el Estado de Veracruz, y los Chimalapas en el Norte de Oaxaca. El quimiotipo 2 es abundante y tiene una distribución muy amplia en ambas vertientes, tanto del océano Pacífico (desde Jalisco hasta Oaxaca), como del Atlántico (Veracruz y Tabasco) (Figura 3). En estos estudios se detectó por cromatografía en capa fina un posible tercer quimiotipo, el cual muestra un patrón cromatográfico diferente a los dos anteriores y se distribuye principalmente en el Estado de Chiapas, aunque podría estar presente en Tabasco, Veracruz y Oaxaca (Fonseca, 2008). Este quimiotipo es el sujeto de estudio de este trabajo de investigación.

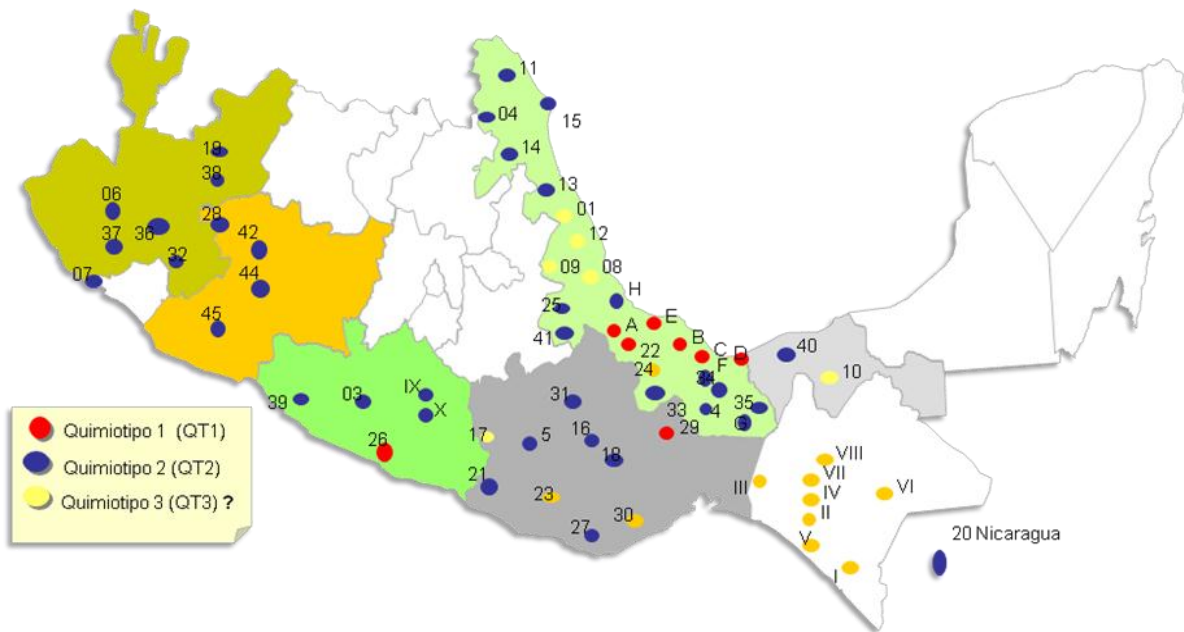


Figura 3. Distribución de poblaciones de *Calophyllum brasiliense* (Quimiotipos) en México (Fonseca, 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La especie *Calophyllum brasiliense* presenta dos poblaciones en México con diferente composición química (quimiotipos). A la fecha se conoce la composición química y farmacológica de estos dos quimiotipos (QTP1 y QTP2), pero la existencia de un posible tercer quimiotipo, distribuido principalmente en Chiapas. Con base en lo anteriormente mencionado nos planteamos lo siguiente: ¿Existe un tercer quimiotipo de *C. brasiliense* en México o es una variedad de los ya conocidos? y ¿los extractos orgánicos de las hojas de este posible quimiotipo o variedad inhiben la actividad de la transcriptasa reversa del VIH-1?; de tal manera que, la realización del presente trabajo permitirá determinar su caracterización química y evaluar las propiedades contra la transcriptasa reversa del VIH-1, tanto de los extractos orgánicos como de los compuestos aislados, así como la caracterización toxicológica del extracto más activo, de tal forma que se aporte en el conocimiento de compuestos de interés farmacológico, y que pueda incidir en su posible aprovechamiento y fuente potencial de fitofármaco o compuestos anti-TR VIH-1.

4. HIPÓTESIS

Calophyllum brasiliense Cambess del Estado de Chiapas posee en las hojas constituyentes químicos diferentes a los encontrados en los quimiotipos 1 y 2, los cuales presentan actividad inhibitoria contra la transcriptasa reversa del VIH-1.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la composición química y la actividad anti transcriptasa reversa del VIH-1 y toxicológica de los extractos de hojas de *Calophyllum brasiliense* del Estado de Chiapas.

Objetivos específicos

- a). Aislar e identificar los principales compuestos químicos presentes en las hojas de *Calophyllum brasiliense* de la Región Soconusco del Estado de Chiapas.
 - b). Cuantificar por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) los principales componentes presentes en las hojas de *Calophyllum brasiliense* de la Región Soconusco y Selva del Estado de Chiapas.
 - c). Evaluar la actividad inhibitoria de los extractos y compuestos de hojas de *Calophyllum brasiliense* de la Región Soconusco y Selva del Estado de Chiapas contra la transcriptasa reversa de VIH-1.
 - d). Evaluar el efecto tóxico *in vitro* en linfocitos humanos y en células cancerígenas de los extractos de hojas de *Calophyllum brasiliense* de la Región Soconusco y Selva del Estado de Chiapas.
 - e). Evaluar el efecto tóxico *in vivo* en el crustáceo *Artemia salina* y en ratones *Mus musculus* de los extractos de hojas de *Calophyllum brasiliense* de la Región Soconusco y Selva del Estado de Chiapas.
 - f). Estudio anatomo-histopatológico de órganos de los ratones tratados con los extractos de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de la Región Soconusco del Estado de Chiapas.
-

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se colectaron hojas de *Calophyllum brasiliense* Cambess en dos regiones del Estado de Chiapas, México: Soconusco y Selva. Los extractos orgánicos (hexano, acetona y metanol) de estas colectas fueron preparados. El aislamiento de los compuestos se realizó con el extracto de hexano de la colecta Soconusco mediante métodos cromatográficos, y su identificación se efectuó por punto de fusión (P.f.) rotación óptica (RO) y los métodos espectroscópicos siguientes: resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN ^1H y ^{13}C), infrarrojo (IR), y espectrometría de masas (EM). La cuantificación de los compuestos del extracto de hexano se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC, High Performance Liquid Chromatography) usando como referencias compuestos puros, y por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas mediante ionización por electro-espray (CLAR-EM (IEE)). La actividad de los extractos sobre la inhibición de la enzima Transcriptasa Reversa del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo1 (TR VIH-1), se evaluó mediante el ensayo de actividad Lenti-RTTM de acuerdo a lo descrito en la literatura (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a, 2004b, Huerta-Reyes, 2004c; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004). El efecto tóxico *in vitro* de los extractos más activos sobre linfocitos y células tumorales humanas, se evaluó mediante el ensayo MTT (Mossman, 1983) y Sulforrodamina B (Estrada-Muñiz, 2001; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004). El efecto tóxico *in vivo* de los extractos más activos se evaluó sobre el crustáceo, *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982; Mc Laughlin, 1991; Teng, 1993) y

ratones (*Mus musculus*) CD1 (Shetty Akhila *et al.*, 2007). Se realizó un perfil neurofarmacológico (Moscardo *et al.*, 2007) y se efectuó el análisis anatómo-histopatológico de los órganos de ratones tratados (Saleem *et al.*, 2005), para observar el efecto del extracto menos tóxico sobre los órganos de los ratones a la dosis más elevada.

6.1. Material biológico

Se colectaron hojas de *Calopyllum brasiliense* en las comunidades La Flor y San Javier, del Estado de Chiapas, México (Figura 4). La comunidad “La Flor”, se ubica en el municipio de Huehuetán, en la Región Soconusco, al sureste del estado de Chiapas, en la planicie costera; la vegetación que la rodea es selva mediana perenifolia, con suelo tipo andosol y fluvisol, el clima es cálido-sub-húmedo con lluvias en verano, y temperatura promedio anual de ~27°C (Salgado-Mora *et al.*, 2007). La comunidad “San Javier”, se encuentra en el municipio de Ocosingo, en la Región Selva, en la parte noreste del territorio chiapaneco; la vegetación que la rodea es selva alta perenifolia, con suelo predominantemente de acrisol húmico, el clima es cálido-húmedo con lluvias abundante en verano y otoño y temperatura promedio anual de ~25°C (Levy *et al.*, 2006). En la primera localidad la colecta se realizó en septiembre y octubre de 2008; mientras que en la segunda comunidad la colecta fue realizada en noviembre de 2008 por el biólogo Esteban Martínez. Un ejemplar (Soconusco) fue depositado en el herbario del IMSS con número 15523 y otro (Selva) en el herbario Mexu con número 1246548.

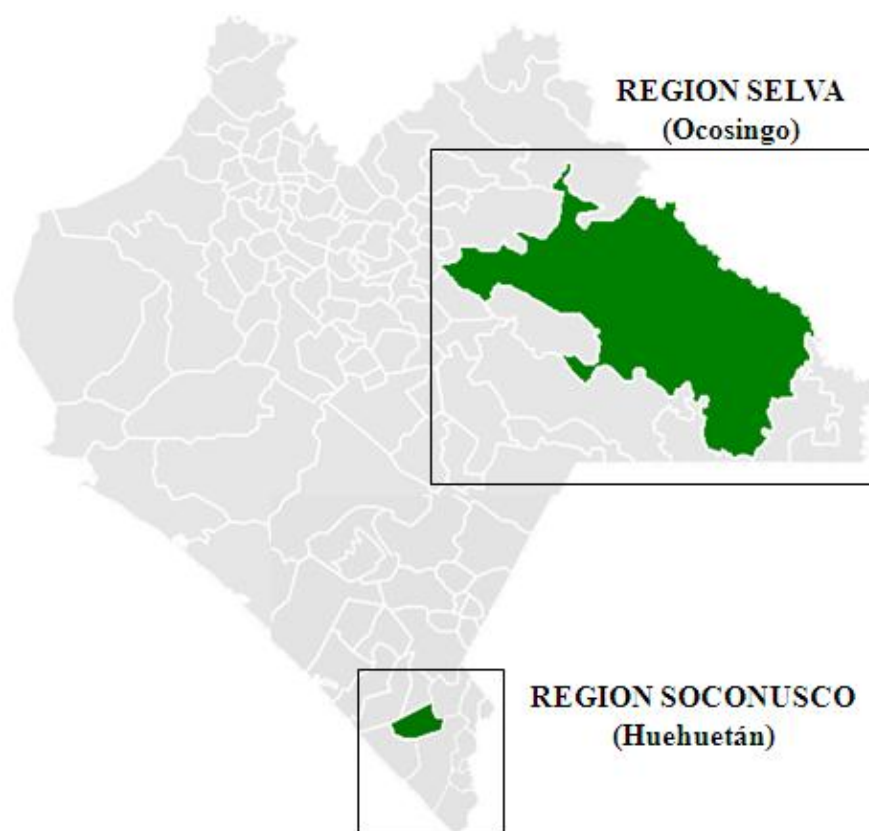


Figura 4. Ubicación de los sitios de colecta: Huehuetán (Región Soconusco), y Ocosingo (Región Selva), Chiapas, México.

6.2. Ensayos biológicos

6.2.1. Ensayo de actividad anti-transcriptasa reversa del VIH-1

Se examinó la posible actividad inhibitoria de los extractos orgánicos de las colectas Soconusco y Selva sobre la enzima TR mediante el ensayo Lenti-RT® Activity Assays (Cavidi Tech) (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a, b y Huerta-Reyes 2004c). Para ello se siguió el protocolo descrito por el fabricante, a fin de determinar el porcentaje de inhibición de los extractos hexánico, acetónico y metanólico de ambas colectas. Después de conocer la actividad de cada uno de

los extractos de las colectas, se procedió al fraccionamiento del extracto más activo de la colecta Chiapas (Soconusco) para determinar su composición química. En el caso de los extractos polares de metanol y acetona, se eliminaron taninos empleando una columna de poliamida mediante el procedimiento general previamente descrito (Tan *et al.*, 1991). Parte del extracto de metanol y acetona (500 mg) fueron disueltos en un volumen mínimo de H₂O. La columna de Poliamida C-200 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en polvo (50 g) fue saturada con agua y permaneció en reposo durante toda la noche. Después de ese tiempo se adicionó el extracto. La elución inicial fue con agua (50 ml), seguido de agua-metanol (1:1, 200 ml) y finalmente, metanol absoluto (500 ml). Los eluatos fueron colectados, combinados, concentrados y evaporados a sequedad. Estos extractos fueron evaluados para actividad anti TR VIH-1.

Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) anti-TR

Con base en el tamizaje hecho en el primer ensayo sobre actividad anti TR, se procedió a determinar la concentración Inhibitoria (CI₅₀) de los extractos de hexano y acetona de la colecta Soconusco y del extracto de hexano de la colecta Selva sobre la enzima TR mediante el ensayo Lenti-RT® Activity Assays (Cavidi Tech) (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a, b y Huerta-Reyes, 2004c). Para ello se siguió el protocolo descrito por el fabricante, para calcular la concentración de inhibición de los extractos mencionados. Los extractos fueron probados a siete concentraciones en un rango de 3.125 a 200 µg/ml, con incrementos logarítmicos

de 0.3 unidades. Los valores reportados son medias de tres replicas. La relación concentración-respuesta fue establecida por análisis de regresión lineal. Las ecuaciones fueron, para el caso de los extractos del Soconusco: $y=1.36x + 2.99$, $r^2=0.925$, $p<0.05$ (hexano), y $y=1.4x + 2.92$, $r^2=0.952$, $p<0.05$ (acetona); y para el extracto de hexano de la Selva: $y=0.511x + 4.14$, $r^2=0.990$, $p<0.05$.

6.2.2. Ensayo de viabilidad celular sobre linfocitos humanos

Se examinó la citotoxicidad en linfocitos humanos de los extractos orgánicos de las colectas Soconusco y Selva mediante el ensayo MTT (Mossman, 1983). Para ello se siguió el siguiente protocolo: en un tubo Falcon de 15 ml se depositaron 1 parte de Ficoll y 2 partes de sangre periférica obtenida por veno-punción de donadores sanos; se centrifugó a 2000 rpm por 25 min. Se recuperó el anillo de linfocitos en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) y se realizaron dos lavados en medio RPMI y se centrifugó 1500 rpm por 5 min en cada lavado. Se contaron los linfocitos y se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio RPMI complementado con suero autólogo o SFB (*Suero Bovino Fetal*) al 10 %, aminoácidos no esenciales y L-glutamina. Los linfocitos se sembraron en cajas de cultivo de 96 pozos (2.5×10^5 células/pozo) y se estimularon con fitohemaglutinina (PHA) (5 $\mu\text{g/ml}$) o con anti-CD3/CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$) y finalmente, se incubaron a 37 °C con 5 % CO_2 . Transcurridas 24 h de cultivo los linfocitos se trataron con los extractos orgánicos obtenidos de las hojas de *C. brasiliense* en concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó nuevamente por 48 h más; 4 h antes de

finalizar el periodo de incubación se adicionaron 20 µl/pozo de una solución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2 il)-2,5- difenil-tetrazolio) (5 mg/ml en PBS), transcurrido este periodo se eliminó el sobrenadante y se agregaron 100 µl de DMSO (dimetilsulfóxido). La viabilidad celular se analizó mediante el desarrollo de color en un lector de microplacas a 492/630 nm. Cada extracto se evaluó por triplicado. El criterio de toxicidad se basó en los valores obtenidos en el control sin tratamiento, el cual se considera como el 100 % de viabilidad celular y se estableció el porcentaje de citotoxicidad de los extractos vegetales evaluados.

Determinación de la Concentración Citotóxica 50 (CC₅₀)

La determinación de la CC₅₀ se realizó con el método descrito arriba, empleando diluciones seriadas en concentraciones entre 6.25 y 100 µg/ml, con incrementos logarítmicos de 0.3. Los valores reportados son medias de tres replicas. La relación concentración-respuesta fue establecida por análisis de regresión lineal. Las ecuaciones fueron, para el caso de los extractos del Soconusco: $y = -2.27x + 8.43$, $r^2 = 0.973$, $p < 0.05$ (hexano), y $y = -1.99x + 8.64$, $r^2 = 0.998$, $p < 0.05$ (acetona); y para el extracto de hexano de la Selva: $y = -2.13x + 8.35$, $r^2 = 0.995$, $p < 0.05$.

6.2.3. Ensayo de citotoxicidad sobre líneas celulares de carcinoma humano

Los extractos de hexano, acetona y metanol de ambas colectas fueron analizados para determinar el efecto citotóxico sobre el crecimiento en líneas celulares de carcinoma humano. Las pruebas se determinaron en cinco líneas celulares: Glía

de Sistema nervioso Central (U251), Próstata (PC-3), Leucemia (K652), Colon (HCT-15), Mama (MCF-7) y Pulmón (SKLU-1). El bioensayo se llevo a cabo mediante el método previamente descrito de la sulforrodamina B (Skehan *et al.*, 1990), brevemente, este método está basado en la tinción del enlace aniónico SRB a proteínas de células fijadas con 10 % de ácido tricloroacético, en placas de 96 pozos, el complejo proteína-SRB es solubilizado con un buffer Tris. El ensayo colorimétrico que se determina en un lector de ELISA a 515 nm para determinar la viabilidad celular. Las concentraciones de los extractos fueron de 50 µg/ml. Solamente aquellos extractos que inhibieron >50 % se consideraron activos.

6.2.4. Actividad tóxica sobre el crustáceo *Artemia salina*

Se determinó el efecto tóxico sobre *A. salina* de los extractos hexánicos de las colectas Soconusco y Selva siguiendo el protocolo reportado en la literatura (Meyer *et al.*, 1982; Mc Laughlin, 1991; Teng, 1993). Brevemente, el bioensayo consistió en colocar 10 organismos en cada tubo por triplicado. Los extractos se suministraron a tres diferentes concentraciones (10, 100 y 1000 µg/ml). Los crustáceos se mantuvieron 24 h a 28 °C en contacto con las muestras. Después de transcurrido ese tiempo, se contabilizaron los sobrevivientes y el resultado se expresó como CL₅₀.

6.2.5. Toxicidad aguda en ratones cepa CD1 (*Mus musculus*)

Solamente los extractos de hexano y acetona de la colecta Soconusco y hexano de la colecta Selva, los cuales mostraron mayor actividad anti TR HIV-1, fueron examinados para toxicidad aguda *in vivo*. Las pruebas de letalidad del extracto se realizaron en ratones machos (*Mus musculus*) cepa CD1 (Charles River) con pesos de 20-30 g, los cuales fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones fueron conservados en cajas ventiladas bajo condiciones estándar de luz/oscuridad (12 h con ciclos alternativos de día-noche) y temperatura de 27 ± 2 °C, y fueron criados con alimento comercial. El manejo y protocolo del ensayo se ajustó a lo descrito por Shetty Akhila *et al.* (2007), la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y a la guía internacional "Guide for the care and use of laboratory animals, 2011". La determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) fue realizada en un periodo de una semana. La vía de administración de los extractos fue intra-peritoneal (i.p.), usando como vehículo aceite de maíz (Mazola®). Las dosis suministradas de los extractos del Soconusco fueron de 5.62-0.562 g/kg con incrementos de 1/4 de logaritmo y para el extracto de la Selva fue de 0.316-1 g/kg, con incrementos de 1/6 de logaritmo. El grupo de ratones control neutral fue tratado con una solución salina al 0.9 % (SS). Los valores reportados son medias de seis replicas. La ecuaciones de regresión lineal para la relación dosis-respuesta fueron, para el caso de los extractos del Soconusco: $y=3.36x -2.74$, $r^2=0.973$, $p<0.05$ y $y=2.72x -$

1.14, $r^2=0.878$, $p<0.05$, para hexano y acetona, respectivamente; y para el extracto de hexano de la Selva: $y=5.14x -4.56$, $r^2=0.954$, $p<0.05$.

Perfil neuro-farmacológico. El efecto neurológico de los extractos en ratones control neutral y tratados fue analizado con el test de Irwin, 1968 (Moscardo *et al.*, 2007; Sadraei *et al.*, 2006). Las pruebas consistieron en observar los efectos neuro-farmacológicos que los ratones presentaron antes (1 h) y después de la administración de las dosis, en las primeras horas (1 h, 3 h y 5 h después). Las pruebas se centraron en evaluar el efecto sobre la coordinación, exploración y actividades motoras.

6.2.6. Análisis anatomo-histopatológico de los órganos de ratones

El extracto de hexano de la colecta Soconusco mostró la CI_{50} más baja y la DL_{50} más alta, por lo tanto, se realizó la necropsia de los ratones muertos a la dosis más alta (5.62 g/kg). Los ratones del grupo neutral control (SS) fueron sacrificados después de 72 h de acuerdo a lo descrito en las normas oficiales mexicanas e internacionales previamente descritas. Todos los órganos fueron examinados macroscópicamente. El peso fresco de todos los órganos (peso absoluto) fue determinado; y la razón del peso del órgano/peso del ratón (peso relativo) fue calculada (Saleem *et al.*, 2005). El análisis de los tejidos se realizó sobre los siguientes órganos: hígado, bazo y pulmón. El procesamiento de los órganos se llevo a cabo de la siguiente manera (Saleem *et al.*, 2005): (a) Fijación: este

proceso permite conservar el tejido en condiciones tan naturales como sea posible y fue llevado a cabo con un fijador histoquímico (que conserva composición molecular y bioquímica), la formalina cuya fórmula clásica consistió en formol al 10 % con solución buffer de acetato de sodio trihidratado (20 g/l). (b) Lavado e identificación: después de 24 h de fijación, los órganos se colocaron en agua destilada por 10 min, para eliminar el fijador y evitar que precipitara y provocará manchas en la preparación. A cada órgano específico se le asignó un número de identificación, y fue cortado en su eje transversal. (c) Deshidratación: los tejidos se sometieron a una técnica de deshidratación, cada uno de los segmentos de corte fue dispuestos en “cassettes” y colocado en el Histokinete (Histokinete 2000, Mod. YD-12G) el cual somete al tejido a pasar por alcoholes de concentración ascendente 30-100 %; todos los tejidos fueron procesados de acuerdo al manual del fabricante. (d) Inclusión: los cortes de cada órgano fueron incluidos en parafina. Se utilizó parafina, ya que con esta los cortes obtenidos son nítidos y se observa una morfología que permite un mejor diagnóstico. Cada tejido se colocó en un recipiente con parafina líquida con punto de fusión entre 56 a 58 °C, dentro de una estufa a temperatura fija, y posteriormente elaborar bloques, colocando los tejidos en un molde de acero inoxidable con parafina y colocando sobre este una cámara de plástico, vertiendo más parafina y llevándolo finalmente a la plancha refrigerante. Los bloques fueron retirados cuando estos se encontraban frío y se desprendían fácilmente de la cámara de plástico. (e) Corte: los tejidos inmersos en parafina fueron cortados mediante el uso de un microtomo eléctrico (Microm

HM335E) con un grosor de 5 a 8 μm . Estos cortes son colocados en el baño de flotación de agua caliente entre 48 a 50 $^{\circ}\text{C}$, extendiendo y disolviendo los cortes, los cuales fueron finalmente colocados en el portaobjetos y acomodados en una canastilla de metal, la cual se dejó 15 min en la estufa para que el tejido se adhiriera al portaobjetos. (f) Tinción y montaje: para dar características cromáticas a los tejidos se utilizó el método más clásico de tinción con hematoxilina-eosina; para ello se pasó el portaobjetos por la caja con la solución de colorante respectiva, finalmente se eliminó el exceso de colorante. Para hacer permanente la preparación se colocó una gota de medio de montaje (Bálsamo de Canadá) tapando esta con un cubreobjetos y dejando secar 20 min. Los cortes fueron observados y fotografiados en un microscopio ZEISS Axiostar plus modelo HBO50/AC, usando objetivos planos acromáticos (40X and 100X) acoplado a una cámara Canon Power Shoot G6 (7.1 Mpx).

6.3. Caracterización química

6.3.1. Comparación entre las colectas de Chiapas por CCF y CLAR

Cromatografía en capa fina (CCF). Extractos de hexano fueron preparados a partir de 2 g de hoja seca triturada de las colectas Soconusco y Selva. Se analizaron por cromatografía en capa fina (placa 10 x 10cm, Alugram Sil G/UV₂₅₄, silica gel 60 de 0.2 mm con indicador fluorescente UV_{254nm}). Se aplicaron 5 μl de cada extracto a una concentración de 50 mg/ml. Muestras puras de friedelina, canofilol, ácido apetalico, mammea A/BA-A/BB, calanólido B así como de los extractos de hexano

de hojas de los QTP's 1 y 2 se emplearon como referencia. El cromatofolio fue eluído con una mezcla de hexano:acetato de etilo (8:2). La placa fue observada bajo luz UV ($\lambda = 254$ nm y 366 nm), y revelada por calentamiento después de asperjar con sulfato cerico al 1% en ácido sulfúrico 2 N.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). El perfil cromatográfico de los extractos también fue obtenido mediante CLAR (HPLC) (Waters 1525 Binary HPLC Pump-Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector-Breeze Waters Program), usando una columna de fase reversa (Kromasil C18, 25 cm longitud, 0.4 cm diámetro y 5 μ m tamaño de partícula), y como fase móvil acetonitrilo:agua (60:40) a un flujo de 1.0 ml/min con una presión de 1600-1800 psi y una concentración de muestra de 0.75 mg/ml y detección mediante luz UV a 284 nm. Se emplearon como muestras de referencia ácido apetalico, y calanólidos B y C.

6.3.2. Preparación de extractos orgánicos de la colecta Soconusco

Con base en el análisis de la cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución y actividad anti transcriptas reversa de VIH-1, se procedió a realizar una fraccionamiento quimio-dirigido con la finalidad de separar los componentes, principalmente dipiranocoumarinas del extracto de hexano obtenido de las hojas de *C. brasiliense* de la colecta Soconusco. Las hojas se secaron a temperatura ambiente y se molieron (700 g). Los extractos fueron preparados por maceración con hexano, acetona y metanol. La extracción con cada solvente fue cada 72 h, se

filtró y se extrajo hasta agotamiento (hexano 10 veces, acetona 10 veces y metanol 6 veces). Los extractos orgánicos preparados con cada solvente fueron reunidos y concentrados al vacío en un rotavapor (Buchi R-205). Las condiciones de operación fueron: 69 °C y 80 rpm para hexano, 56 °C y 80 rpm para acetona, 64 °C y 80 rpm para metanol. El solvente residual fue evaporado en una cámara de vacío hasta sequedad a temperatura ambiente.

Durante la concentración del extracto de hexano se obtuvo un precipitado blanco en las paredes del matraz, el precipitado fue recuperado re-disolviendo con una mezcla de hexano:diclorometano (1:1). Este precipitado se analizó por cromatografía en capa fina (cromatofolio 10 x 10 cm), eluído con hexano:acetato de etilo (8:2). Se emplearon canofilol y friedelina como referencia. El cromatofolio fue observado bajo radiación UV ($\lambda = 254$ y 366 nm) y posteriormente revelado por calentamiento después de la aspersion con sulfato cerico. Sin embargo, ninguna mancha fue observada con luz UV, pero al revelar con sulfato cerico se observó una mancha con $R_f = 0.4$ correspondiente con la referencia, canofilol. El punto de fusión experimental del precipitado fue de 279-284 °C similar al reportado para este compuesto 282-284 °C. Con base en estos resultados se procedió a determinar su rotación óptica y analizarlo mediante métodos espectroscópicos: RMN ^1H y ^{13}C , IR y EM.

Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos respecto a hojas secas fue de 3.16 % para hexano, 7.07 % para acetona y 8.27 % para metanol.

6.3.3. Aislamiento de compuestos

6.3.3.1. Columna I: Cromatografía en columna en fase normal

El extracto de hexano seco (15 g) se re-suspendió en diclorometano y adsorbió con celita (5X). La mezcla seca fue sometida a cromatografía en columna utilizando como adsorbente sílica gel (20X, malla 70-230, Merck). La elución se realizó con hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones de polaridad creciente (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 50:50, 30:70 y 0:100), posteriormente se continuó eluyendo con acetato de etilo-metanol en diferentes proporciones de polaridad creciente (100:0, 80:20, 50:50, 0:100) (Figura 5). Se colectaron fracciones de 100 ml y se concentraron mediante rotavapor (Büchi R-205). Las fracciones concentradas fueron depositadas en viales. El disolvente residual se evaporó a temperatura ambiente. Se obtuvieron 128 fracciones, cuya coloración varió del amarillo-naranja al verde.

Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina (cromatofolios: 5 x 20 cm, sílica gel 60, Alugram Sil G/UV₂₅₄, de 0.2 mm con indicador fluorescente UV_{254nm}). Se aplicaron 2-3 µl de cada fracción en el cromatofolio. La elución se realizó con hexano:acetato de etilo, o bien acetato de etilo:metanol en un

gradiente de polaridad creciente similar al usado para cromatografía en columna. La placa se observó bajo luz UV ($\lambda = 254$ y 366 nm), posteriormente se reveló por calentamiento después de revelar con sulfato cerico 1% en ácido sulfúrico 2 N (Figura 6). Estas fracciones se reunieron con base en la similitud de su Rf.

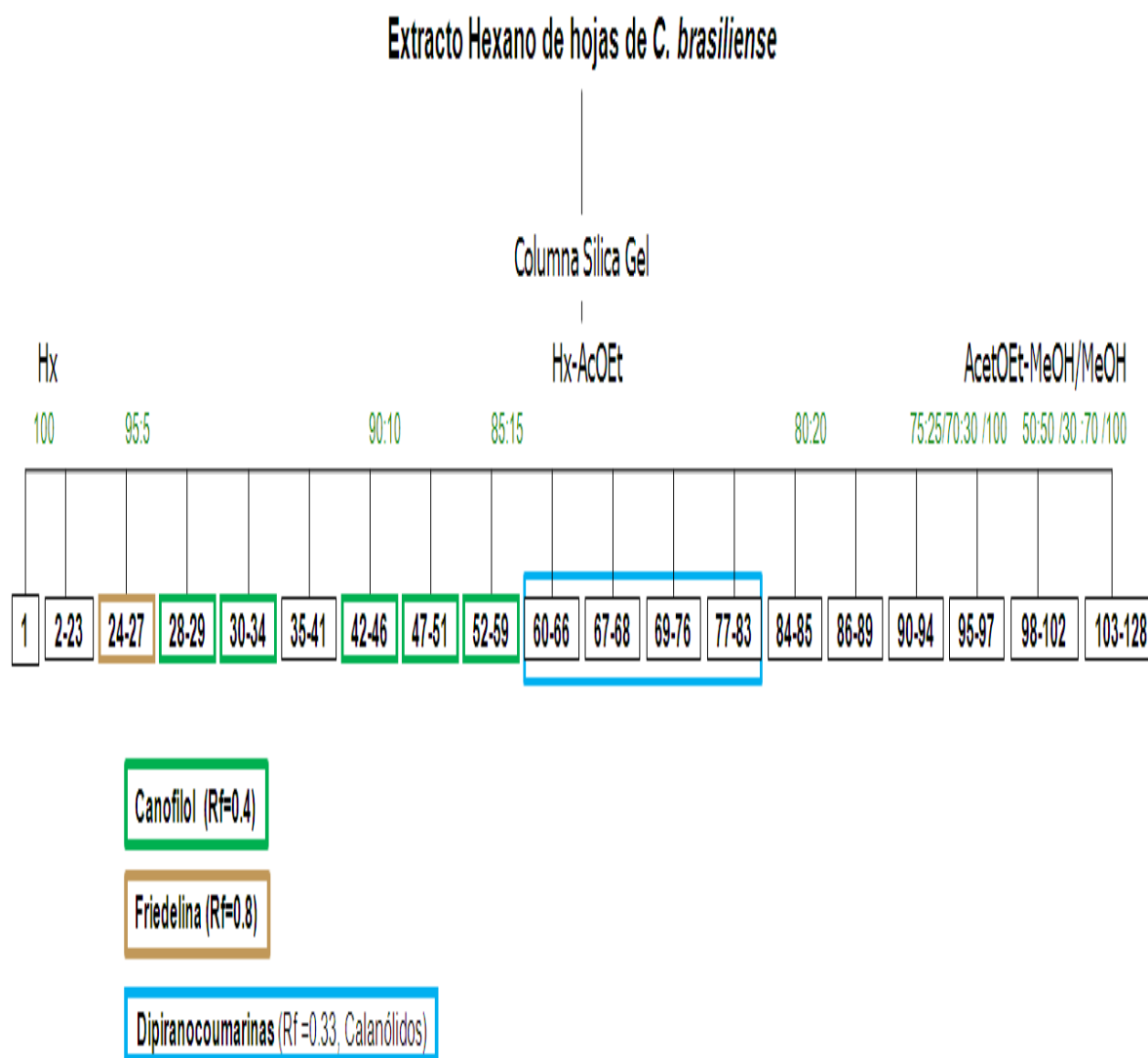


Figura 5. Diagrama de fraccionamiento del extracto de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense*, colecta Soconusco, Chiapas, México (Columna I).

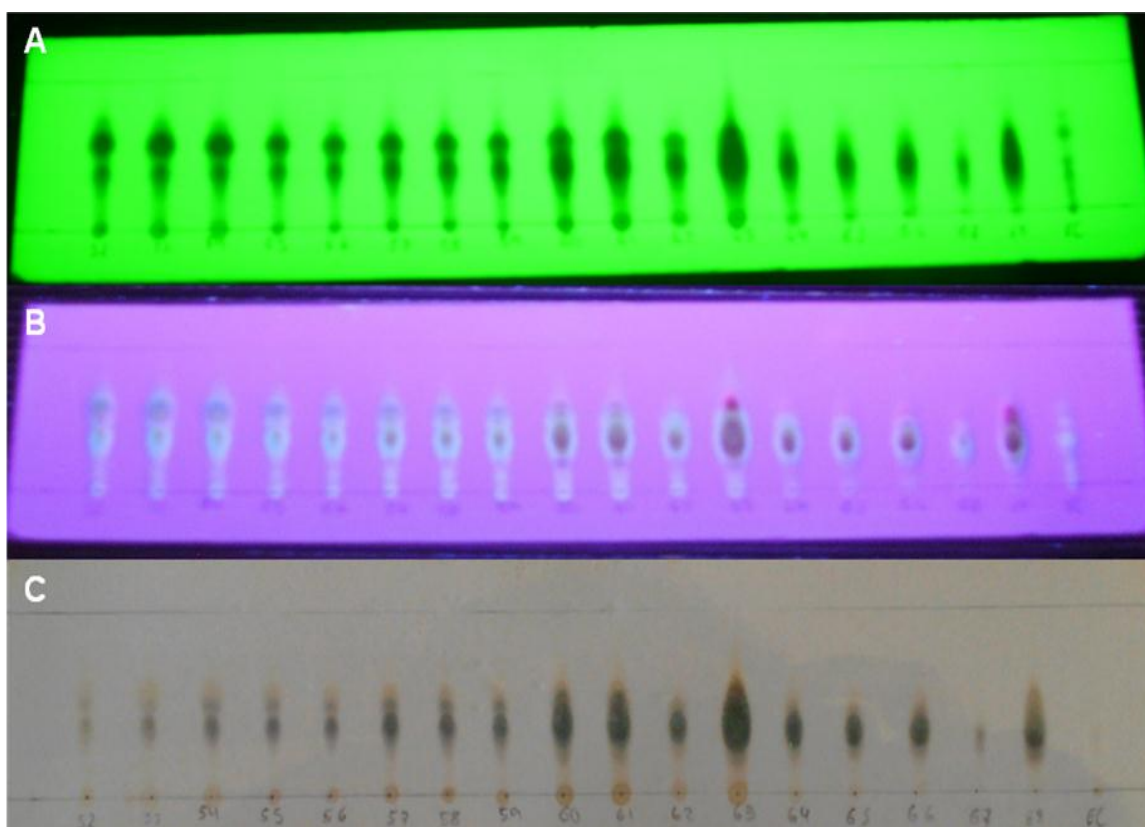


Figura 6. Cromatofolio de las fracciones *F52-68* obtenidas mediante la columna I, observados con luz UV (A) $\lambda= 254$ nm, (B) $\lambda= 366$ nm, y (C) revelado con sulfato cerico 1% en ácido sulfúrico 2 N.

De la primera fracción *F1* (544.2 mg) y de las fracciones *F2-41* (2715.6 mg), eluídas con hexano y hexano-acetato de etilo, se obtuvo un líquido con una consistencia oleosa y coloración amarillo a naranja. Estas fracciones fueron analizadas por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, CG-EM (JEOL GCmate), empleando una columna capilar (30 x 0.25 mm) a 70eV. La interpretación de los espectros de masa fue realizado con la base de datos de NIST (National Institute Standard and Technology-2005).

En la fracción *F24-27* (95.2 mg) se formó un precipitado blanco, el cual presentó un $R_f = 0.8$ y punto de fusión de 249-254 °C similar al del compuesto de referencia, friedelina. Con base en esto, se procedió a determinar su RO y analizarlo mediante métodos espectroscópicos RMN ^1H y ^{13}C , IR y EM.

Las fracciones *F28-29* (15.5 mg), *F30-34* (420.7 mg), *F42-46* (320 mg), *F47-51* (110.4 mg), y *F52-59* (70.3 mg) también formaron un precipitado blanco. El $R_f = 0.4$ de todos los precipitados fue idéntico al del canofilol, compuesto de referencia. Además, en el caso de las dos últimas fracciones se encontró que tienen un punto de fusión de 249-254 °C y 240-246 °C respectivamente; y en ambos el espectro de IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3629 (O-H), 2947(C=O), 1704,1464, 1389 y 1014, son similares a los datos reportados para Canofilol.

Las fracciones *F60-66*, *F67-68*, *F69-76* y *F77-83* mostraron mediante cromatografía en capa fina una mancha azul, $R_f = 0.33$ (Figura 7), característica de las dipiranocoumarinas (calanólidos e inofilums), se reunieron y sometieron a cromatografía en columna empleando Silica Gel-C18 (YMC Co., LTD) y elución con acetonitrilo:agua (80:20). Mientras que las fracciones restantes ya no fueron estudiadas.

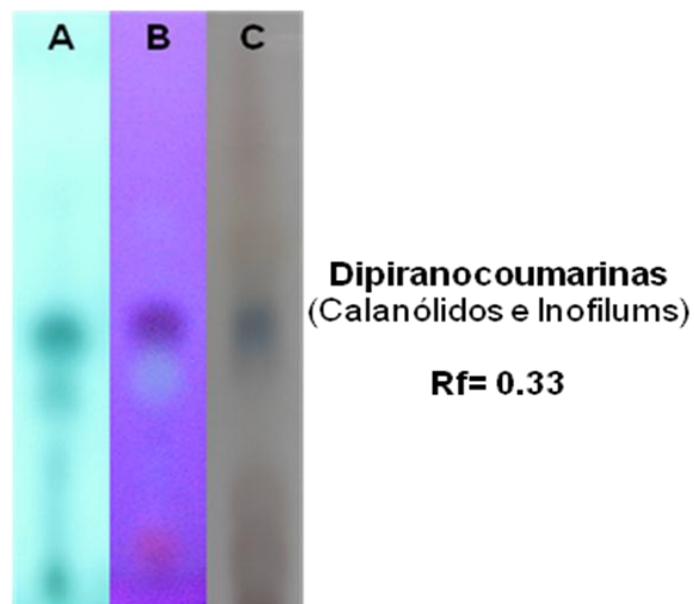


Figura 7. Cromatofolio (C18) observado con luz UV (A) $\lambda= 254$ nm, (B) $\lambda= 366$ nm, y (C) revelado con sulfato cerico 1 % en ácido sulfúrico 2 N de la fracción *F60-83*.

6.3.3.2. Columna II: Cromatografía en columna en fase reversa

Las fracciones *F60-83* (7 g), se sometieron a cromatografía en columna (20X), la fase estacionaria fue Silica Gel-C18 (YMC Co., LTD) usando como fase móvil acetonitrilo:agua en una proporción inicial de 80:20, hasta alcanzar el 100 % de acetonitrilo; seguido de elución con acetonitrilo:metanol (80:20, 50:50, 20:80), y finalmente, butanol:etanol (80:20) (Figura 8). Se colectaron fracciones de 100 ml concentrándose en un rota-vapor (Büchi Rota-vapor R-205), y posteriormente depositados en un vial. El disolvente residual se evaporó a temperatura ambiente. Se obtuvieron 24 fracciones cuya coloración varía del amarillo al verde.

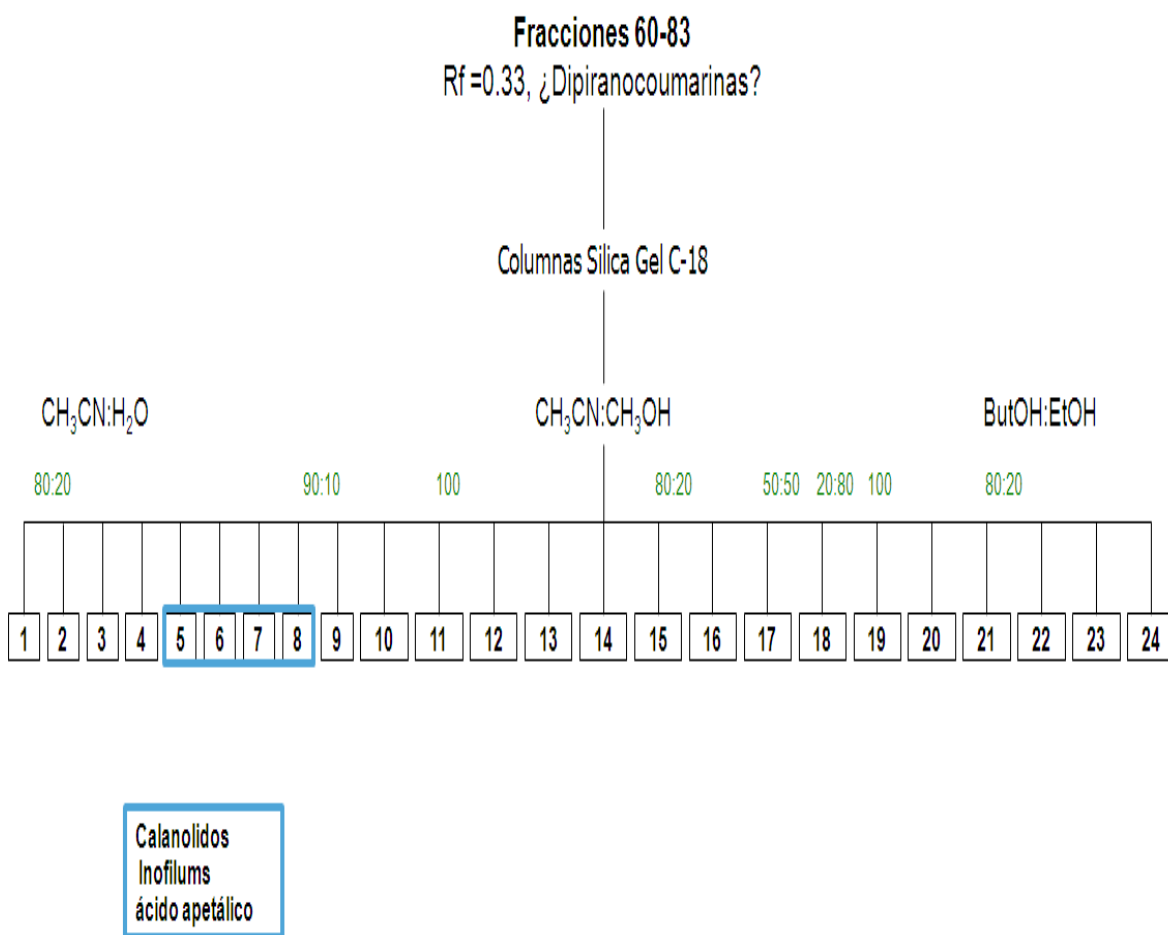


Figura 8. Diagrama del fraccionamiento de *F60-83* (Columna II).

Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina (Alugram Sil GF/UV254, silica gel 60 de 0.2 mm con indicador fluorescente UV_{254nm}). Se aplicaron 2-3 µl de cada fracción en el cromatofolio. La elución se realizó con acetonitrilo:agua usando un gradiente similar al de cromatografía en columna para observar el momento en el cual se tendría que hacer el cambio de la mezcla eluyente. Los cromatofolios se observaron bajo radiación UV ($\lambda = 254$ y 366 nm),

posteriormente se asperjó con sulfato cerico 1% en ácido sulfúrico 2 N y se reveló por calentamiento de la placa. En las fracciones *FR5*, *FR6*, *FR7* y *FR8* obtenidas de la columna, se observó la característica mancha azul de $R_f = 0.33$ (dipiranocoumarinas). Estas fracciones fueron analizadas por RMN ^1H , para observar las señales características de estos compuestos. En las fracciones restantes (*FR1-4* y *FR9-24*) no se observaron dipiranocoumarinas, pero de las fracciones *FR10* y *FR11* tratadas con hexano-diclorometano (1:1) se formó un precipitado blanco, cuyas propiedades físicas (R_f , RMN ^1H e IR) correspondieron con el compuesto previamente caracterizado como canofilol.

6.3.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Las fracciones *FR5*, *FR6*, *FR7* y *FR8* en las cuales se observó la presencia de ácido apetalico, calanólidos e inofilums se sometieron a CLAR (Waters 1525 Binary HPLC Pump-Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector-Breeze Waters Program), empleando una columna de fase reversa (Kromasil C18, 15 cm longitud, 1 cm diámetro y 5 μm tamaño de partícula), y usando como fase móvil acetonitrilo:agua (60:40) a un flujo de 1.0 ml/minuto con una presión de 600-800 psi y detección mediante radiación UV a 284 nm. Se obtuvieron 8 sub-fracciones de cada una, y se analizaron por métodos espectroscópicos (Figura 9).

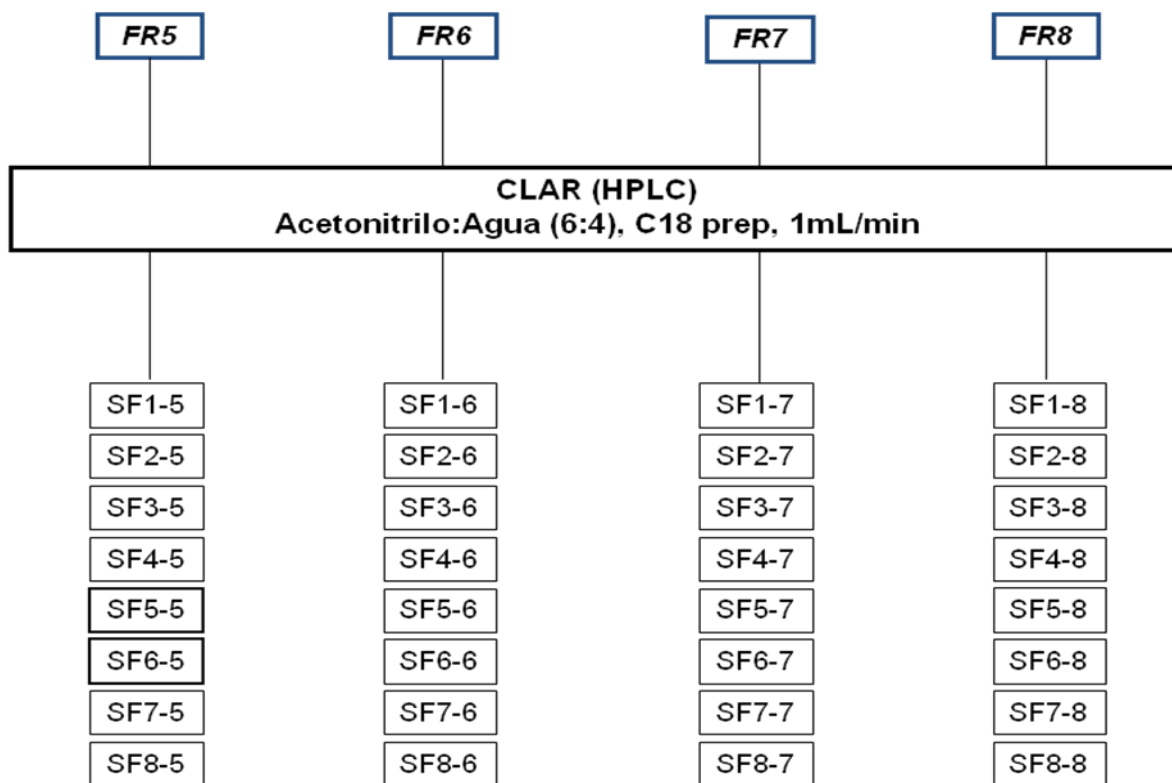


Figura 9. Diagrama de fraccionamiento de *FR5*, *FR6*, *FR7* y *FR8* por CLAR.

Se intentó cristalizar algunos de estos compuestos de estas sub-fracciones. Solamente, de la sub-fracción *SF6-7* tratada con una mezcla de acetona-metanol (1:1), se obtuvo un precipitado, el cual fue analizado por métodos espectroscópicos. En el resto de las sub-fracciones se obtuvieron mezclas complejas de compuestos, por lo cual, algunas sub-fracciones (*SF4-5*, *SF6-5*, *SF2-6*, *SF7-6*, *SF2-7* y *SF4-7*) fueron seleccionadas para su caracterización por CLAR-EM, como se detalla más adelante.

6.3.3.4. Identificación de compuestos

Los compuestos puros y las sub-fracciones obtenidos del fraccionamiento por CLAR fueron analizados mediante métodos físicos, según el caso: Punto de Fusión (Fisher Johns), Rotación Óptica (Polarímetro Perkin Elmer Modelo 343), y espectroscopicos: RMN ^1H y ^{13}C (Espectrómetro Varian Unity 300 y JEOL JNM A-500), IR (Espectroscopio Bruker Tensor 27) y EM (Espectrómetro Hewlett-Packard 5985-B), además se caracterizaron por CLAR-UV-EM (Agilent Technologies 1200 Series Binary SL acoplado a un espectrómetro de masas Bruker Esquire 6000). Los datos fueron comparados con lo reportado en la literatura.

6.3.4. Cuantificación de compuestos por CLAR-UV

Cuantificación por CLAR-UV empleando referencias. Se analizaron los extractos hexánicos de la colecta Soconusco y Selva, así como de los QTP's 1 y 2, mediante CLAR (Waters 1525 Binary HPLC Pump-Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector-Breeze Waters Program; Columna Kromasil C18, 25 cm longitud, 0.4 cm diámetro y 5 μm tamaño de partícula), usando como fase móvil acetonitrilo:agua (60:40) a un flujo de 1.0 ml/min con una presión de 1600-1800 psi y una concentración de muestra de 0.75 mg/ml y detección UV a 284 nm. Se identificaron y cuantificaron las dipiranocoumarinas tetracíclicas: (-)-calanólido B (**1**) y (-)-calanólido C (**2**), y la cromanona: ácido apetalico (**3**). Cada compuesto fue inyectado por triplicado y se realizaron las curvas de calibración respectivas a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ppm para cada estándar. La relación

concentración-absorbancia fue establecida mediante análisis de regresión lineal. Las ecuaciones fueron: $y=46697.95x -12223.52$, $r^2=0.99$, $p<0.05$, RT 32.89 (1), $y=61728x -680388$, $r^2=0.97$, $p<0.05$ (2), RT 34.82, and $y=40059.51x -10287.89$, $r^2=0.99$, $p<0.05$, RT 26.18 (3).

Cuantificación por CLAR-UV-EM (ESI+). Las sub-fracciones SF4-5, SF6-5, SF2-6, SF7-6, SF2-7 y SF4-7 fueron seleccionadas para su caracterización. Se empleó un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies 1200 Series Binary SL, con columna de fase reversa (Zorbax Bonus RP 2.1 x 100 mm, 3.5 μ m), eluyendo con metanol-agua (6:4) durante 30 min con un flujo de 0.2 ml/min. El cromatógrafo estaba acoplado a un espectrómetro de masas Bruker mod. Esquire 6000, los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por electroespray (ESI, ionización positiva), presión del nebulizador 10 psi, gas de secado 5 l/min y temperatura de secado 300 °C y trampa de iones de polaridad positiva, con un barrido de 50-1000 m/z, promedio de seis espectros. Adicionalmente, se obtuvo el perfil cromatográfico y espectro de masas de las dipiranocoumarinas, (+)-Inofilum P, (-)-Calanólido B y sus derivados 12-metoxilado, así como de la cromanona, ácido apetalico y la coumarina tricíclica, denominada GUT-70, para poder identificarlos dentro de las sub-fracciones.

La cuantificación de los compuestos dentro del extracto se obtuvo como el porcentaje del área, la cual se correlacionó con el contenido de los compuestos en el extracto mediante la siguiente expresión:

$$m_c = [(\% \text{área}/100) * (V_i C_m m_{CII} m_{CI} / m_e)] * 1000$$

Donde m_{CII} , m_{CI} y m_e es la masa de la fracción de la columna I, II y del extracto, V_i es volumen de inyección, C_m es la concentración de la muestra, y se multiplica por mil para obtener mg/kg de hoja seca.

6.4. Análisis estadístico

La cuantificación de los componentes del extracto de hexano se realizó mediante un análisis de regresión lineal. El análisis de los datos de actividad anti-TR y de citotoxicidad se llevó a cabo mediante el estadístico de Kruskal-Wallis para muestras independientes. El cálculo de la DL_{50} , CI_{50} y CC_{50} se realizó mediante un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. Los valores porcentuales se transformaron a unidades probit y se graficó vs el logaritmo de la dosis (Shetty Akhila *et al.*, 2007). Los límites de confianza para la DL_{50} se determinaron mediante el método de Litchfield-Wilcoxon (1949). Los datos de peso fresco de los órganos, se compararon con el estadístico *t-Student* para muestras independientes. Todos los datos se analizaron previamente con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y de homogeneidad de Levene. Los análisis estadísticos se efectuaron al 95 % de nivel de confianza usando el programa Minitab™ v15 y SPSS™ v17.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis biológico

7.1.1. Actividad anti-transcriptasa reversa del VIH-1

Los extractos de hexano de las hojas colectadas en la Región Soconusco y Selva (Chiapas), así como los quimiotipos 1 y 2 (Veracruz) fueron evaluados a la concentración de 50 µg/ml. El extracto de hojas colectadas en la Región Soconusco presentó la más alta inhibición (57 %) seguido de la colecta de la Región Selva (49 %) y el quimiotipo 2 (41 %). El quimiotipo1 fue prácticamente inactivo (1.4 %) (Figura 10A).

Los extractos de acetona y metanol de hojas colectadas en la Región Soconusco también inhibieron la transcriptasa reversa de VIH-1 (49 % y 47 %, respectivamente). Sin embargo, la actividad anti transcriptasa reversa VIH-1 de ambos extractos se redujo fuertemente después de la remoción de taninos (~25 %) (Figura 10B). El control positivo, Nevirapine, inhibió en 95 % la actividad de la transcriptasa reversa VIH-1, a la misma concentración (50 µg/ml). Previamente, Huerta-Reyes *et al.* (2004) reportaron la actividad del extracto de hexano de hojas de *C. brasiliense* (quimiotipo 2) en ~70 % de inhibición sobre la transcriptasa reversa de VIH-1. Mientras que Estrada-Muñiz (2001) reporta que el extracto del quimiotipo 1 es inactivo.

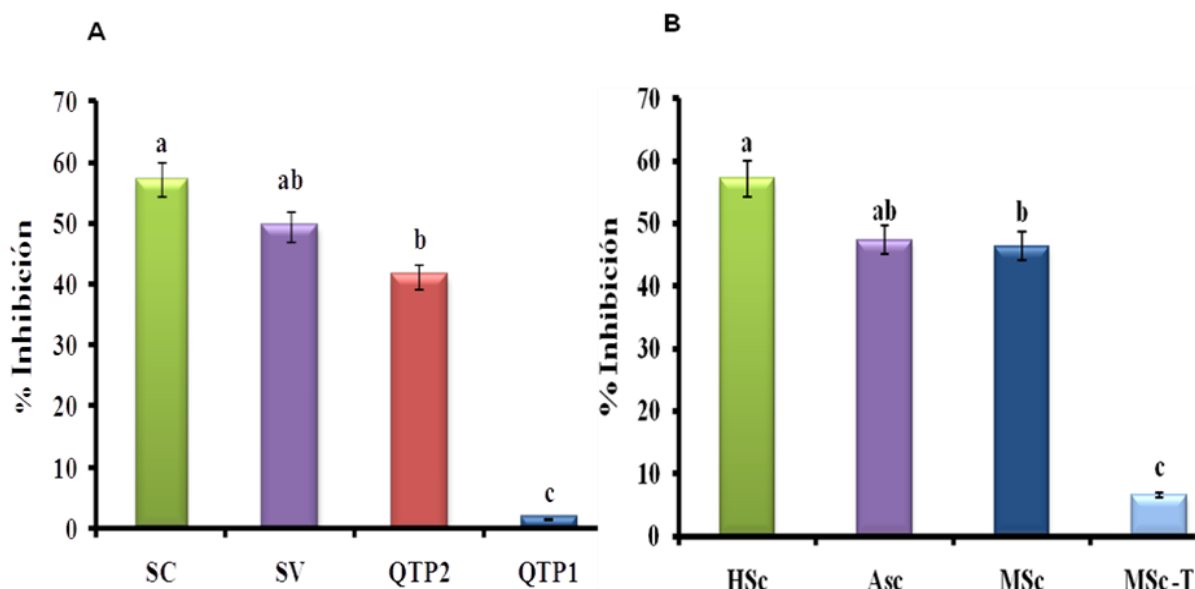


Figura 10. Actividad anti-TR VIH-1 de los extractos orgánicos de hojas de *Calophyllum brasiliense*. A) Extractos de hexano de la colecta Soconusco (SC), Selva (SV) y Quimiotipos (QTP1 y QTP2); B) Extracto de hexano (HSc), acetona (ASc), metanol (MSc) y metanol sin taninos (MSc-T) de la colecta Soconusco. $n=5$ ($X \pm E.M.$).

Determinación de la CI_{50} anti-TR

La concentración inhibitoria 50 fue calculada para los extractos de hexano y acetona de la colecta Soconusco como $CI_{50}=30.2 \mu\text{g/ml}$ y $30.9 \mu\text{g/ml}$, respectivamente; mientras que el extracto de hexano de la colecta Selva ($CI_{50}=44.86 \mu\text{g/ml}$) resultó menos potente en comparación con los del Soconusco (Figura 11). Aunque se evaluaron las propiedades anti-TR VIH-1 de 12-metoxi(-)-calanólido B y la mezcla de (+)-inofilum P con 12-metoxi(+)-inofilum P, así como de GUT-70, estas no presentaron actividad contra la enzima transcriptasa reversa. La CI_{50} de estos compuestos fue $> 200 \mu\text{g/ml}$.

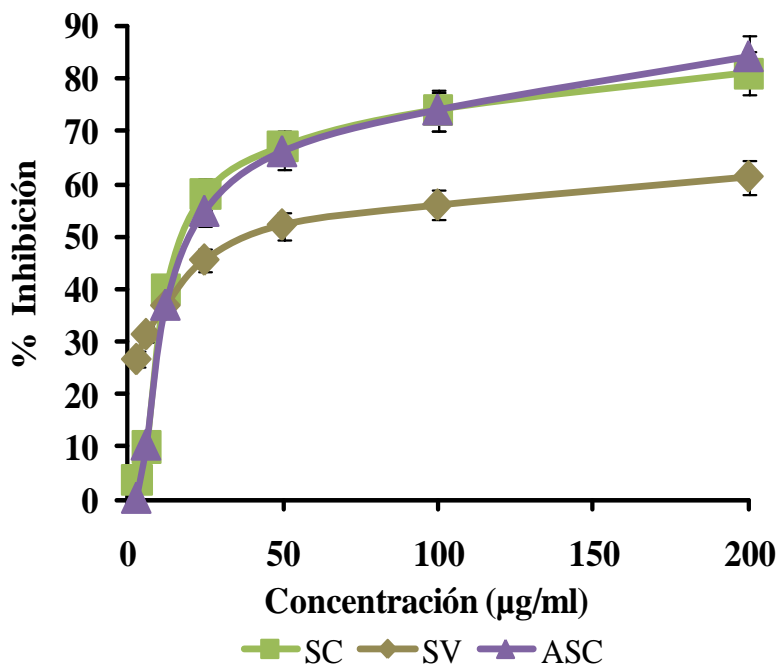


Figura 11. Curva CI_{50} anti-TR VIH-1 de los extractos de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Soconusco (SC), Selva (SV) y acetona del Soconusco (ASC). $n=3$ ($X \pm E.M.$).

7.1.2. Citotoxicidad sobre líneas celulares de carcinoma humano

Los extractos de las dos colectas en general, inhibieron *in vitro* el crecimiento de las seis líneas tumorales humanas (Tabla 5). La mayor inhibición la presentaron los extractos de la colecta Selva, en especial el extracto de hexano con valores de 86.9 al 100 %, seguido por el extracto de acetona (66.8-97.8 %), y por último el extracto de metanol (46.5-95.5 %), siendo la línea celular de tumor humano K562A (leucemia) la que menor inhibición de crecimiento presentó (46.52 %). En el caso de la colecta Soconusco, el extracto de hexano y acetona presentaron un porcentaje de inhibición superior al 50 % sobre las líneas tumorales humanas, a excepción de la línea celular de tumor humano MCF-7 (mama) para el extracto de

acetona (47.76%); sin embargo, el efecto citotóxico del extracto metanólico fue el menor de todos al estar por debajo del 50 % para todas las líneas celulares.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular de las líneas tumorales humanas por los extractos orgánicos de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Soconusco y Selva, Chiapas.

Colecta	Extracto	Líneas Celulares					
		<i>U251</i>	<i>PC-3</i>	<i>K562</i>	<i>HCT-15</i>	<i>MCF-7</i>	<i>SKLU-1</i>
Soconusco	<i>Hexano</i>	100	98.93	56.76	84.99	82.49	100
	<i>Acetona</i>	74.53	85.18	57.2	66	47.76	83.06
	<i>Metanol</i>	20.85	31.27	41.45	34.39	ND	36.69
Selva	<i>Hexano</i>	100	95.6	92.16	93.69	86.9	100
	<i>Acetona</i>	87.7	78.9	69.28	82.25	66.86	97.8
	<i>Metanol</i>	87.23	77.55	46.52	83.76	72.58	94.53

U251= Glía del Sistema Nervioso Central, *PC-3*= Próstata, *K562*= Leucemia, *HCT-15*= Colon, *MCF-7*= Mama, *SKLU-1*= Pulmón, [$\mu\text{g/ml}$]= 50, n= 2, ND= No Determinado, vehículo= DMSO

7.1.3. Citotoxicidad sobre linfocitos humanos

La CC_{50} sobre linfocitos fue realizada solamente con los extractos más activos contra la enzima transcriptasa reversa. Los extractos de acetona y hexano de la colecta Soconusco y el extracto de hexano de la colecta Selva, resultaron más potentes contra esta enzima, por lo cual se determinó la CC_{50} para dichos extractos, encontrando que, el extracto de acetona presentó la más alta viabilidad

celular con una CC_{50} = 66.01 $\mu\text{g/ml}$, seguido del extracto de hexano de la Selva con una CC_{50} = 38.02 $\mu\text{g/ml}$ y el extracto de hexano del Soconusco con una CC_{50} = 32.36 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 12). El porcentaje de viabilidad celular de los extractos es similar a los obtenidos para inhibición de células de carcinoma humano, donde la potencia fue hexano>acetona>metanol. Sin embargo, el extracto metanólico de la colecta Soconusco no mostró inhibición de linfocitos, incluso a concentraciones de 400 $\mu\text{g/ml}$.

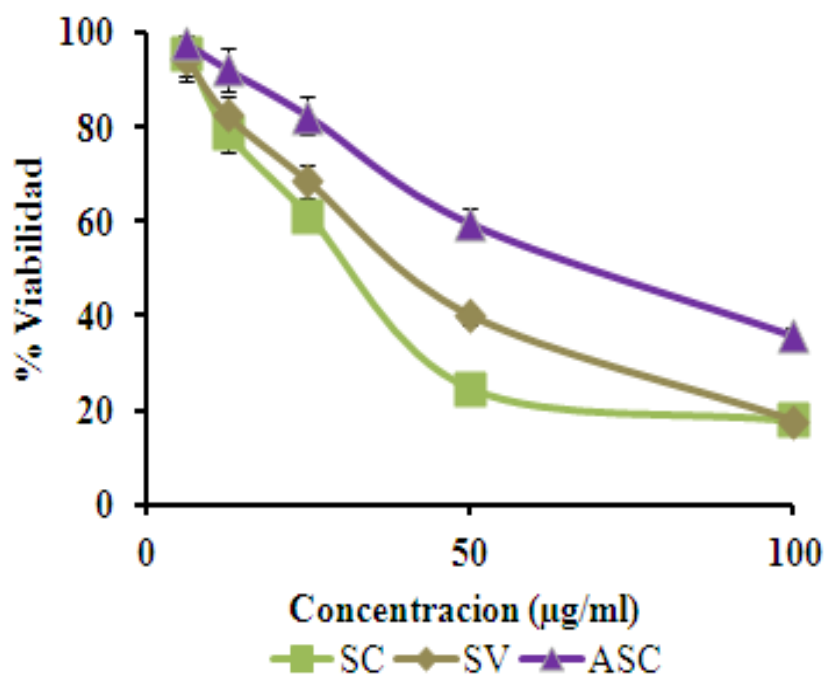


Figura 12. Curva CC_{50} de viabilidad celular sobre linfocitos humanos. Extractos de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Soconusco (SC), Selva (SV) y acetona del Soconusco (ASC). $n=3$ ($X \pm E.M.$).

7.1.4. Toxicidad sobre el crustáceo *Artemia salina*

El efecto tóxico sobre los crustáceos fue mínimo, alrededor del 30 % de mortalidad, encontrando que la CL_{50} es superior a 1000 $\mu\text{g/ml}$ para ambos extractos (Tabla 6). Esto contrasta con los resultados obtenidos en la prueba de citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma humano, ya que este ensayo es de carácter preliminar para correlacionar las actividades biológicas como citotoxicidad *in vitro* para células cancerígenas. Sin embargo, de acuerdo a Anderson (1991) este valor indica que posiblemente los extractos no son tóxicos *in vivo*.

Tabla 6. Toxicidad (CL_{50}) de los extractos de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense* sobre *Artemia salina*: Soconusco y Selva, Chiapas.

Colecta	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% Mortalidad	CL_{50}
Soconusco	1000	33.33	>1000
	100	3.33	
	10	0	
Selva	1000	36.67	
	100	3.33	
	10	0	

7.1.5. Toxicidad aguda en ratones (*Mus musculus*)

La dosis letal media del extracto hexano y acetona de la colecta Soconusco fueron muy similares (DL_{50} = 1,995 g/kg, Límite superior 3.073 g/kg, Límite inferior 1.296 g/kg y DL_{50} = 1,809 g/kg, Límite superior 3.129 g/kg, Límite inferior 1.045 g/kg, respectivamente), y más elevadas en comparación con el extracto hexano de la

colecta Selva (DL_{50} = 0,725 g/kg, Límite superior 0.963 g/kg, Límite inferior 0.545 g/Kg) (Figura 13). Esto significa que el extracto de la colecta Selva es mucho más tóxico que el de la colecta Soconusco (Hodge y Sterner, 1943, Dennis, 1984). Este resultado concuerda con el bioensayo realizado sobre el crustáceo, *A. salina*, en el cual se determinó que no era tóxico (CL_{50} > 1000 μ g/ml).

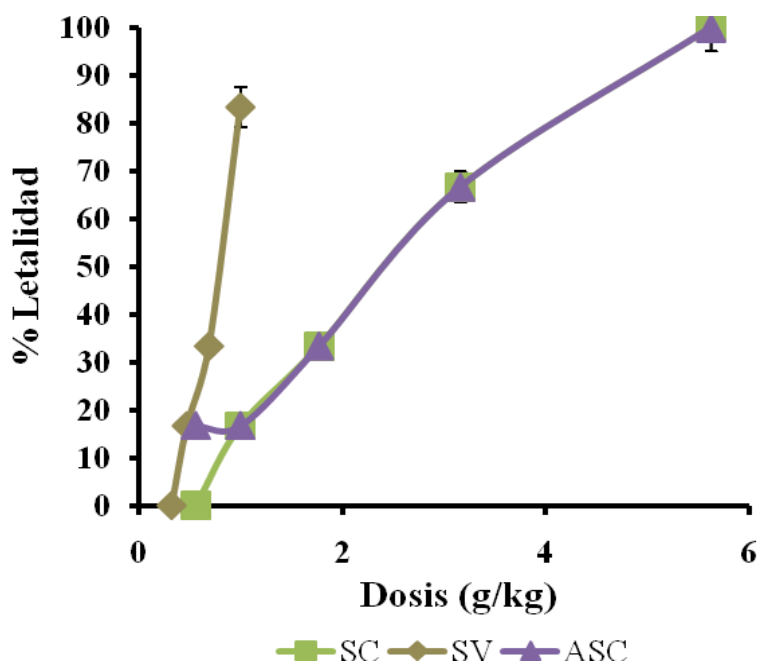


Figura 13. Curva de toxicidad aguda (DL_{50}) en ratones cepa CD1. Extracto de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Soconusco (SC), Selva (SV) y acetona Soconusco (ASC). $n=6$ ($X \pm E.M.$).

Perfil neurofarmacológico. En las pruebas neurofarmacológicas se observó que el efecto de las dosis 5.62 g/kg del extracto de hexano de la colecta Soconusco y 0.69 g/kg de la colecta Selva, fue principalmente sobre la actividad motora de los

ratones (Tabla 7): catatonía, temblores, parálisis de las extremidades posteriores, pérdida de sensibilidad al dolor, retorcimiento, pasividad y pérdida de equilibrio. Otros signos recurrentes fueron dilatación de venas de la oreja, ojos cerrados, hemorrágicos, y dificultad para respirar previas a la muerte. Estos efectos no fueron observados a las dosis más bajas.

Tabla 7. Evaluación de la respuesta conductual de los ratones antes y después de la administración del extracto de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Soconusco y Selva, Chiapas.

Dosis (g/kg)	Soconusco					Selva		
	control	5.62			1.77	0.69		
t(h)	1-5	1	3	5	5	1	3	5
Efecto								
Catatonía	0	3	4	4	2	3	3	3
Pasividad	0	4	4	4	3	3	3	3
Estado de alerta	4	2	2	2	-	4	3	3
Actividad exploratoria	4	0	0	0	-	3	2	3
Agrupamiento	4	3	3	4	-	3	2	2
Escape	4	2	2	2	3	3	3	3
Respuesta al dolor	4	2	0	3	3	3	3	3
Respuesta de alarma	4	2	2	2	-	4	3	3
Temblores	0	2	2	2	-	0	0	0
Convulsiones	0	0	0	0	-	0	0	0
Marcha tambaleante	0	3	2	3	-	0	0	0
Equilibrio/plano inclinado	4	2	2	3	-	3	3	3
Fuerza de agarre/cuerda tirante	4	3	3	4	-	0	0	0
Retorcimiento	0	3	3	2	-	0	0	0

Solamente aquellos parámetros en los cuales se observó cambios conductuales y tiempos puntuales son presentados. Escala Irwin 0-4. Cada número es una mediana ($M_e = X_{[(n+1)/2]}$) del parámetro conductual por grupo de tratamiento. n= 3; t: tiempo en horas antes y después de la administración.

7.1.6. Anatómo-histopatología de los órganos de los ratones

El peso de los órganos de los ratones muertos por la dosis más alta (5.62 g/kg) del extracto de hexano de la colecta Soconusco en comparación con los ratones control, no presentó diferencias significativas de acuerdo al estadístico *t*-Student. (Tabla 8), sin embargo, de las observaciones macroscópicas se encontró que los pulmones presentaron diminutos puntos hemorrágicos (petequias) (Figura 14). Además se observó vasodilatación en las venas de las orejas, lo que podría reflejar un efecto sobre el funcionamiento del sistema cardiovascular (Figura 15).

Tabla 8. Peso fresco de órganos de los ratones tratados con el extracto de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense* de la colecta Soconusco, Dosis= 5.62 g/kg.

	Control ($X \pm DE$)	Soconusco ($X \pm DE$)
Ratón	26 \pm 4.56	27 \pm 3.79
cerebro	0.3172 \pm 0.1	0.3552 \pm 0.06
hígado	1.6867 \pm 0.46	1.6008 \pm 0.17
bazo	0.2177 \pm 0.05	0.2141 \pm 0.06
corazón	0.1359 \pm 0.03	0.1309 \pm 0.03
pulmones	0.1864 \pm 0.02	0.1713 \pm 0.05
izquierdo	0.0921 \pm 0.02	0.0856 \pm 0.03
derecho	0.0943 \pm 0.01	0.0858 \pm 0.02
riñones	0.4322 \pm 0.08	0.3757 \pm 0.08
izquierdo	0.2167 \pm 0.03	0.1895 \pm 0.05
derecho	0.2155 \pm 0.05	0.1862 \pm 0.04
Testículos	0.1707 \pm 0.04	0.1514 \pm 0.03
izquierdo	0.0834 \pm 0.02	0.0777 \pm 0.02
derecho	0.0873 \pm 0.02	0.0737 \pm 0.01

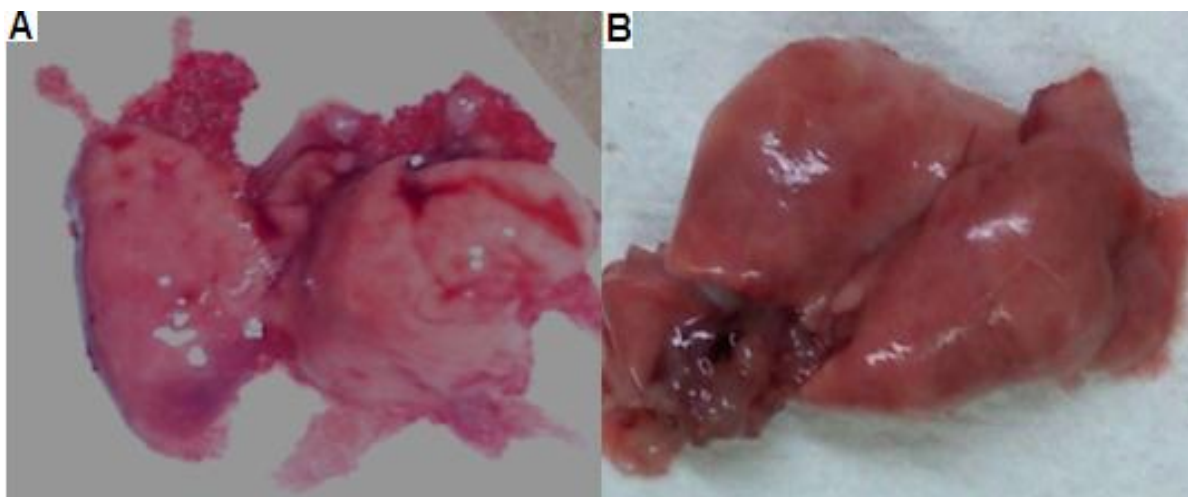


Figura 14. Pulmón de los ratones tratados con el extracto de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Colecta Soconusco (Dosis= 5.62 g/kg). Observe el cambio de coloración de nacarado (A) a rojo (B) producto de las múltiples petequias.

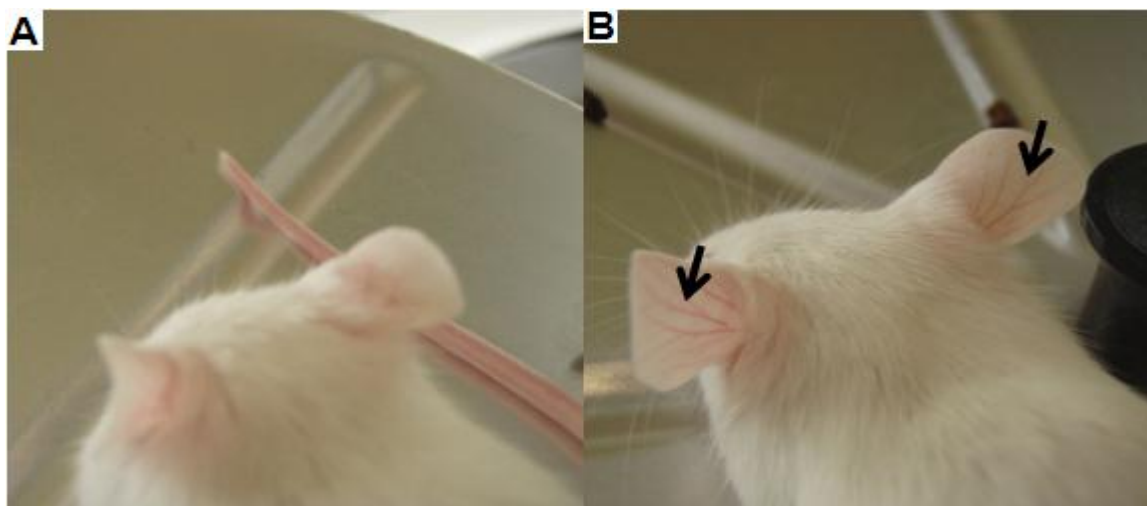


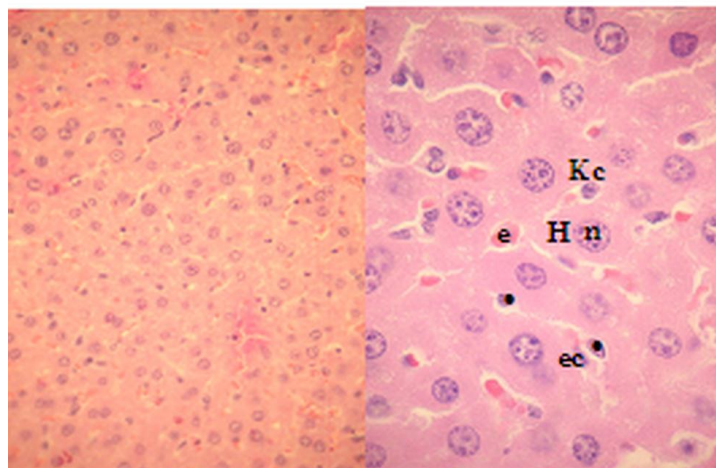
Figura 15. Vasodilatación observada en las orejas de los ratones a los que se les administró el extracto de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*: Colecta Soconusco (Dosis= 5.62 g/kg). A) Ratón control, B) Ratón tratado. Observe la vasodilatación (flechas).

Hígado. El análisis histopatológico del tejido de hígado mostró arquitectura natural, el tamaño de los núcleos en los hepatocitos varían y las vesículas intracitoplasmáticas son escasas, esto indica que no hay daño o este es mínimo en el tejido hepático, ya que no se observa tejido necrosado, el cual es característico cuando los espacios de los hepatocitos destruidos es ocupado por eritrocitos. El extracto parece tener un efecto vasodilatador, ya que en el tejido puede observarse que los vasos sanguíneos están dilatados. Se observa poca congestión en el órgano (presencia de eritrocitos en los vasos sanguíneos) y son evidentes las células binucleadas y células de Kupffer (Figura 16).

Bazo. En el caso del tejido de bazo, se observa abundancia de megacariocitos y el efecto de estimulación mitótica sobre dicho órgano, cuyo incremento es muy evidente, también hay células de megacariocitos con dos núcleos en un solo citoplasma. Esto resulta particularmente interesante, ya que podría interpretarse como un efecto inmuno-estimulante, sin embargo, se requiere de otros análisis para corroborar lo aquí observado (Figura 17).

Pulmón. En las fotomicrografías de los cortes de tejido pulmonar, se observa que la estructura alveolar sufrió daño, además la presencia de eritrocitos en abundancia en el tejido pulmonar evidencia que el ratón murió por congestión arterial (vasodilatación). Este último efecto resulta interesante, ya que sugiere que el extracto posee efectos sobre el sistema cardiovascular (Figura 18).

A



B

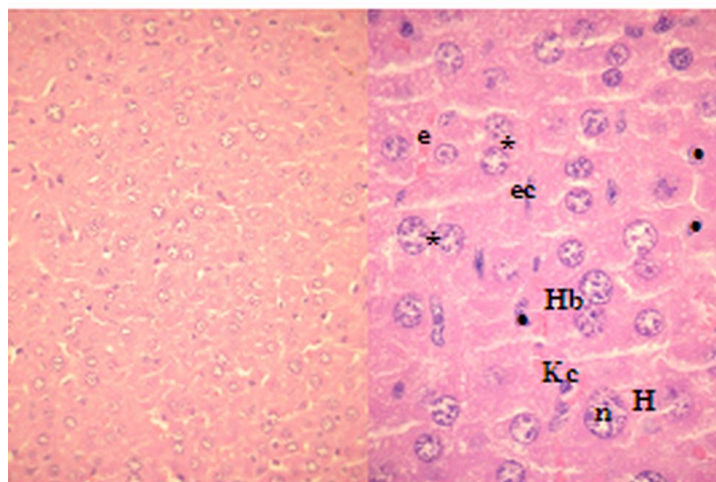


Figura 16. Fotomicrografía de hígado de ratón. (A) Control. (B) Después del tratamiento con 5.62 g/kg i.p. del extracto de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de la colecta Soconusco (X40 y X100). Observe que la arquitectura está conservada, pero los vasos sanguíneos están dilatados. Hepatocito (H), hepatocito binucleado (Hb, *), núcleo (n), eritrocitos (e), células endoteliales (ec) y células de Kupffer (Kc, •).

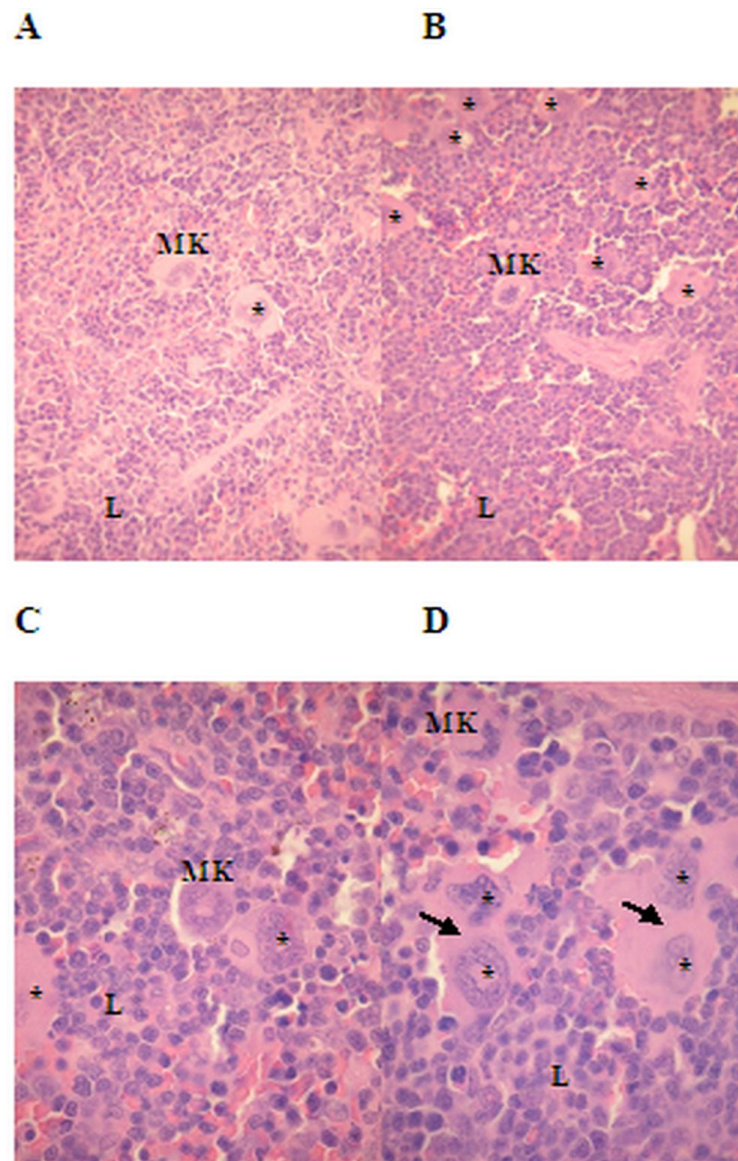


Figura 17. Fotomicrografía de bazo de ratón. (A) Control. (B) Después del tratamiento con 5.62 g/kg i.p. del extracto de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de la colecta Soconusco (X40). Observe que el número de megacariocitos (MK, *) se incrementa (C y D, zoom X100 de B) mostrando megacariocitos que se han dividido; también hay células con dos núcleos en un solo citoplasma (flecha). Tejido linfoide (L).

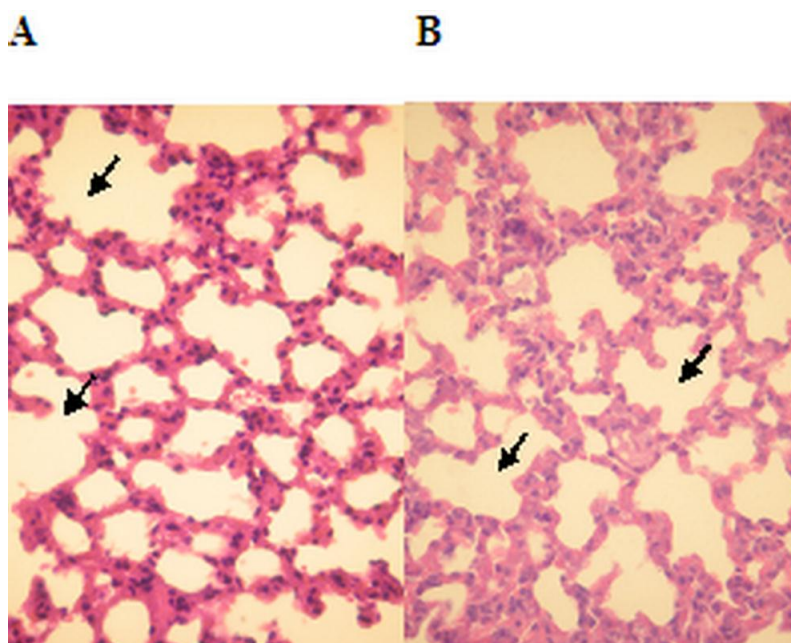


Figura 18. Fotomicrografía de pulmón de ratón. (A) Control. (B) Después del tratamiento con 5.62 g/kg i.p. del extracto de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de la colecta Soconusco (X40). Observe que los vasos sanguíneos están congestionados y muestran ruptura alveolar (flecha).

7.2. Caracterización química

7.2.1. Comparación entre las colectas de Chiapas por CCF y CLAR

Los extractos de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de las colectas de Chiapas fueron analizados por cromatografía, y se compararon con los extractos de hexano de hojas de los quimiotipos 1 y 2 (Veracruz) previamente reportados. Se observaron diferencias en los patrones cromatográficos en capa fina de ambas colectas comparadas con el QTP1, pero presentaron cierta similitud con el QTP2. Con radiación UV de onda corta ($\lambda = 254 \text{ nm}$) se observó la presencia de ácido apetalico ($R_f \sim 0.35$) en ambas colectas de Chiapas, el cual es un compuesto característico y muy abundante en el QTP2, pero este compuesto no se observa en el QTP1 (Figura 19A). Con radiación UV de onda larga ($\lambda = 366 \text{ nm}$) las colectas de Chiapas mostraron un patrón cromatográfico diferente al QTP1, ya que no se observa la presencia de mammea A/BA + A/BB ($R_f \sim 0.5$) características de este quimiotipo (Figura 19B). Al revelar con sulfato cerico, se observa la presencia de triterpenos, friedelina ($R_f \sim 0.8$) y canofilol ($R_f \sim 0.4$), tanto en las colectas de Chiapas como en los QTP's (Figura 19C). En general, los patrones cromatográficos de las colectas del Soconusco y Selva fueron diferentes al que presentaron los quimiotipos 1 y 2.

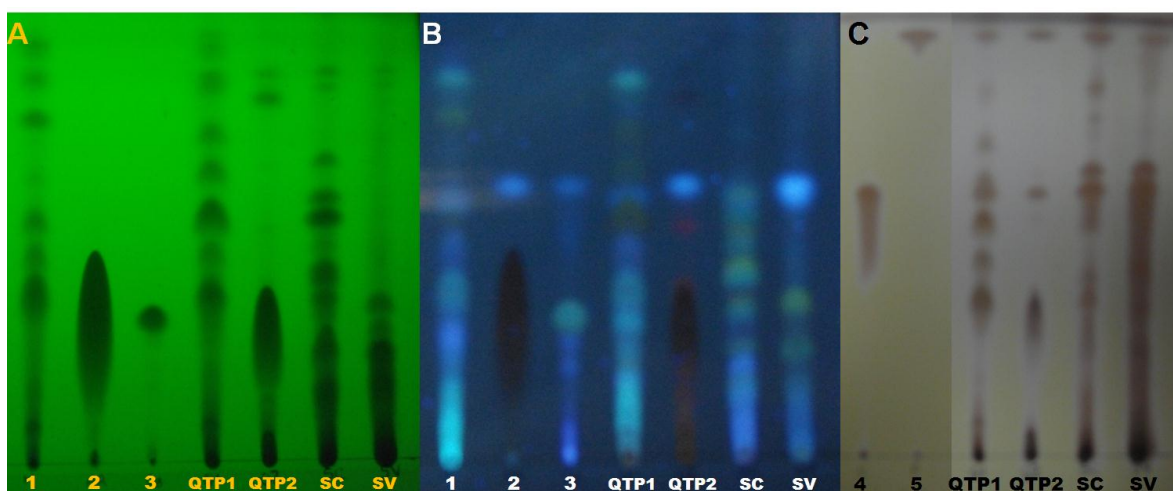


Figura 19. Cromatofolios de los extractos de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense*, observados con luz UV (A) $\lambda= 254$ nm, (B) $\lambda= 366$ nm, y (C) revelado con sulfato cerico 1% en ácido sulfúrico 2N. 1-Mammeas, 2-Ácido apetalico, 3-Calanólido B, 4-Canofilol, 5-Friedelina, QTP 1 y 2-Quimiotipo 1 y 2, SC-Colecta Soconusco y SV-Colecta Selva.

Los cromatogramas obtenidos por CLAR (Figura 20) indican y corroboran que existen diferencias cualitativas y cuantitativas entre la composición de ambas colectas de Chiapas, respecto de los QTP's 1 y 2. Como se observa en los cromatogramas, el ácido apetalico está presente tanto en las dos colectas de Chiapas, como en los QTP's. El calanólido C está presente sólo en las colectas de Chiapas y el QTP2, mientras que el calanólido B se detectó sólo en la colecta Soconusco y el QTP2. Este perfil fue empleado para determinar el contenido de los compuestos en cada uno de los extractos.

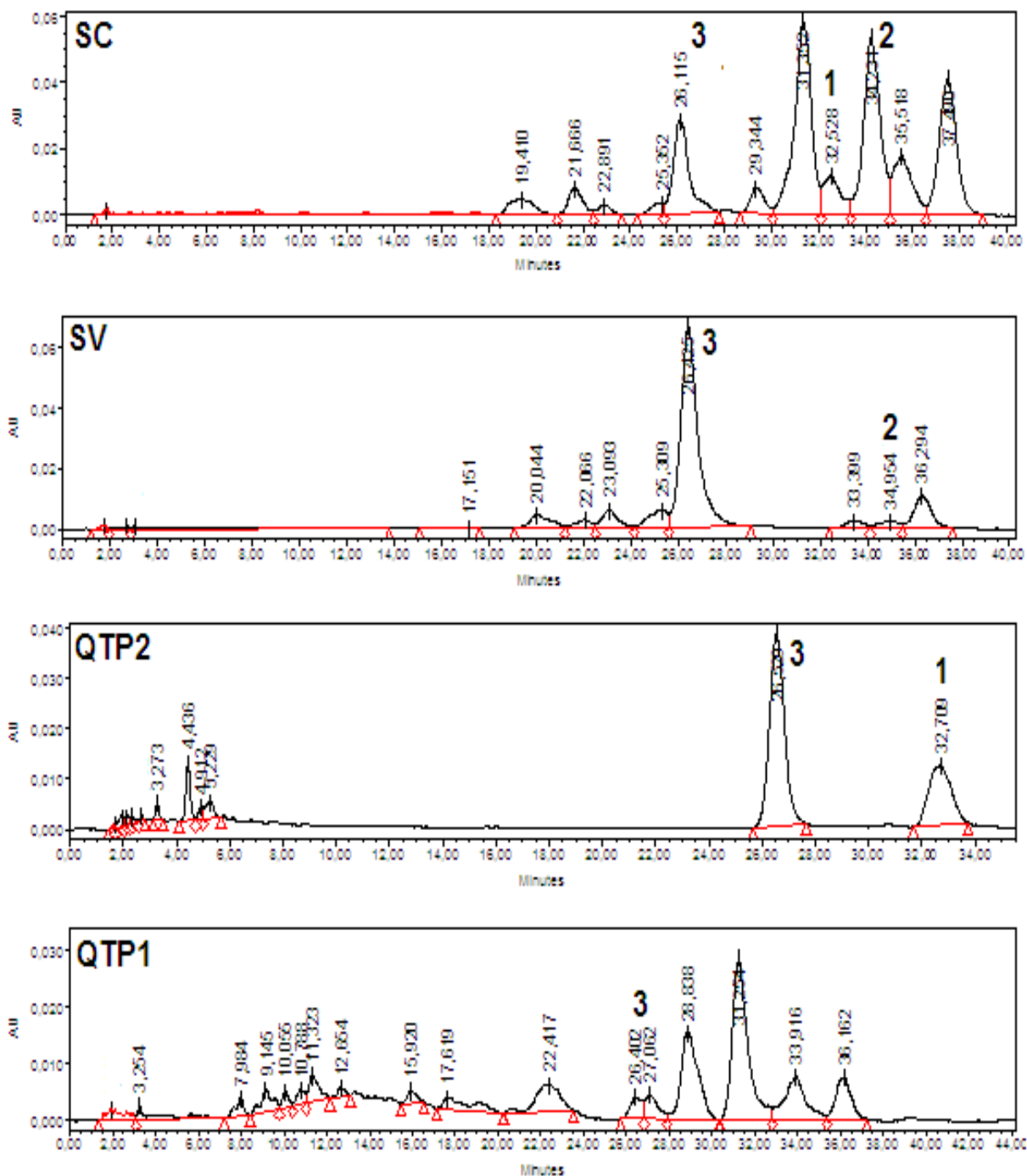


Figura 20. Cromatogramas de los extractos de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de las colectas de Chiapas (Soconusco= SC y Selva= SV), y los quimiotipos (QTP1 y QTP2). (1) Calanólido B, (2) Calanólido C y (3) Ácido Apetálico.

7.2.2. Columna I. Cromatografía en columna fase normal

7.2.2.1. Composición de las fracciones F1 y F2-41

De las fracciones F1 y F2-41 analizadas por CG-EM se identificaron usando la base de datos de NIST tentativamente 14 compuestos en total (Tabla 9). El escualeno está presente en ambas fracciones. En la *fracción F1* (líquido oleoso, amarillo) se identificaron 9 compuestos, siendo los mayoritarios el escualeno y el eudesma-4(14),11-dieno (Figura 21). Mientras que en la *fracción F2-41* (líquido oleoso, naranja) se identificaron 9 compuestos, de los cuales, el escualeno y estigmastan-3.5-dieno son los compuestos mayoritarios (Figura 22). También se identificaron el epóxido de escualeno (oxirano), y un derivado bromado de un tetracosano.

Tabla 9. Compuestos de las fracciones F1 y F2-41 (Columna I)

	Compuesto	tr	%FS
F 1	<i>Copaeno</i>	16.29	13.9
	<i>Eudesma-4(14),11-dieno</i>	18.13	32.7
	<i>2(1H) Naftalenona</i>	21.93	5.2
	<i>Escualeno</i>	33.42	88.3
	<i>Epoxido de Escualeno (Oxirano)</i>	34.48	53.7
	<i>6,10,14,18,22-Tetracosapentaen-2-ol,3-bromo-2,6,10,15,19,23-hexametil</i>	34.44	41.4
	<i>D:A-Friedooleanan-7-ol,(7a)</i>	35.57	5.8
	<i>Tetracosa-2,6,10,14,18-pentaen-22-ol,2,6,10,15,19,23-hexametil-23-metoxi</i>	36.15	6.2
	F 2-41	<i>Oxido de cariofileno</i>	19.4
<i>Ácido tetradecanoico (mirístico)</i>		21.76	6.1
<i>Metil ester del ácido hexadecanoico</i>		23.8	7.7
<i>Ácido hexadecanoico (palmítico)</i>		24.32	8.5
<i>4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido</i>		28.69	7.9
<i>Escualeno</i>		33.16	49.1
<i>Estigmastan-3.5-dieno</i>		34.28	38.2
		35.65	10.4

tr= tiempo de retención, FS= Factor de similitud

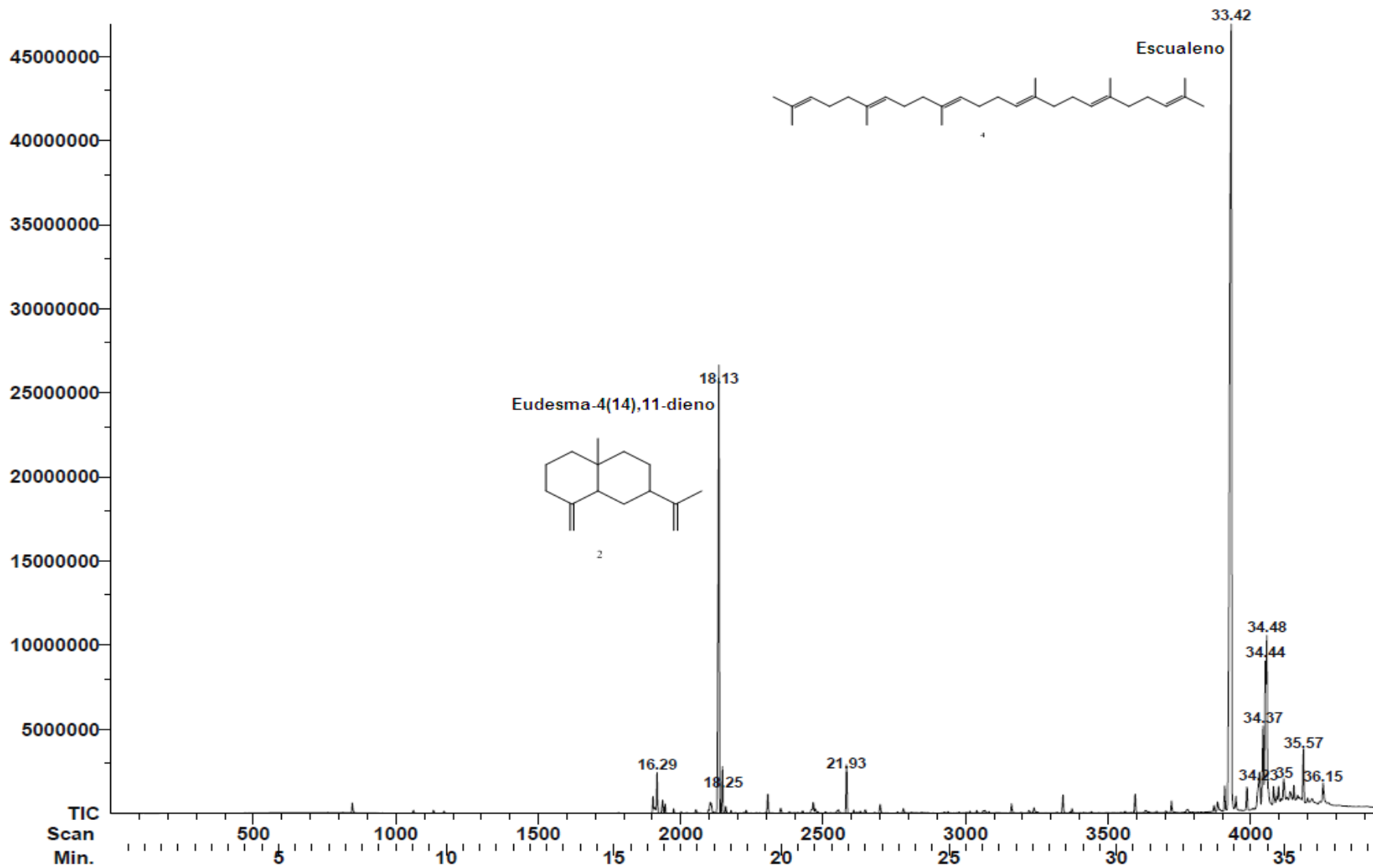


Figura 21. Cromatograma de la fracción F1 (Columna I).

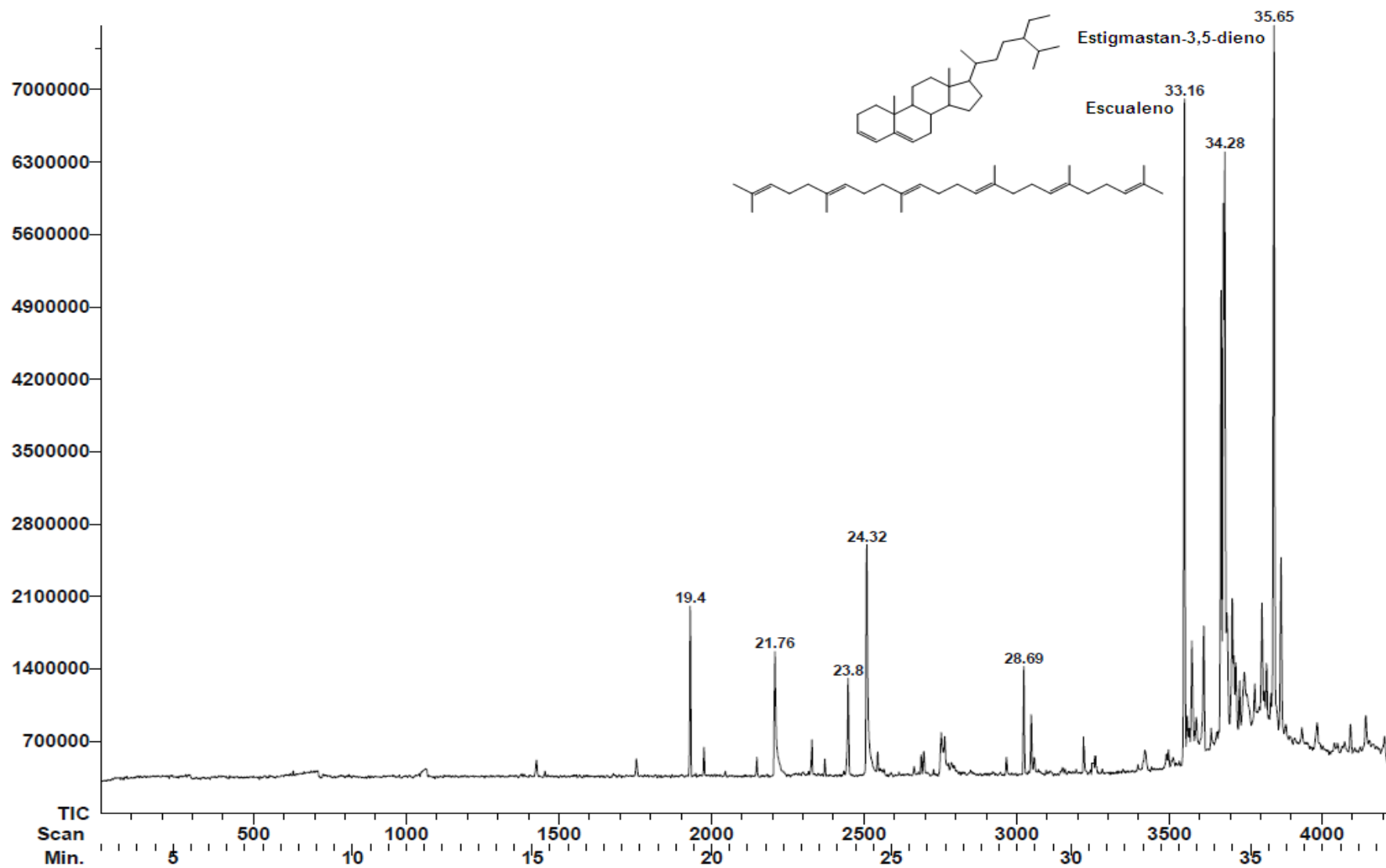


Figura 22. Cromatograma de la fracción F2-41 (Columna I).

7.2.2.2. Triterpenos

El precipitado formado durante la rota-evaporación del extracto de hexano y en las fracciones *F28-29*, *F30-34*, *F42-46*, *F47-51* y *F52-59*, así como en la fracción *F24-27*, de acuerdo a los datos experimentales obtenidos aquí (RO, RMN ^1H y ^{13}C , IR y EM) y comparados con lo reportado en la literatura (Viqar y Atta-ur-Rahman, 1994), son dos triterpenos de la familia de los friedelanos, canofilol (Figura 23) y friedelina (Figura 24). La principal señal diagnóstica para diferenciarlos en el espectro de RMN ^1H y ^{13}C se observa en el hidrógeno H28 y el carbono C28, cuyos desplazamientos químicos son 3.63 ppm y 32.089 ppm para canofilol, y 1.181 ppm y 32.089 ppm para friedelina. Mientras que en el espectro de IR es la presencia de la banda 3542 cm^{-1} correspondiente al OH, la cual está presente para canofilol, pero ausente para friedelina. La asignación de los H y C que permitió diferenciar a cada compuesto fue apoyada por los experimentos DEPT, y de correlación HETCOR y HSQC (ver anexos para los espectros). Adicionalmente, el PM y la RO de cada compuesto son diferentes.

Canofilol. *Precipitado blanco. P.f. 279-284 °C. IR (KBr) $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 3542 (O-H), 2935, 2867 (C-H), 1708 (C=O), 1461, 1387 (C-C), 1051 (C-O). $[\alpha]_D^{25}$: -18° (c=1 mg/ml, CHCl_3). EM-IE m/z (% intensidad): 442 [M]⁺ (1), 411 (43), 273 (58), 137 (100) para la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$, PM=442.*

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 3.63 (3H, s, H-28), 2.37 (2H, dd, J= 2.1 Hz, 5.4 Hz, H-2), 2.24 (1H, c, J= 6.3 Hz, H-4), 1.96 (2H, dd, J= 4.95 Hz, H-1), 1.85 (1H, dd, J= 4.2, 13.2 Hz, H-16), 1.75 (1H, dd, J= 3, 11.1 Hz, H-6), 1.54 (1H, dd, J= 2.7, 12.9 Hz, H-10), 1.46 (2H, dd, J= 3.3, 9 Hz, H-7), 1.4 (1H, dd, J= 1.8, 5.7 Hz, H-8), 1.32 (1H, dd, J= 6, 11.7 Hz, H-18), 1.3 (2H, d, J= 5.7 Hz, H-22), 1.25 (1H, dd, J= 4.8, 6.6 Hz, H-6), 1.19 (1H, dd, J= 3.3, 8.7 Hz, H-11), 1.13 (3H, s, H-27), 0.99 (3H, s, H-29), 0.98 (3H, s, H-30), 0.91 (3H, s, H-26), 0.88 (3H, d, J= 6.3 Hz, H-23), 0.87 (3H, s, H-25), 0.72 (3H, s, H-24).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 212.99 (C=O), 68.01 (C-28), 59.49 (C-10), 58.21 (C-4), 52.48 (C-8), 42.07 (C-5), 41.47 (C-2), 41.24 (C-6), 39.44 (C-18), 39.36 (C-13), 38.13 (C-14), 37.45(C-9), 35.42 (C-11), 35.15 (C-17), 34.49 (C-19), 34.24 (C-29), 33.36 (C-22), 32.82 (C-30), 31.39 (C-21), 31.26 (C-15), 30.08 (C-12), 29.1 (C-16), 28.13 (C-20), 22.24 (C-1), 19.17 (C-27), 19.05 (C-26), 18.22(C-7), 18.04 (C-25), 14.64 (C-24), 6.78 (C-23).

Friedelina. Precipitado blanco. P.f. 249-254 °C. IR (CHCl₃) ν_{max} (cm⁻¹): 2943.16 (C-H), 1704.10 (C=O), 1457.44, 1387.99 (C-C). $[\alpha]_D^{25}$: -27° (c= 1mg/ml, CHCl₃). EM-IE m/z (% intensidad): 426 [M]⁺ (20), 411 (15), 302 (20), 273(45), 205(45), 123(80), 109(88), 95 (100), para la fórmula molecular C₃₀H₅₀O, PM=426.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 2.393 (1H, m, H-2b), 2.305 (1H, m, H-2a), 2.25 (1H, c, J= 7 Hz, H-4), 1.966 (1H, m, H-1a), 1.686 (1H, m, H-1b), 1.57 (1H, dd, J= 5.5, 11 Hz, H-18), 1.519 (1H, dd, J= 2.5, 5.5 Hz, H-10), 1.397 (1H, dd, J= 4, 9.5 Hz, H-8), 1.204 (1H, dd, J= 5, 17.5 Hz, H-19a), 1.181 (3H, s, H-28), 1.05 (3H, s, H-27), 1.008 (3H, s, H-26), 1.001 (3H, s, H-30), 0.954 (3H, s, H-29), 0.878 (3H, d, J= 7 Hz, H-23), 0.871 (3H, s, H-25), 0.725 (3H, s, H-24).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 213.017(C=O), 59.517(C10), 58.235(C4), 53.116(C8), 42.833(C18), 42.123(C5), 41.508(C2), 41.317(C6), 39.713(C13), 39.252(C22), 38.314(C14), 37.465(C9), 36.029(C16), 35.641(C11), 35.348(C19), 35.004(C29), 32.800(C21), 32.441(C15), 32.089(C28), 31.782(C30), 30.507(C12), 30.002(C17), 28.156(C20), 22.268(C1), 20.239(C26), 18.635(C27), 18.24(C7), 17.932(C25), 14.644(C24), 6.793(C23).

Los compuestos canofilol y la friedelina también han sido reportados tanto para el quimiotipo1 (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004), como para el quimiotipo 2 (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b y Huerta-Reyes, 2004c), y son los compuestos más abundantes de las hojas de *C. brasiliense* colectadas en México.

Instituto de Química, UNAM (H.Rios)
 Dr-R-Reyes-Chilpa/JC-Garcia
 Clave: CBS-cf
 No-registro: 503
 Experimento: Hidrogeno
 Disolvente: CDCl3
 VarianUnity-300MHz (D)
 Febrero-16-2009

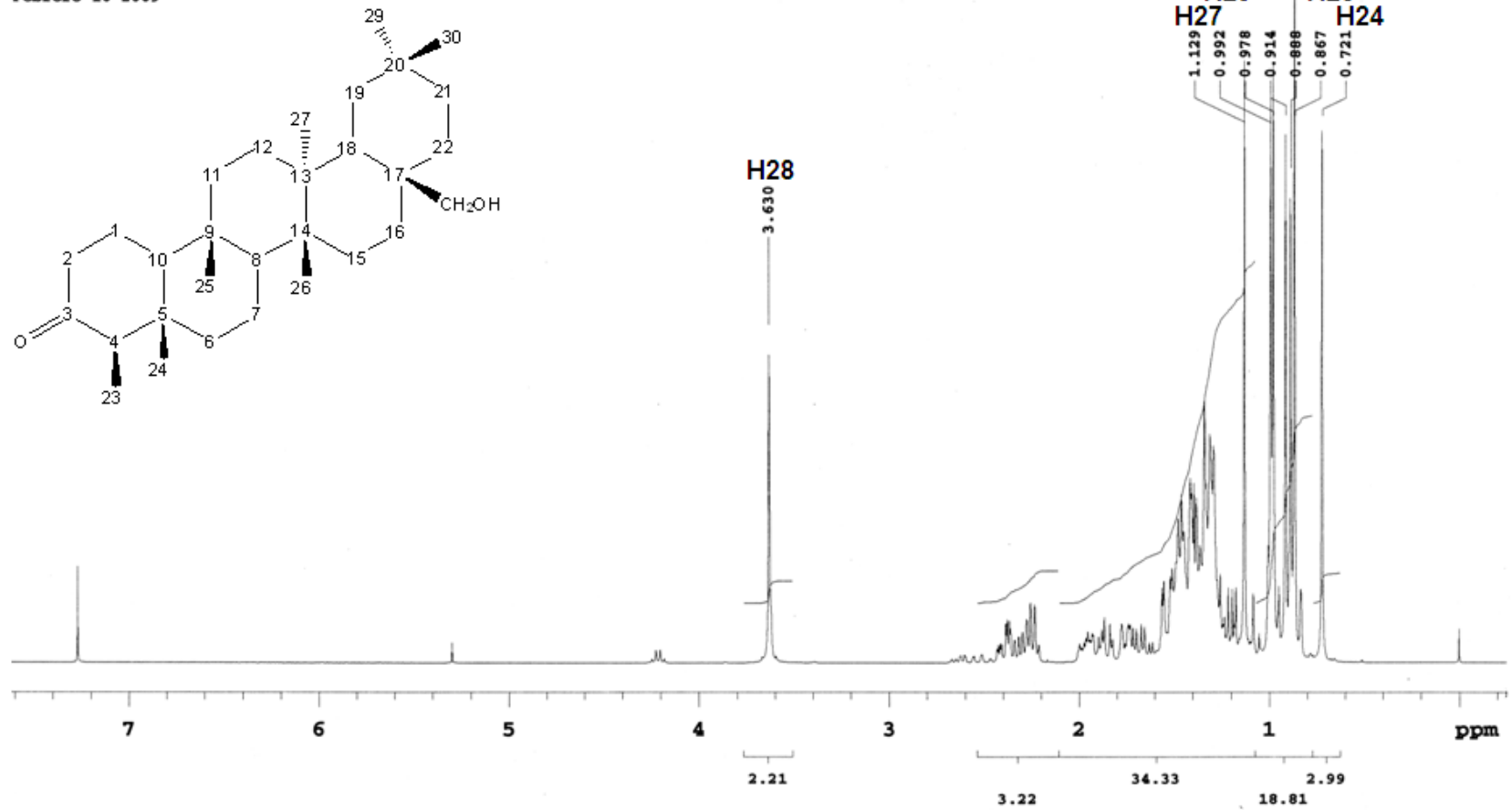


Figura 23. Espectro de RMN ¹H de canofilol.

UNAM. Instituto de Química. (M. Rios)
 Dr-Ricardo-Reyes/JC-Garcia
 Clave: Fried
 No. Registro: 1456
 Experimento: Hidrogeno
 Disolvente: CDCl3
 VarianInova-500MHz (G)
 Junio-30-2009
 File: std1h
 Pulse Sequence: s2pu1

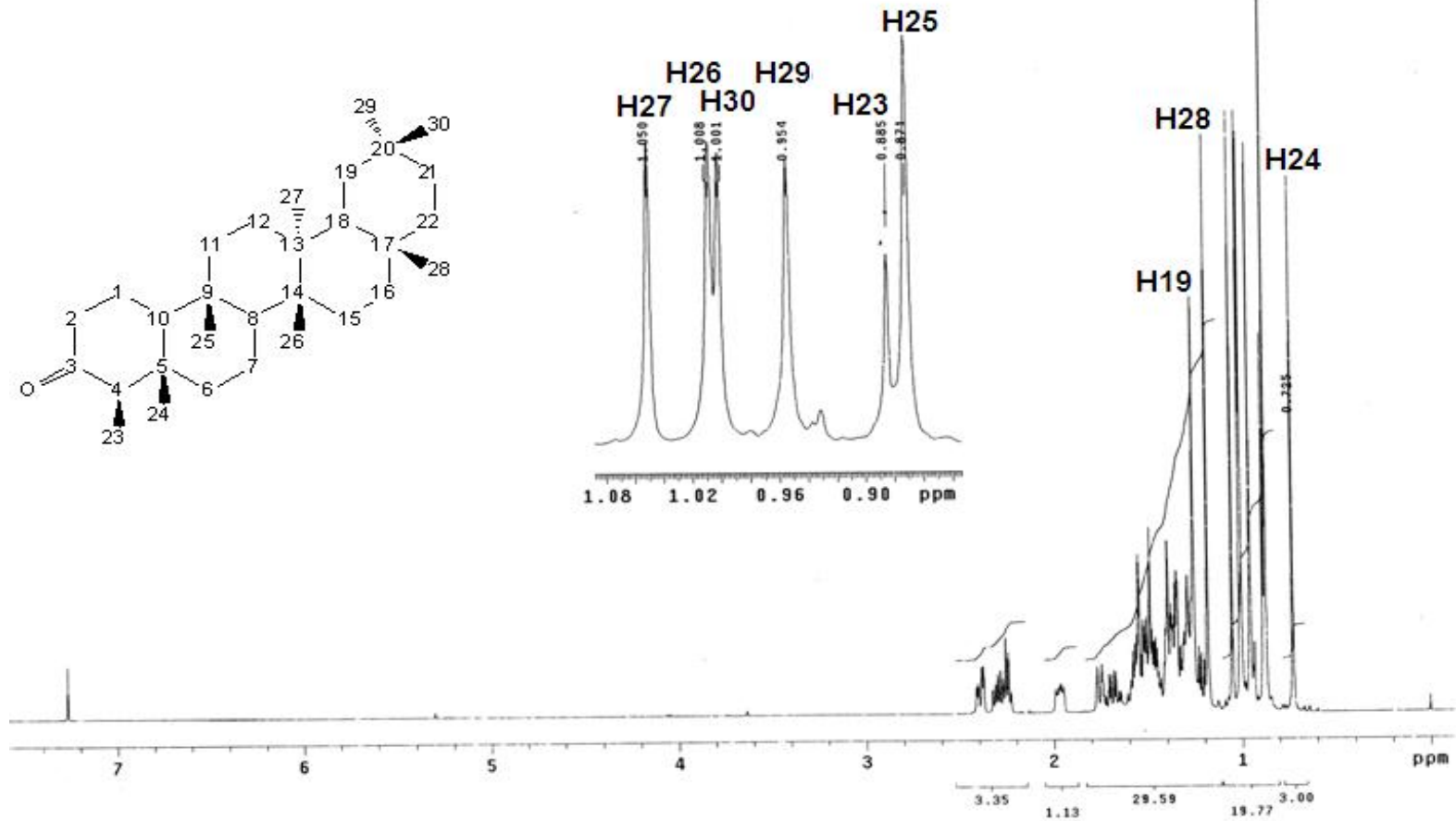


Figura 24. Espectro de RMN ¹H de friedelina.

7.2.3. Columna II. Cromatografía en columna de fase reversa

Las fracciones *FR5*, *FR6*, *FR7* y *FR8* fueron analizadas por RMN ^1H . En los espectros se observaron desplazamientos químicos correspondientes a una mezcla de la cromanona: ácido apetalico y dipiranocoumarinas. Para el primer compuesto se observó una señal característica correspondiente al hidrógeno del grupo carboxilo COOH ($\delta= 12.6$ ppm), los hidrógenos vinílicos H6 ($\delta= 6.6$ ppm) y H7 ($\delta=5.4$ ppm), y H24 ($\delta= 0.86$ ppm) (Figura 25); para los calanólidos e inofilums, se observaron las señales características como de los hidrógenos vinílicos H8 ($\delta=6.6$ ppm), H3 ($\delta=5.9$ ppm), y H7 ($\delta=5.5$ ppm), así como los hidrógenos del sustituyente prenilo en C-4, H13 ($\delta=2.8$ ppm), H14 ($\delta=1.6$ ppm) y H15 ($\delta= 0.93$ ppm) para calanólidos, y los H-aromáticos H14, H15, H16 ($\delta=7.44-7.37$ ppm), H17 y H18 ($\delta=7.32-7.3$ ppm) en el caso de inofilums (Figura 25 y 26). Los desplazamientos químicos de los hidrógenos H10, H12, H19 y H20 son señales similares en ambos tipos de compuestos. Adicionalmente, el espectro de RMN C^{13} de la fracción *FR7* (Figura 27) presenta señales correspondientes a una mezcla de dipiranocoumarinas que difieren en sus sustituyentes en C4. Al examinar los desplazamientos químicos con base en estas señales, se pudo establecer que se trataba de una mezcla de inofilums y calanólidos. En el primer caso se observaron las señales de los C-aromáticos (C13-18). En el segundo, se observaron las señales de los carbonos de un grupo propilo (C13-15). Los espectros DEPT, COSY y HETCOR de esta fracción apoyaron la determinación de que se trataba de una mezcla de estos dos tipos de compuestos.

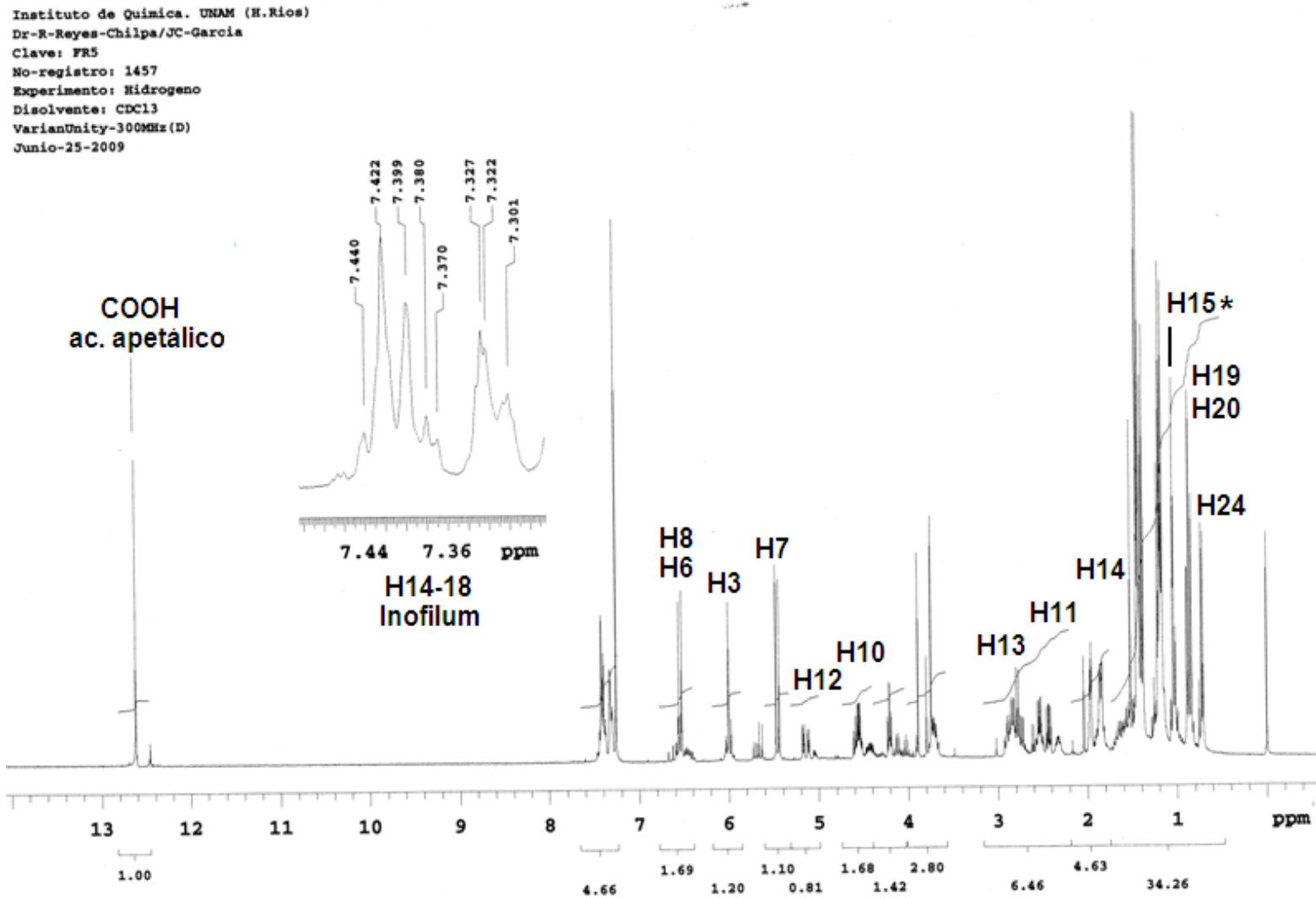


Figura 25. Espectro de RMN ¹H de la fracción *FR5* (ácido apetalico, inofilum y calanolido*)

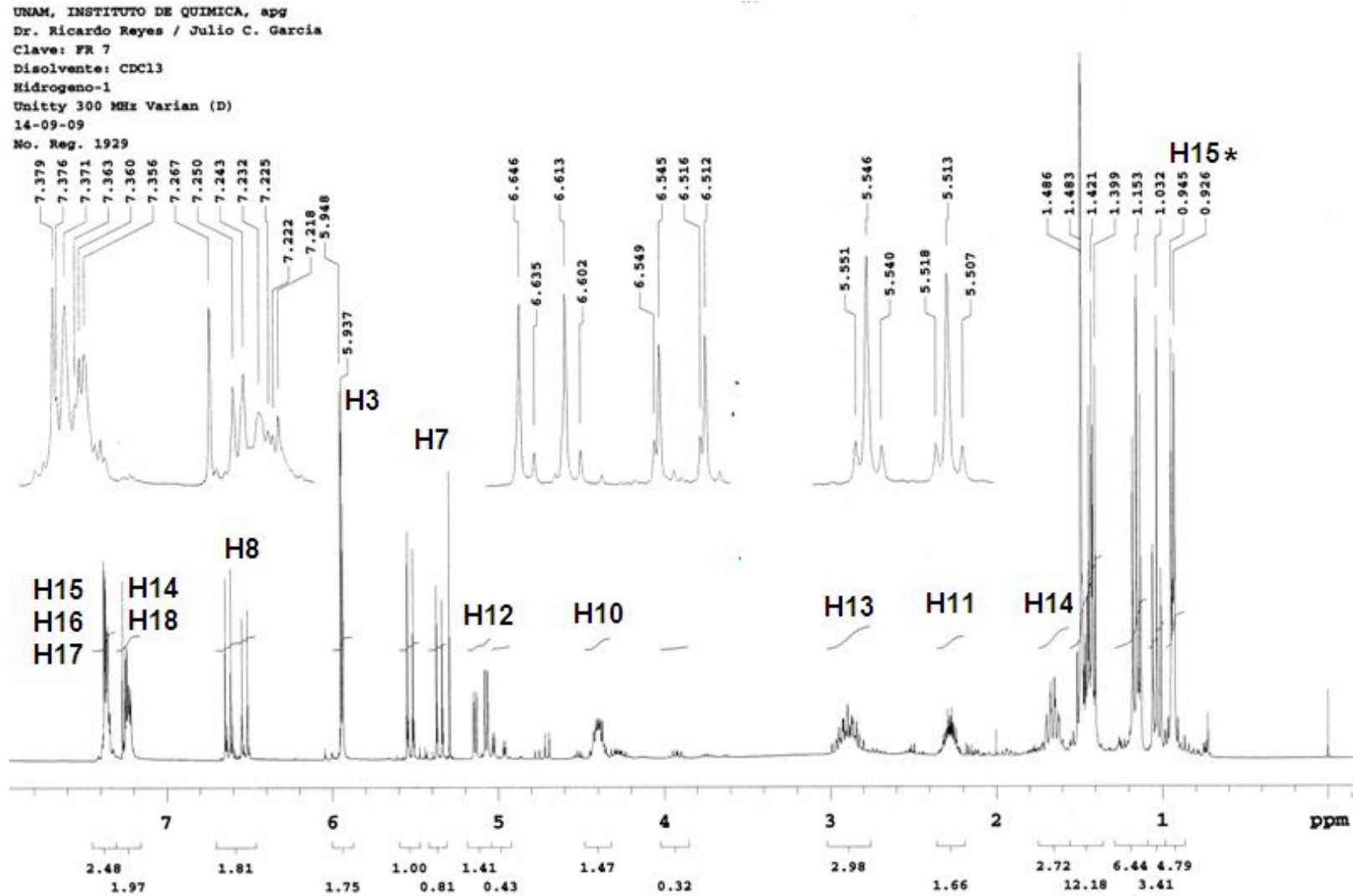


Figura 26. Espectro de RMN ¹H de la fracción FR7 (inofilum y calanólido*)

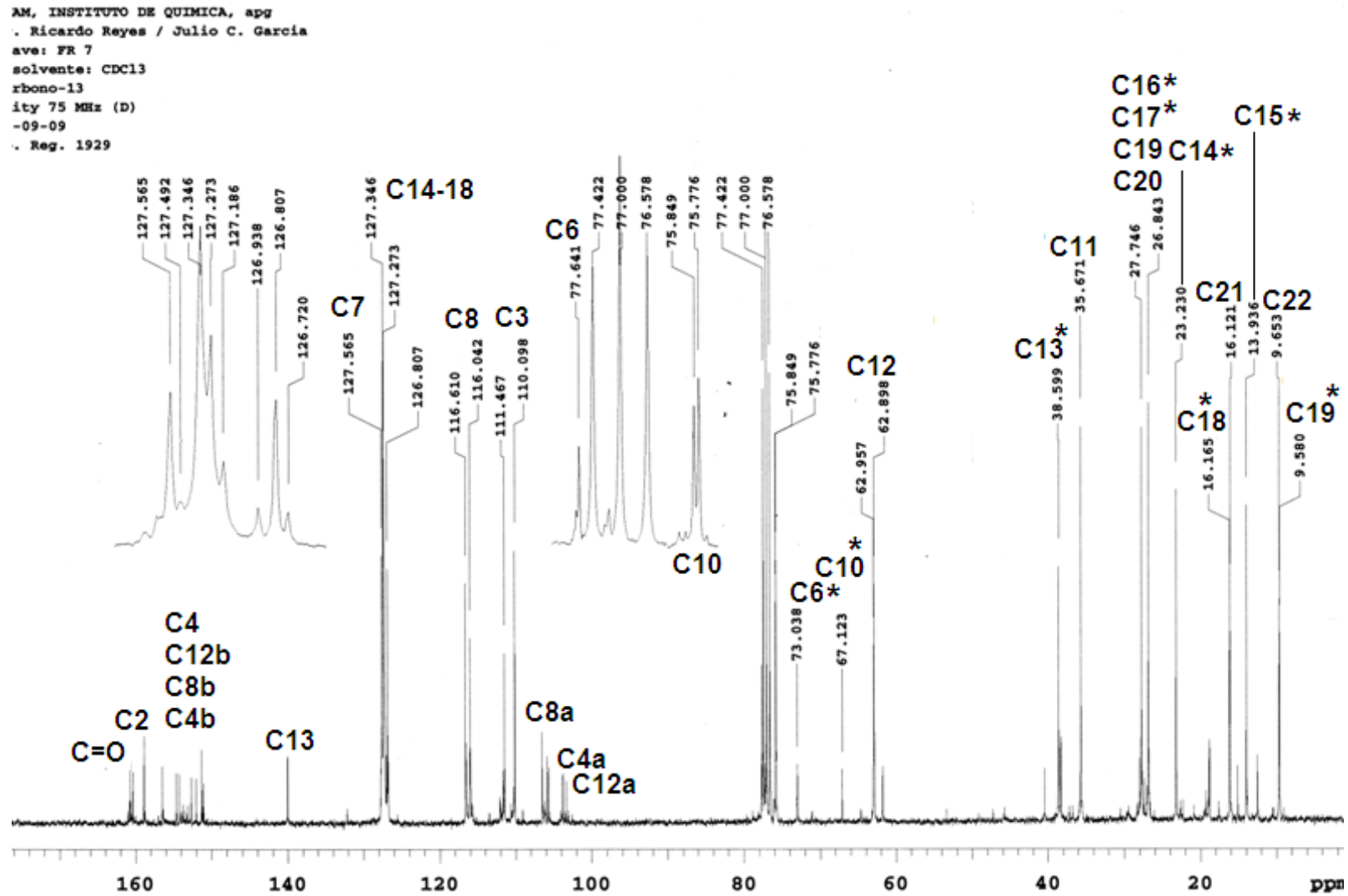


Figura 27. Espectro de RMN ¹³C de la fracción FR7 (inofilum y calanólido *).

7.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

7.2.4.1. Cromanonas

De la sub-fracción *SF4-6* se identificó un compuesto, el cual de acuerdo a los datos experimentales obtenidos por RMN ^1H (Figura 28, ver anexos para ampliación del espectro) y comparados con lo reportado en la literatura (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b y Huerta-Reyes, 2004c) es la cromanona: ácido apetalico. La señal característica que indicó la presencia de este compuesto fue el hidrógeno del carboxilo COOH (δ : 12.61 ppm).

Los protones de un metilo y un metino acoplados, localizados en las posiciones 15 y 2, fueron indicados por una señal doble en 1.38 ppm (3H, $J = 6.6$ Hz) y una señal múltiple entre 4.606-4.502 ppm (1H), respectivamente. Un sistema similar se observó para los hidrógenos del metilo 16 y metino 3, los cuales fueron indicados mediante la señal 1.17 ppm (3H, $J = 7.5$ Hz) y un cuádruple de dobles en 2.52 ppm (1H, $J = 3.3, 6.15$ Hz), respectivamente.

La presencia de los dos hidrógenos olefínicos del anillo dimetilpirano fue indicada por dos señales dobles en 6.54 ppm (H6) y 5.45 ppm (H7), con una $J_{6-7} = 10.2$ Hz que indica una orientación *cis*. Así como por los desplazamientos químicos 1.44 ppm y 1.42 ppm de los metilos geminales H17 y H18, respectivamente. Las señales correspondientes a los multipletes de los metilenos entre 1.654-1.517 ppm asignadas para H23, 1.654-1.517 ppm para H22 y 2.037-1.811 ppm para H22', y una señal triple correspondiente a los hidrógenos H24 del metilo en 0.86 ppm, así

como la señal doble de doble en 2.81 y 2.75 ppm de los hidrógenos H20, H20', y un multiplete observado entre 3.764-3.662 para el H19, permitieron identificar una cadena alifática similar al ácido hexanoico como sustituyente en C4.

Ácido apetalico. Aceite café. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 12.61 (1H, s, COOH), 6.54 (1H, d, J=10.2 Hz, H6), 5.45 (1H, d, J=10.2 Hz, H7), 4.606-4.502 (1H, m, H2), 3.764-3.662 (1H, m, H19), 2.81 (1H, dd, J=7.2, 15.9 Hz, H20'), 2.75 (1H, dd, J=7.3, 15.45 Hz, H20'), 2.52 (1H, cd, J=3.3, 6.15 Hz, H3), 2.037-1.811 (1H, m, H22'), 1.654-1.517 (1H, m, H22), 1.44 (3H, s, H17), 1.42 (3H, s, H18), 1.38 (3H, d, J=6.6 Hz, H15), 1.216-1.113 (2H, m, H23), 1.17 (3H, d, J=7.5 Hz, H16), 0.86 (3H, t, J=7.35 Hz, H24).

Este compuesto se ha aislado previamente en poblaciones de *C. brasiliense* quimiotipo 2 de México (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b y Huerta-Reyes, 2004c). Este compuesto puede ser considerado como un quimio-marcador junto a las dipiranocoumarinas para identificar y diferenciar a los quimiotipos previamente descritos de las poblaciones de *C. brasiliense* en México.

Instituto de Química. UNAM (H.Rios)
 Dr-R-Reyes-Chilpa/JC-Garcia
 Clave: FR5
 No-registro: 1457
 Experimento: Hidrogeno
 Disolvente: CDCl3
 VarianUnity-300MHz(D)
 Junio-25-2009

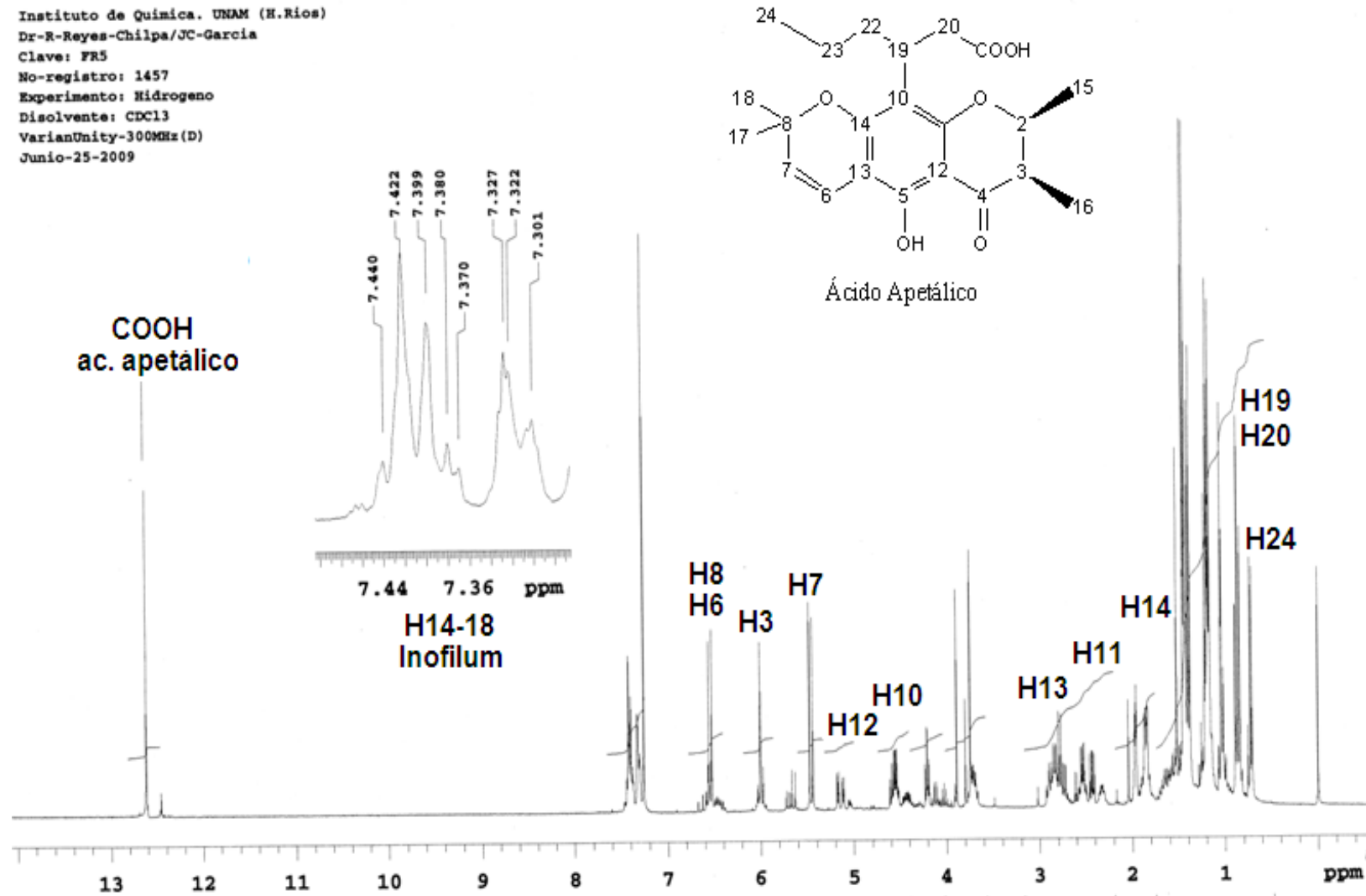


Figura 28. Espectro de RMN ¹H del ácido apetálico.

7.2.4.2. Dipiranocoumarinas tetracíclicas

En la sub-fracción *SF4-7* de acuerdo a los datos experimentales obtenidos por RMN ^1H y comparados con lo reportado en la literatura (Huerta-Reyes et al, 2004b y Huerta-Reyes, 2004 c) (Figura 29, ver anexos para ampliación del espectro) se identificó una mezcla de las dipiranocoumarinas: calanólidos A, B y C (isómeros). Las principales señales que permitieron diferenciar y determinar que se trataba de estos calanólidos fueron el cuádruple de dobles del hidrógeno H10 cuyos desplazamientos químicos son 3.92 ppm para calanólido A, 4.39 ppm para calanólido C y 4.26 ppm para calanólido B. El hidrógeno H11, el cual se observó como multiplete entre 1.964-1.886 ppm para calanólido A, 2.302-2.249 ppm para calanólido B y C. Otra señal importante que permitió diferenciar a los tres calanólidos fueron el doblete del hidrógeno H12, cuyo carbono soporta al sustituyente OH, en 4.72 ppm ($J = 7.8$ Hz) para calanólido A, 4.98 ppm para calanólido B ($J = 3$ Hz) y 5.09 ppm ($J = 5.4$ Hz) para calanólido C. Y finalmente, los hidrógenos de los metilos H16 y H17 con un desplazamiento químico en 1.51, 1.49 y 1.48 ppm, respectivamente.

Las señales de los hidrógenos H18 y H19 fueron los dobletes 1.46 y 1.44 ppm para calanólido A, 1.41 y 1.43 ppm para calanólido B, 1.41 y 1.14 ppm para calanólido C. El sustituyente propilo en C4 fue evidenciado por las señales de los hidrógenos de los metilenos, los cuales se observaron como multipletes entre 1.716-1.594 ppm para H14 y H14', y 2.992-2.794 ppm para H13 y H13', respectivamente. Los hidrógenos del metilo H15 se observaron como una señal triple en 1.03 ppm con una $J = 7.2$ Hz. También se dedujo la presencia del anillo *gem* dimetilpirano (anillo C) por las señales dobles de los

hidrógenos vinílicos H7 y H8 en 5.54 ppm y 6.62 ppm, respectivamente. La constante de acoplamiento de estos hidrógenos ($J_{7-8} = 9.9$ Hz) indica que presentan orientación *cis*. Estos compuestos han sido descritos con potente actividad anti TR VIH-1 (Kashman *et al.*, 1992, Huerta-Reyes *et al.*, 2004 b y Huerta-Reyes, 2004c).

(+)-Calanólido A. Aceite amarillo. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 6.62 (1H, d, $J=9.9$ Hz, H8), 5.94 (1H, s, H3), 5.54 (1H, d, $J=9.9$ Hz, H7), 4.72 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H12), 3.92 (1H, dc, $J=6.3, 9.15$ Hz, H10), 2.992-2.794 (2H, m, H13, H13'), 1.964-1.886 (1H, m, H11), 1.716-1.594 (2H, m, H14, 14'), 1.51 (6H, s, H16 y 17), 1.46 (3H, d, $J=6.3$ Hz, H18), 1.44 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H19), 1.03 (3H, t, $J=7.2$ Hz, H15).

(-)-Calanólido B o Costatólido. Aceite amarillo. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 6.63 (1H, d, $J=10.2$ Hz, H8), 5.94 (1H, s, H3), 5.53 (1H, d, $J=10.2$ Hz, H7), 4.98 (1H, d, $J=3$ Hz, H12), 4.381 (1H, dc, $J=3.3, 6.6$ Hz, H10), 2.992-2.794 (2H, m, H13, H13'), 2.302-2.247 (1H, m, H11), 1.716-1.594 (2H, m, H14, 14'), 1.49 (6H, s, H16 y 17), 1.41 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H18), 1.43 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H19), 1.03 (3H, t, $J=7.2$ Hz, H15).

(-)-Calanólido C. Aceite amarillo. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 6.63 (1H, d, $J=9.9$ Hz, H8), 5.94 (1H, s, H3), 5.54 (1H, d, $J=9.9$ Hz, H7), 5.09 (1H, d, $J=5.4$ Hz, H12), 4.4 (1H, dc, $J=3.3, 6.9$ Hz, H10), 2.992-2.794 (2H, m, H13, H13'), 2.302-2.249 (1H, m, H11), 1.716-1.594 (2H, m, H14, 14'), 1.48 (6H, s, H16 y 17), 1.41 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H18), 1.14 (3H, d, $J=7.2$, H19), 1.03 (3H, t, $J=7.2$ Hz, H15).

Instituto de Química UNAM (BQG)
 Dr. R. Reyes / J. C. Garcia
 Clave: F4-7
 No. de Registro: 0138
 Experimento: 1H
 Disolvente: CDCL3
 Bruker-Avance (F) 300 MHz
 26-Enero-2010

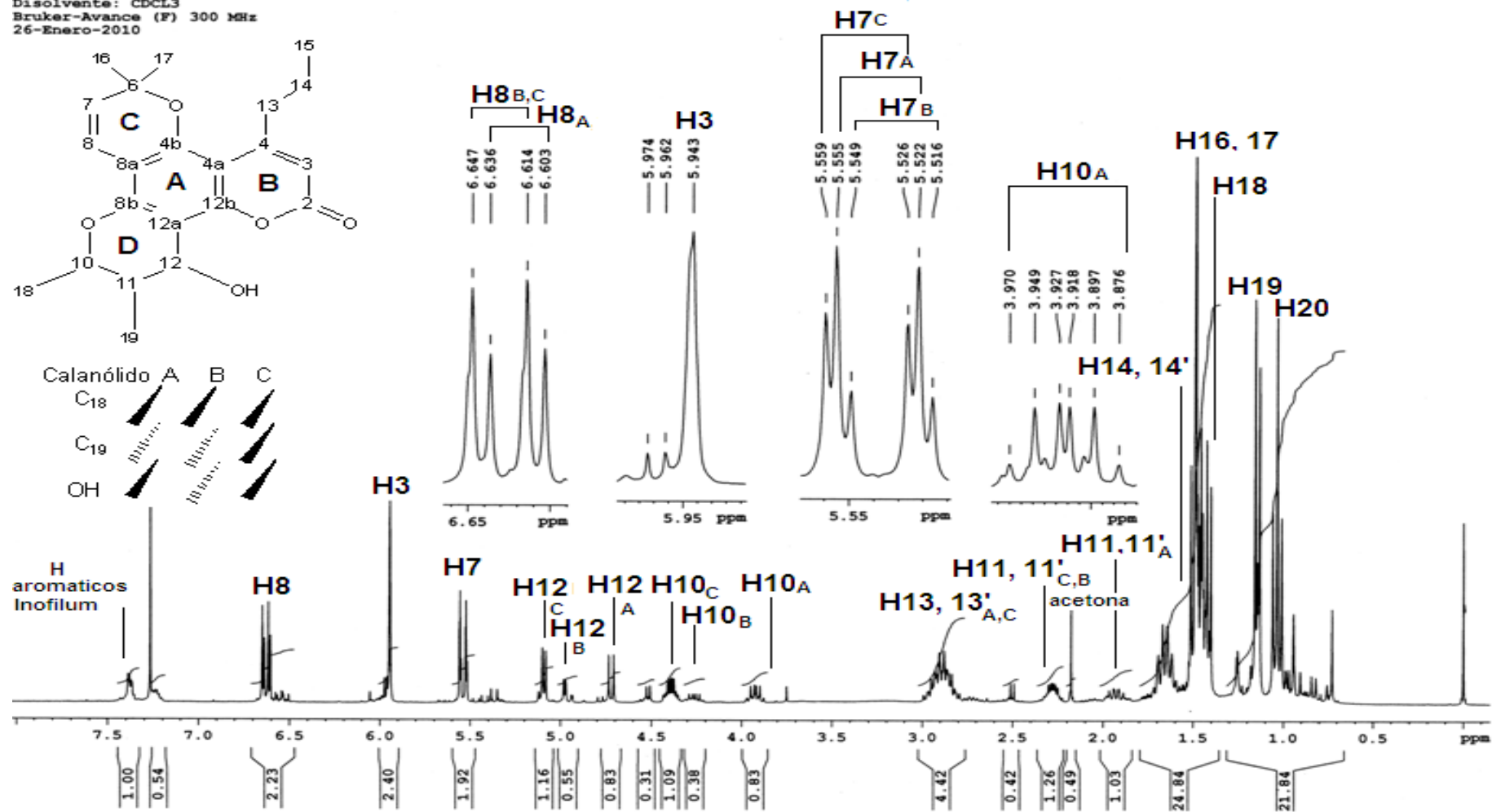


Figura 29. Espectro de RMN ¹H de la mezcla de calanólidos A, B y C con trazas de inofilum.

De la sub-fracción SF5-8 se identificó un compuesto, el cual de acuerdo a los datos experimentales obtenidos (RO, RMN ^1H y ^{13}C , y EM) y comparados con lo reportado en la literatura corresponden con un derivado metoxilado de la dipiranocoumarina tetracíclica, (-)-calanólido B, denominado: 12-metoxi(-)-calanólido B (Figuras 30-34). Un derivado similar, 12-metoxi(+)-calanólido B, fue descrito por Kashman *et al.* (1992).

Los datos de RMN ^1H y ^{13}C fueron prácticamente idénticos a los registrados para el esqueleto de (-)-calanólido B (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b y Huerta-Reyes, 2004c) con la adición de la principal señal diagnóstica (OCH_3) como un singulete, los cuales se encontraron a 3.56 ppm para los hidrógenos H20 y el carbono C20 a 57.04 ppm. Además las correlaciones observadas a tres enlaces de distancia en el espectro de HMBC entre los hidrógenos del metoxilo H20 con el C12 y del hidrógeno H12 con el carbono del metoxilo C20, confirmaron que se trataba de este derivado.

El sustituyente propilo en C4 fue evidenciado por las señales de los hidrógenos de los metilenos, los cuales se observaron como multipletes entre 1.68-1.61 ppm y 1.56-1.52 ppm para H14 y H14', respectivamente, y 2.96-2.81 ppm para H13 y H13', respectivamente. Los hidrógenos del metilo H15 se observaron como una señal triple en 1.03 ppm con una $J=7.5$ Hz. También se observaron las señales del anillo *gem* dimetilpirano (anillo C), cuya presencia fue indicada por las señales dobles de los hidrógenos vinílicos H7 y H8 cuyos desplazamientos químicos se encuentran en 5.52 ppm y 6.64 ppm, respectivamente; la constante de acoplamiento $J_{7-8}=10$ Hz, indica que están en orientación *cis*. En el espectro de RMN ^{13}C los carbonos vinílicos se

observaron a 126.63 ppm y 116.60 ppm, respectivamente. La señal simple del hidrógeno vinílico H3 del anillo piranona (anillo B) se observó en 5.96 ppm y para el carbono C3 en 110.35 ppm.

La presencia del otro anillo dimetildihidropirano (anillo D), fue determinada por las señales dobles de cuartetos en 4.49 ppm asignada al hidrógeno H10 con una $J=2$ y 6.5 Hz; dicho H está acoplado al metilo H18, observado como una señal doble de doble en 1.42 ppm con una $J= 4.5$ y 6.5 Hz; así como el hidrógeno H11, el que aparece como una señal múltiple entre 2.10-2.01 ppm. Los hidrógenos del metilo H19 están acoplados al H11, mostrando un doblete en 0.77 ppm con $J= 7$ Hz; el hidrógeno H12 se observó acoplado al H11 como una señal doble en 4.40 ppm y una $J= 2.5$ Hz. Finalmente, las correlaciones establecidas con el experimento HMBC permitieron establecer la posición angular del anillo *gem* dimetilpirano, por los acoplamientos a dos enlaces de distancia de H7 con C8a y C6, de H8 con C4b y C6. Así como, la del anillo de piranona por el acoplamiento entre H3 con C2 (C=O) a dos enlaces, y con C4a y C13 a tres enlaces de distancia.

La asignación de las señales de H y C que permitió determinar que se trataba de un derivado de (-)-calanólido B fue apoyada por los espectros DEPT y de correlación HSQC y HMBC (ver anexos). Adicionalmente, el peso molecular del compuesto se vio incrementado en 15 unidades debido al metoxilo (OCH₃), observándose el ion 384 [M]⁺ (35 %) correspondiente con el peso molecular del 12-metoxi(-)-calanólido B; además

una señal del ion $[M]^+$ en 370 (30 %) correspondiente con el peso molecular del calanólido B (Figura 34).

12-Metoxi(-)-Calanólido B o 12-Metoxi-Costatólido. Aceite amarillo. $[\alpha]_D^{25}$: -16 ($c=2.5$ mg/ml, $CHCl_3$). EM-IE m/z (% intensidad): 385 $[M+H]^+$ (20), 384 $[M]^+$ (35), 371 (13), 370 (30) 369 (100), 353 (45), 337 (55), 208 (40), 151 (23), 57 (27).

RMN- 1H (300 MHz, $CDCl_3/TMS$) δ (ppm): 6.64 (1H, d, $J=10$ Hz, H8), 5.96 (1H, s, H3), 5.52 (1H, d, $J=10$ Hz, H7), 5.09 (1H, d, $J=5.1$ Hz, H12), 4.49 (1H, dc, $J=2, 6.5$ Hz, H10), 3.56 (3H, s, H20 (OCH_3)), 2.96-2.79 (2H, m, H13, 13'), 2.09-2.02 (1H, m, H11), 1.68-1.59 (2H, m, H14, 14'), 1.47 (3H, s, H16), 1.49 (3H, s, 17), 1.42 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H18), 1.0 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H15), 0.77 (3H, d, $J=7$ Hz, H19).

RMN- ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3/TMS$) δ (ppm): 160.86 (C-2, C=O), 158.3 (C-4), 153.0 (C12b), 151.5 (C-4b), 126.6 (C-7, CH), 116.6 (C-8, CH), 110.7 (C-3, CH), 110.4 (C8b), 105.9 (C-12a), 103.9 (C8a), 101.9 (C-4a), 77.7 (C6), 73.4 (C-12, CH), 70.9 (C-10, CH), 57.0 (C-20, OCH_3), 38.6 (C-13, CH_2), 33.8 (C-11, CH), 27.9 (C-17, CH_3), 27.7 (C-16, CH_3), 23.2 (C-14, CH_2), 17.8 (C18, CH_3), 13.9 (C-15, CH_3), 9.0 (C-19, CH_3).

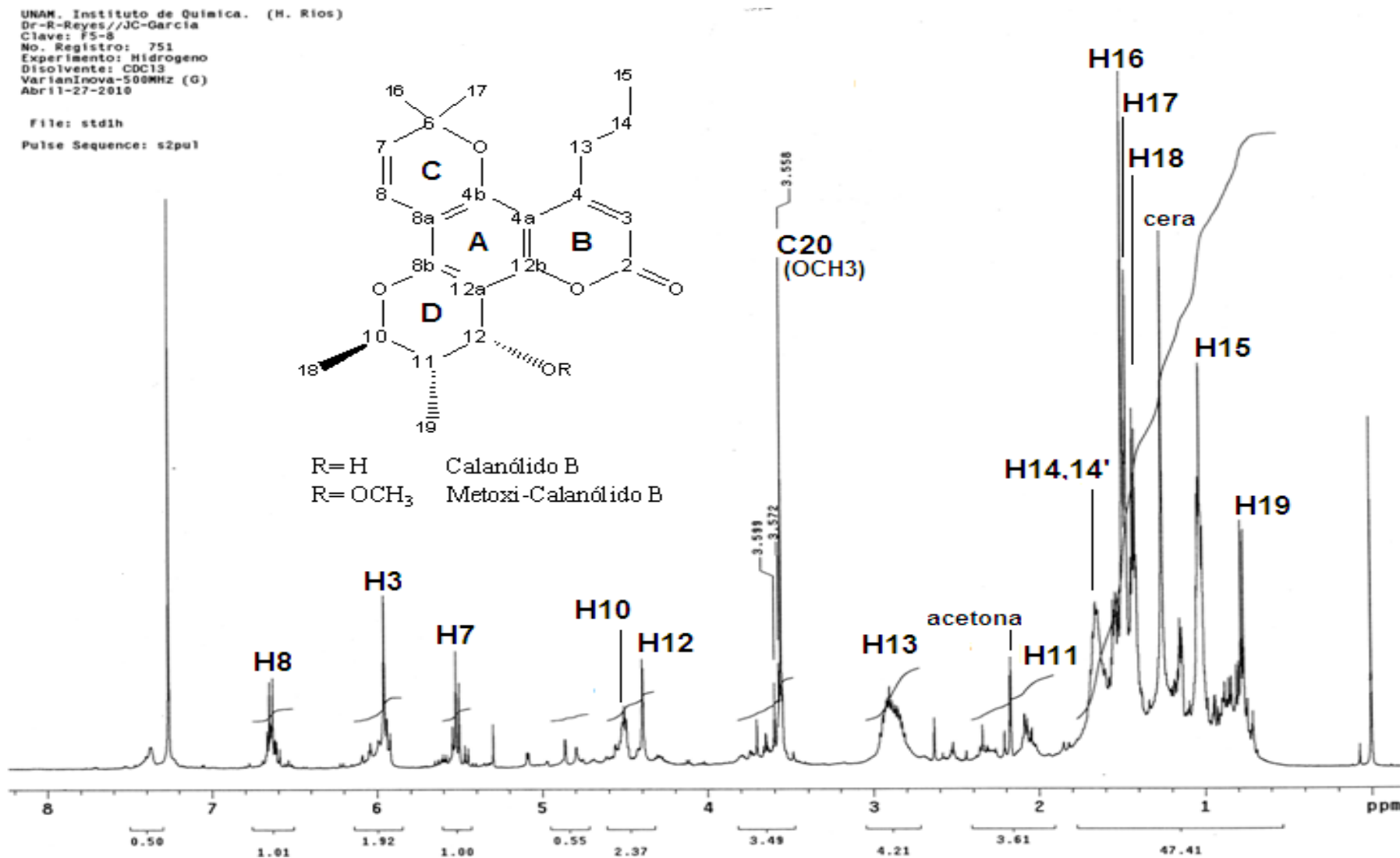


Figura 30. Espectro de RMN ¹H del 12-metoxi(-)-calanolido B.

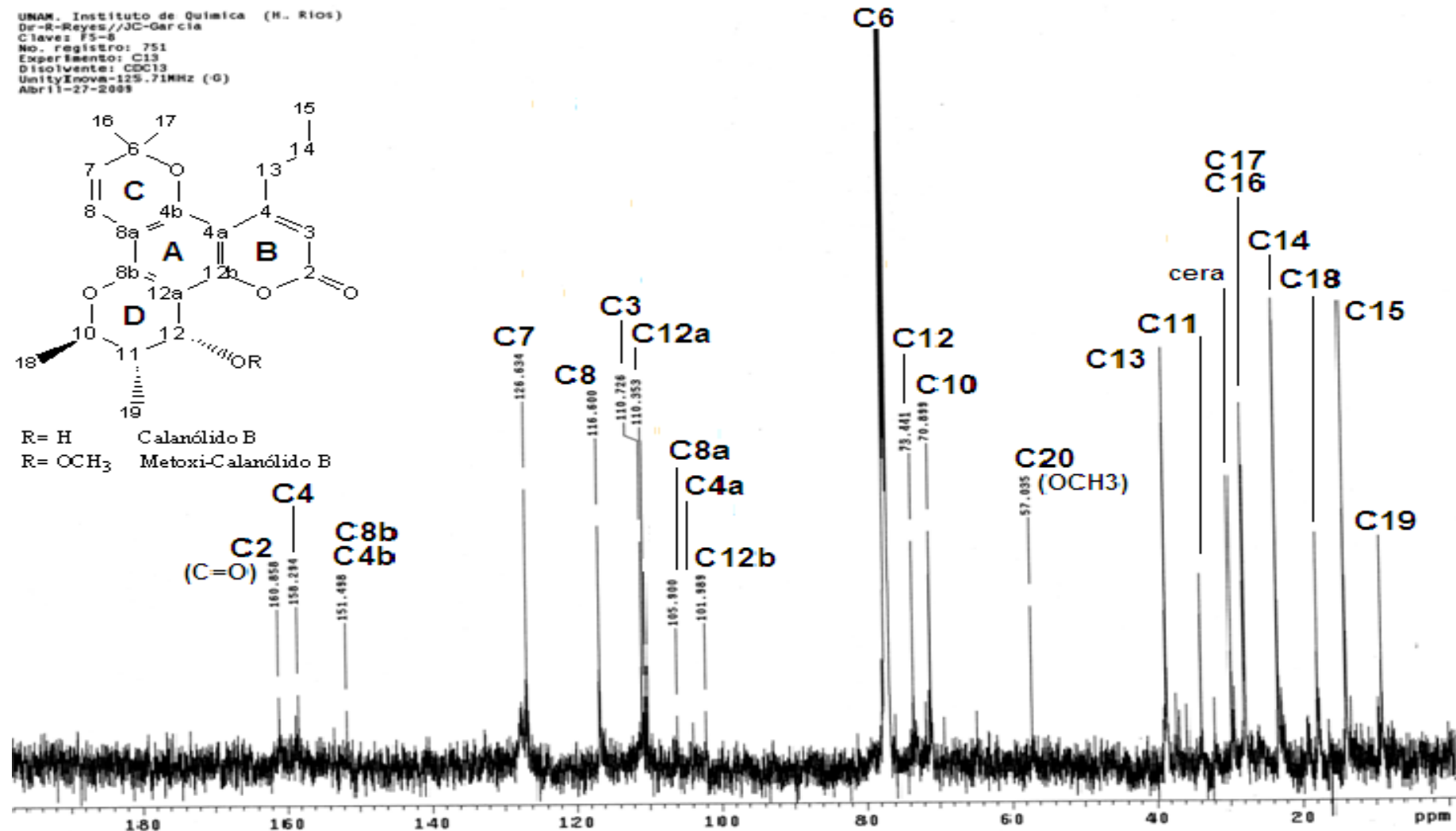


Figura 31. Espectro de RMN ¹³ C del 12-metoxi(-)-calanólido B.

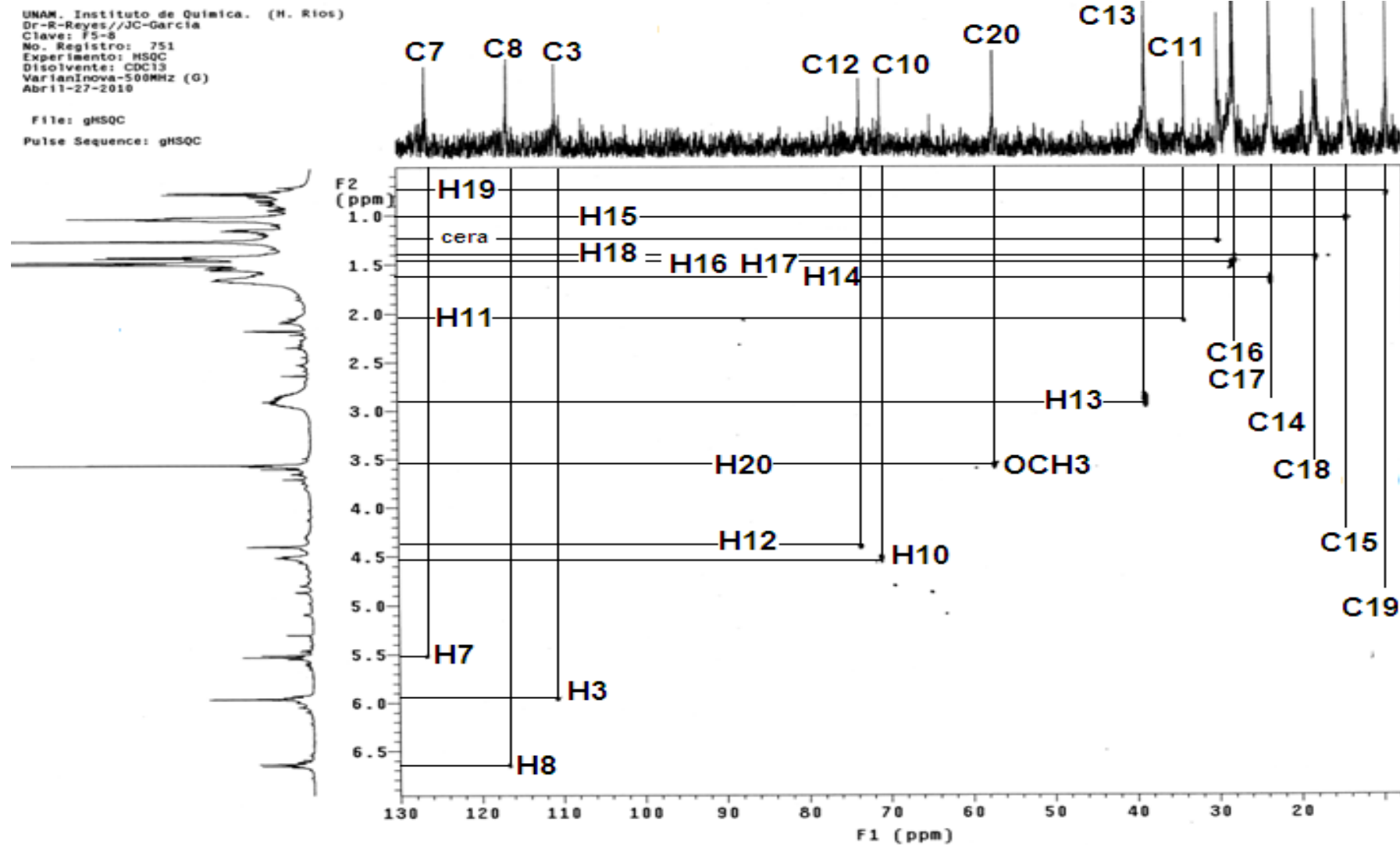


Figura 32. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -Experimento HSQC- del 12-metoxi(-)-calanólido B.

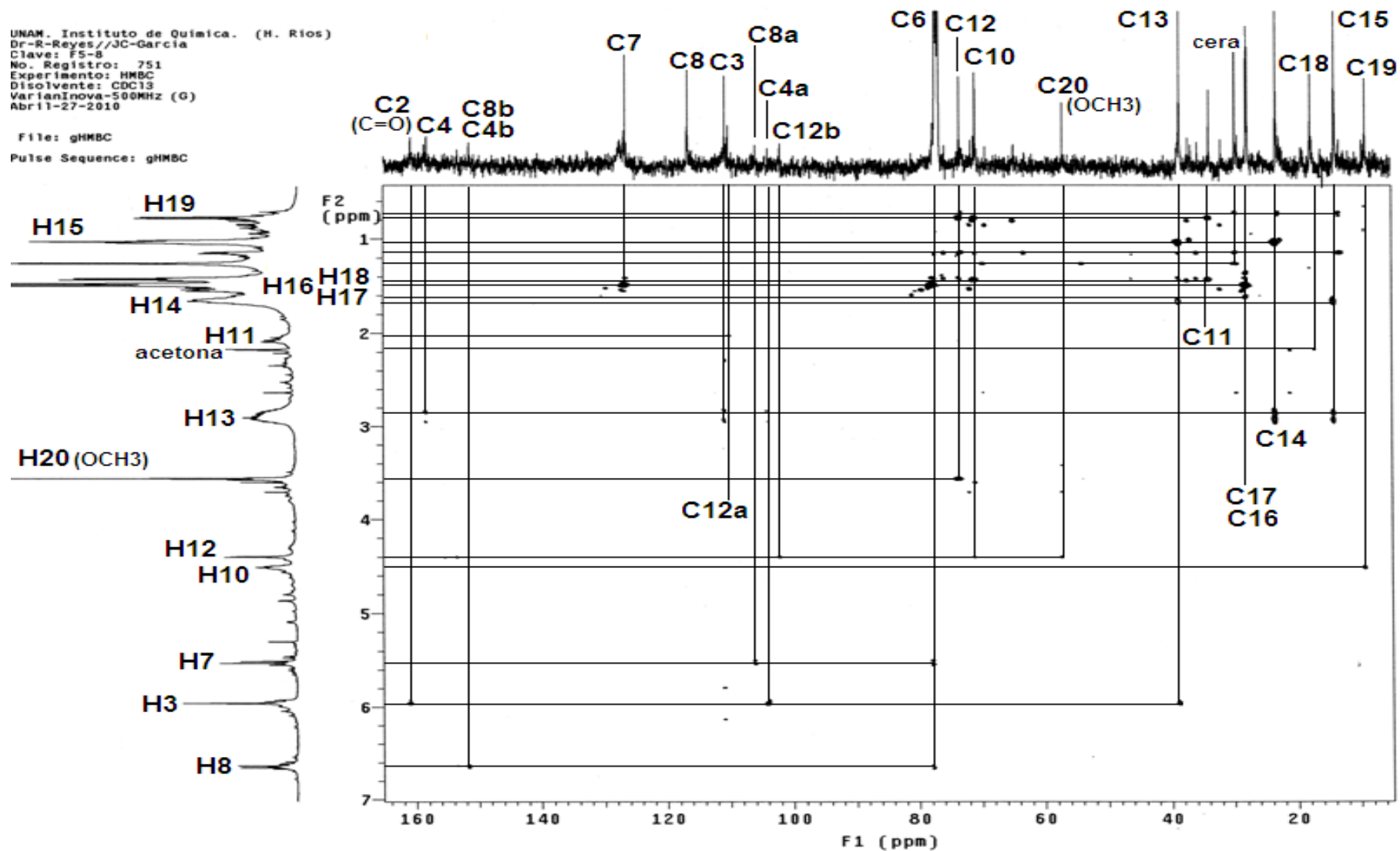


Figura 33. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -Experimento HMBC- del 12-metoxi(-)-calanolido B.

Mass Spectrum]
 Date : 06-May-2010 18:00
 Sample: 303 2EI F 5-B JeolIX505HA
 Date: Javier-Perez
 Method: Direct
 Ion Mode: EI+
 Spectrum Type: Normal Ion [MF-Linear]
 Time: 1.07 min Scan#: (24,33)
 P: m/z 369.0000 Int.: 1252.52
 Output m/z range: 10.0000 to 485.8754
 Cut Level: 0.00 %

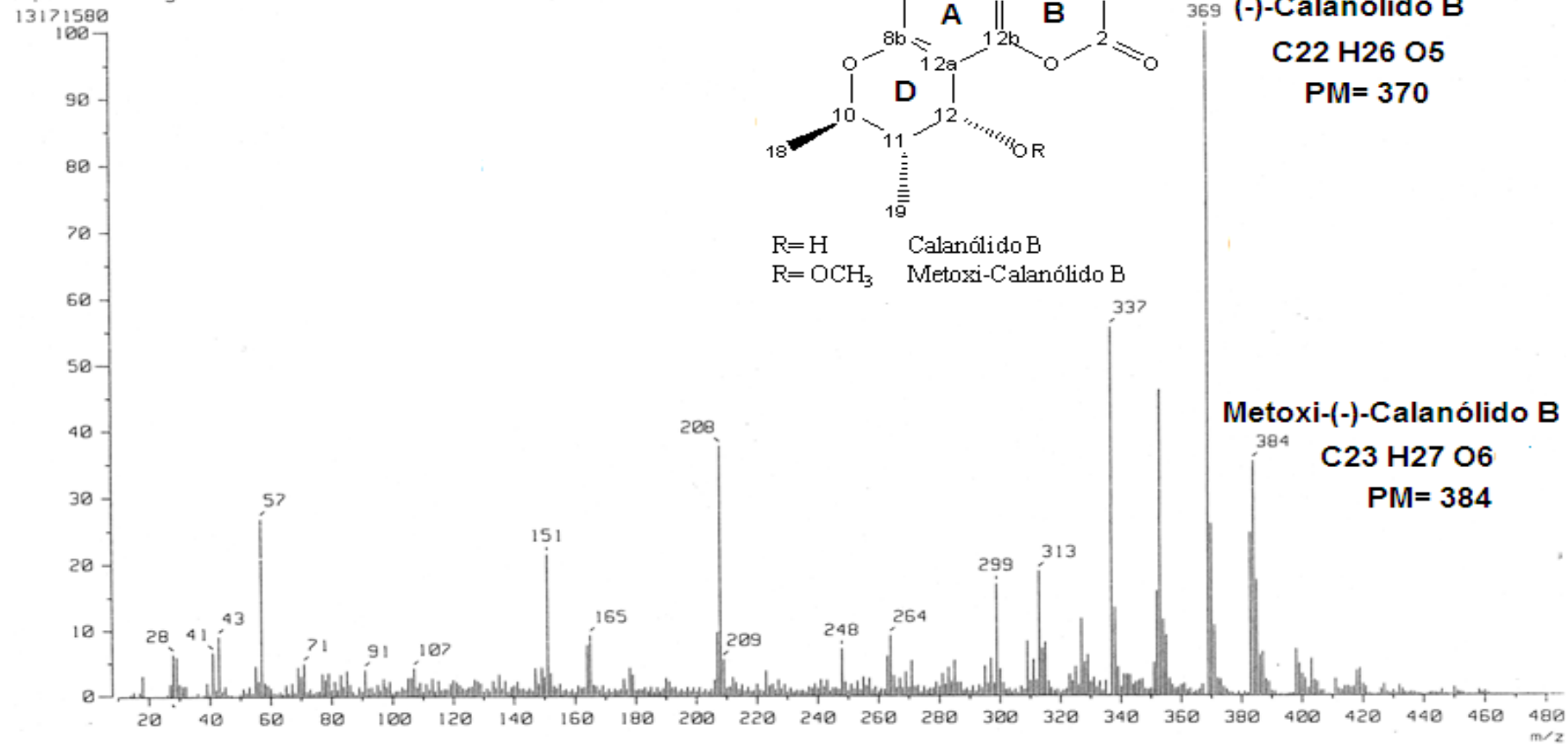


Figura 34. Espectro de Masas del 12-metoxi-(-)-calanolido B.

De la sub-fracción SF2-7 (ver anexos para espectro) y SF6-7 se aisló una mezcla de dos compuestos, los cuales de acuerdo a los datos experimentales obtenidos (RO, RMN ^1H y ^{13}C , y EM) y comparados con lo reportado en la literatura correspondieron con la dipiranocoumarina tetracíclica: (+)-inofilum P (Patil *et al.*, 1993) y su derivado 12-metoxi-(+)-inofilum P (Figuras 35-39). Este compuesto difiere de los calanólidos por presentar un sustituyente fenilo en lugar del propilo en el carbono C4. El anillo aromático fue evidenciado en el espectro de RMN ^1H por una señal múltiple entre 7.38-7.35 ppm para los hidrógenos H15, H16 y H17 y otra en 7.25-7.22 ppm para H14 y H18; mientras que en el espectro de RMN ^{13}C aparecieron tres señales, una en 127.5 ppm para los carbonos C15 y C17, 127.4 ppm para C16 y 127.10 ppm para C14 y C18. La presencia del anillo *gem* dimetilpirano (anillo C) se determinó por las señales dobles de los hidrógenos vinílicos H8 y H7, cuyos desplazamientos químicos están en 6.53 ppm y 5.36 ppm, respectivamente, su constante de acoplamiento $J_{7-8} = 10$ Hz, indica que están en posición *cis*. En el espectro de RMN ^{13}C , los carbonos se observaron a 127.60 ppm y 116.10 ppm, respectivamente.

La presencia de otro anillo dimetildihidropirano (anillo D), fue determinada por los protones de un metilo y un metino acoplados, localizados en las posiciones H21 y H10, los cuales fueron indicados por una señal doble en 1.43 ppm (3H, $J = 6.5$ Hz) y una señal cuádruple doble entre 4.41 ppm (1H, $J = 3.3$ y 6.5 Hz), respectivamente. Un sistema similar se observó para los hidrógenos del metilo

H22 y metino H11, los cuales fueron indicados mediante la señal 1.17 ppm (3H, J= 7.5 Hz) y un multiplete entre 2.33-2.27 ppm (1H), respectivamente. La constante de acoplamiento entre los hidrógenos H10 y H11, fue $J_{10-11} = 3.3$ Hz. El hidrógeno H11 se acopla además al H12, cuyo desplazamiento químico es 5.158 ppm con una J= 5.5 Hz. La presencia del anillo de piranona (anillo B) fue determinado por la señal del hidrógeno vinílico H3 en 5.95 ppm y para el carbono C3 en 112.12 ppm. Finalmente, las correlaciones establecidas con el experimento HMBC permitieron establecer la posición angular del anillo *gem* dimetilpirano, por los acoplamientos a dos enlaces de distancia de H7 con C8a y C6, de H8 con C4b, C6, y C8b. Así como, la del anillo de piranona por el acoplamiento entre H3 con C2 (C=O) a dos enlaces, y con C4a y C13 a tres enlaces de distancia.

La asignación de las señales fue soportada por los experimentos DEPT, HSQC y HMBC (ver anexos). Adicionalmente, se observó una señal del ion 404 $[M]^+$ (30 %) correspondiente con el peso molecular del inofilum P (Figura 39). La RO no sufrió gran alteración debido a la mezcla con el derivado y fue similar al reportado en literatura.

(+)-Inofilum P. Aceite amarillo. EM-IE m/z (% intensidad): 405 $[M+H]^+$ (5), 404 $[M]^+$ (30), 403 $[M-H]^+$ (85), 385 (35), 371 (100). $[\alpha]_D^{25}$: +30.8 (c= 4.35 mg/ml, $CHCl_3$).

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 7.38-7.36 (3H, m, H-15, H-16 y H-17), 7.25-7.23 (2H, m, H-14 y H-18), 6.53 (1H, d, J= 10.5 Hz, H-8), 5.95 (1H, s, H-3), 5.36 (1H, d, J= 10 Hz, H-7), 5.16 (1H, d, J= 5.5 Hz, H-12), 4.41 (1H, dc, J= 3.5, 6.5 Hz, H-10), 3.21 (1H, s amplia OH), 2.33-2.27 (1H, m, H-11), 1.43 (3H, d, J= 6.5 Hz, H-21), 1.17 (3H, d, J= 7 Hz, H-22), 0.95 (3H, s, H-20), 0.93 (3H, s, H-19).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 160.2 (C-2, C=O), 156.4 (C-4), 152.7 (C-12b), 153.9 (C-8b), 151.1 (C-4b), 140.2 (C-13), 127.6 (C-7, CH), 127.5 (C-15, C-17, CH aromático), 127.4 (C-16, CH aromático), 127.1 (C-14, C-18, CH aromático), 116.1 (C-8, CH), 111.6 (C-3, CH), 105.9 (C-8a), 103.4 (C-4a) 77.7 (C-6), 75.9 (C-10, CH), 63.2 (C-12, CH), 35.7 (C-11, CH), 26.9 (C-19, CH₃), 26.8 (C-20, CH₃), 16.2 (C-21, CH₃), 9.5 (C-22, CH₃).

Las diferencias observadas entre (+)-inofilum P y su derivado, 12-metoxi-(+)-inofilum P, en el espectro RMN ¹H y ¹³C, se encontraron principalmente en los desplazamientos químicos de los hidrógenos H3, H7, H8, H10, H11 y H12, y los carbonos C2 (C=O), C3, C8a, C10, C11, C12, C21 y C22 (Figuras 35-39). La principal señal diagnóstica que permitió determinar que se trataba del derivado fue la presencia de los hidrógenos del metilo y carbono del sustituyente metoxilo (OCH₃), cuyo desplazamiento fue 3.6 ppm para H23 y 63.15 ppm para C23, respectivamente. Además, se observó la correlación en el espectro HMBC a tres enlaces de distancia entre los hidrógenos del metoxilo H23 con el C12 y del

hidrógeno H12 con el carbono del metoxilo C23. La asignación de los H y C que permitió diferenciar a cada compuesto fue apoyada por los espectros DEPT y de correlación HSQC y HMBC (ver anexos). Adicionalmente, el peso molecular se vio incrementado en 15 unidades, observándose un ion en 418 [M]⁺ (30 %) debido al metoxilo (Figura 39).

12-Metoxi-(+)-Inofilum P: Aceite amarillo. EM-IE *m/z* (% intensidad): 419 [M+H]⁺ (15), 418 [M]⁺ (30), 404 (5), 403 (85), 385 (35), 371 (100). $[\alpha]_D^{25}$: +30.8 (*c*= 4.35 mg/ml, CHCl₃).

*RMN*¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 7.38-7.36 (3H, *m*, H-15, H-16 y H-17), 7.25-7.223 (2H, *m*, H-14 y H-18), 6.54 (1H, *d*, *J*= 10 Hz, H-8), 5.97 (1H, *s*, H-3), 5.34 (1H, *d*, *J*= 9.5 Hz, H-7), 4.46 (1H, *d*, *J*= 2 Hz, H-12), 4.53 (1H, *cd*, *J*= 2, 7 Hz, H-10), 3.6 (3H, *s*, H₂₃ (OCH₃)), 2.12-2.09 (1H, *m*, H-11), 1.43 (3H, *d*, *J*= 6.5 Hz, H-21), 0.77 (3H, *d*, *J*= 7.5 Hz, H-22), 0.94 (3H, *s*, H-20), 0.92 (3H, *s*, H-19).

*RMN*¹³C (125 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 160.47 (C-2, C=O), 156 (C-4), 153.97 (C-12b), 152.7 (C-8b), 151.1 (C-4b), 140.2 (C-13), 127.6 (C-7, CH), 127.5 (C-15, C-17, CH aromático), 127.4 (C-16, CH aromático), 127.1 (C-14, C-18, CH aromático), 116.01 (C-8, CH), 112.11 (C-3, CH), 105.9 (C-8a), 103.4 (C-4a) 77.7 (C-6), 70.99 (C-10, CH), 73.41 (C-12, CH), 33.79 (C-11, CH), 26.97 (C-20, CH₃) 26.89 (C-19, CH₃), 17.74 (C-21, CH₃), 9.06 (C-22, CH₃), 57.05 (C-23, CH₃, OCH₃).

UNAM. Instituto de Química. (H. Ríos)
 Dr-R-Reyes/JC-García
 Clave: Fpp 6-7
 No. Registro: 750
 Experimento: Hidrogeno
 Disolvente: CDC13
 VarianInova-500MHz (G)
 Abril-26-2010

File: std1h
 Pulse Sequence: s2pu1

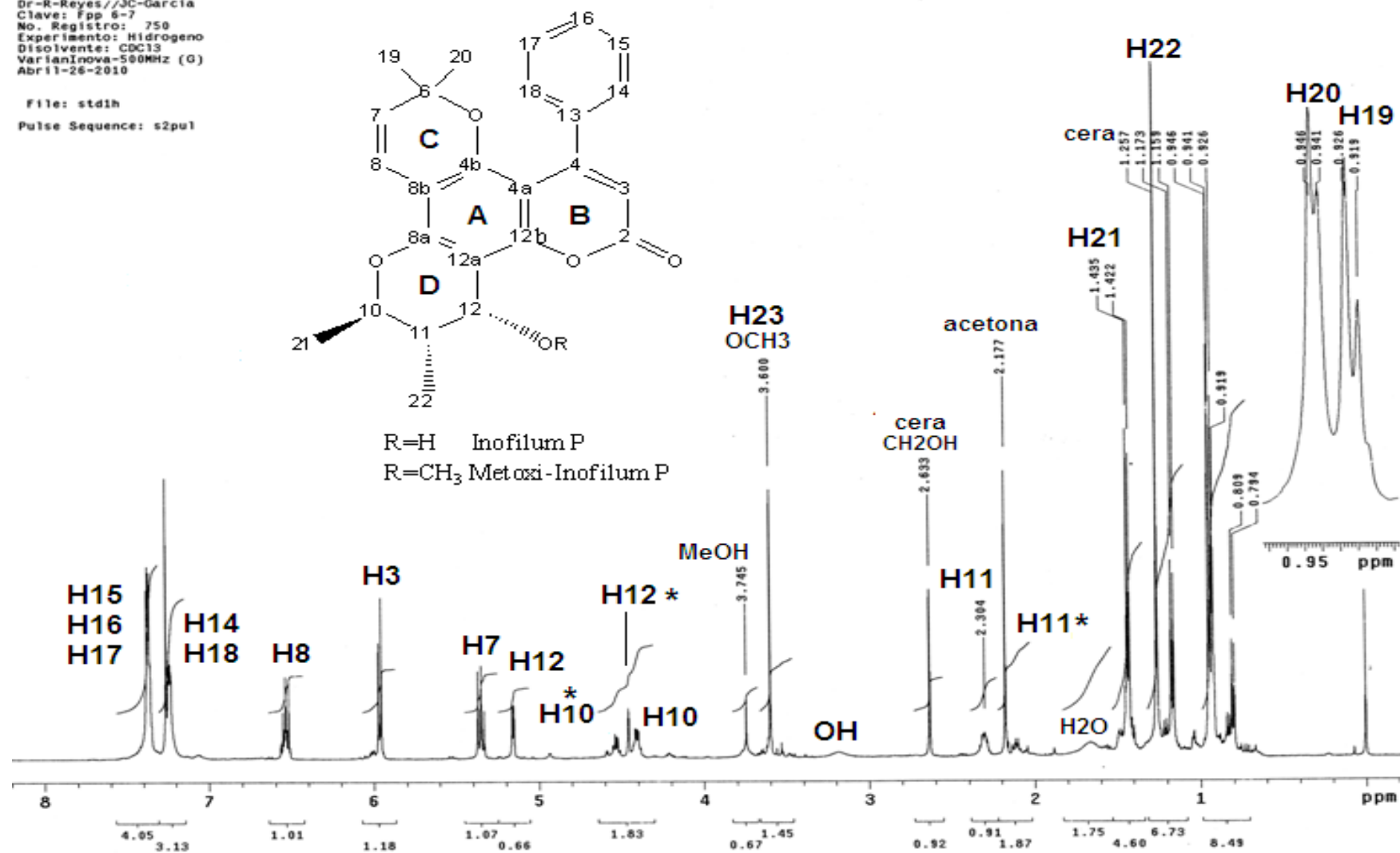


Figura 35. Espectro de RMN ¹H del (+)-inofilum P y 12-metoxi-(+)-inofilum P*.

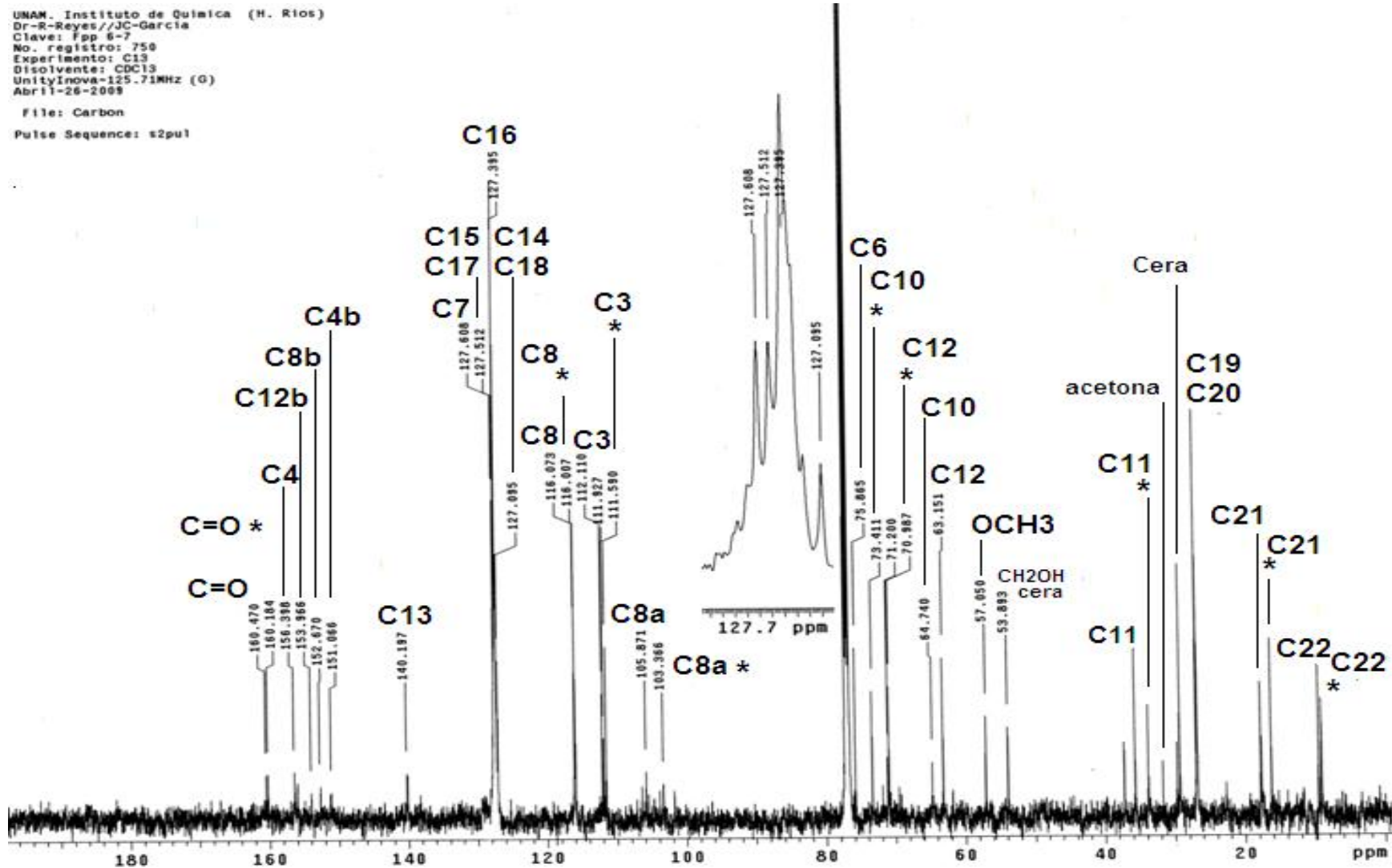


Figura 36. Espectro de RMN ¹³C del (+)-inofilum P y 12-metoxi-(+)-inofilum P*.

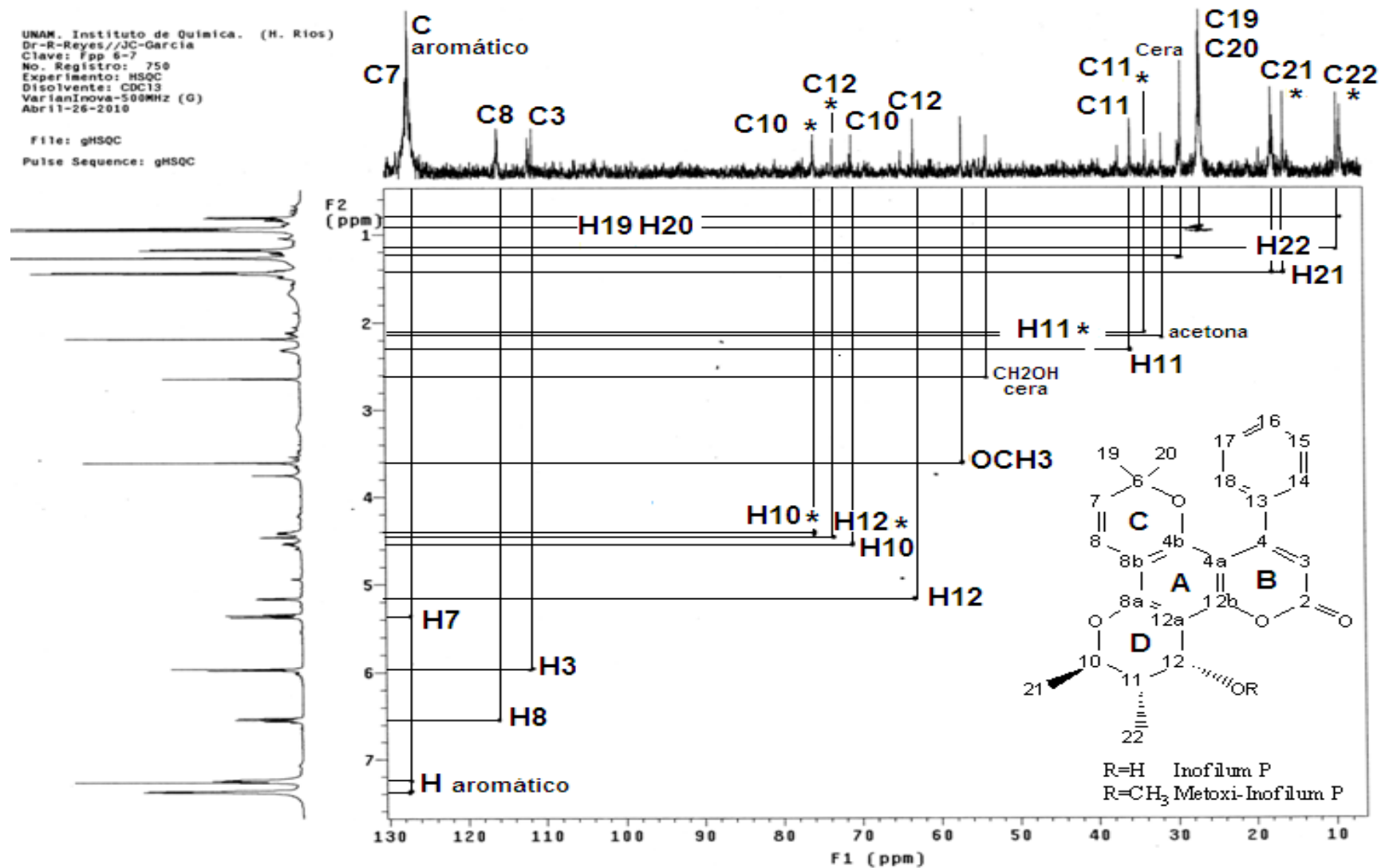


Figura 37. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -Experimento HSQC- del (+)-inofilum P y 12-metoxi-(+)-inofilum P*.

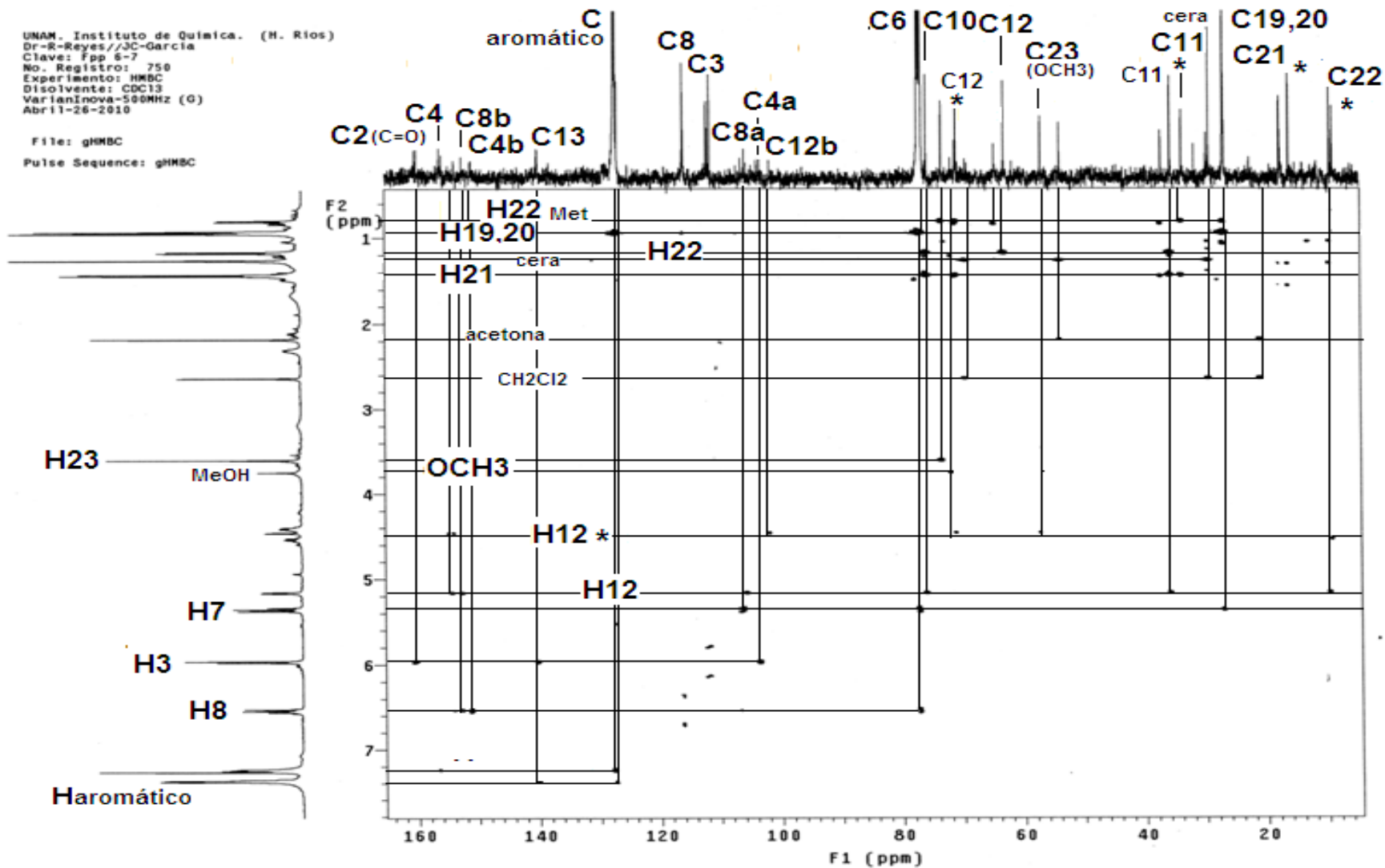


Figura 38. Espectro de RMN ¹H-¹³C -Experimento HMBC- del (+)-inofilum P y 12-metoxi-(+)-inofilum P*.

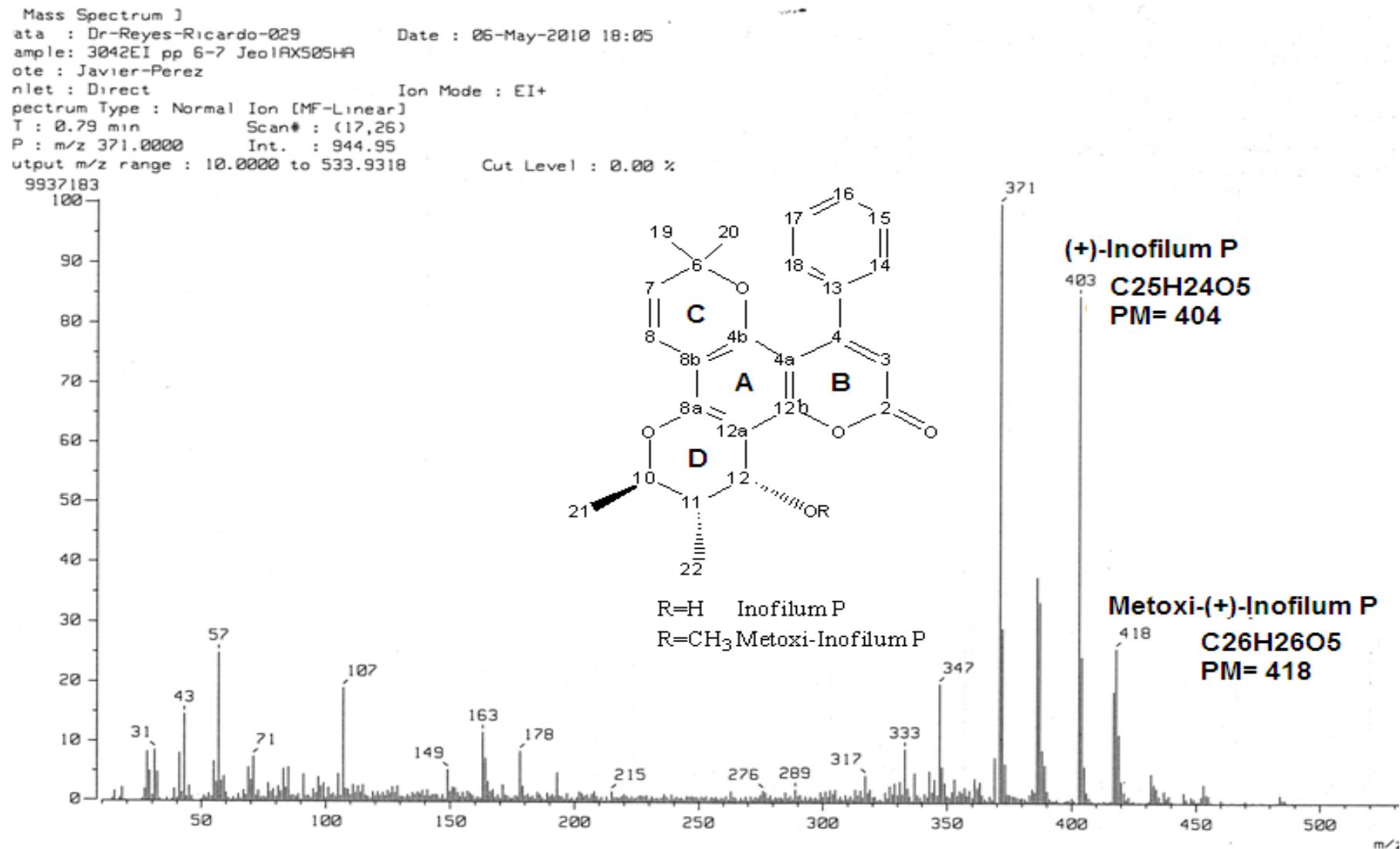


Figura 39. Espectro de Masas del (+)-inofilum P y 12-metoxi-(+)-inofilum P.

7.2.4.3. Coumarinas tricíclicas

En la sub-fracción SF4-5 (Figura 40, ver anexos para ampliación de espectro) se identificó la coumarina tricíclica, 5-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metil-1-oxo-2-butenil)-10-propil-2H, 8H-benzo [1,2b;3,4-b'] dipiran-8-ona, denominada trivialmente como GUT-70 mezclado con la cromanona, ácido apotético. La coumarina, GUT-70, presenta un grupo metoxilo (H₂₀, OCH₃), cuyo desplazamiento químico es $\delta = 3.75$ ppm. Además del H₁₀ cuya señal es un triplete en $\delta = 6.47$ ppm, el H₁₈ y H₁₉ en 1.19 y 1.45 ppm, respectivamente, las cuales nos indicaron que el anillo dimetildihidropirano no estaba formado. Los datos de RMN ¹H fueron comparados con lo reportado en la literatura. La presencia del anillo *gem* dimetilpirano (anillo C) se determinó por las señales dobles de los hidrógenos vinílicos H₈ y H₇, cuyos desplazamientos químicos están en 6.48 ppm y 5.58 ppm, respectivamente; su constante de acoplamiento promedio $J_{7-8} = 9.5$ Hz, indica que están en posición *cis*. La presencia de otro anillo de piranona (anillo B) fue indicada por la señal del hidrógeno vinílico H₃ en 5.93 ppm. El sustituyente propilo fue observado por las señales en 2.83 ppm, 1.64 ppm, 0.97 ppm para H₁₃-H₁₅.

GUT-70: RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 6.48 (1H, d, J= 12 Hz, H-8), 6.40 (1H, c (t), J= 7.5 Hz, H-10), 5.93 (1H, s, H-3), 5.58 (1H, d, J= 9 Hz, H-7), 3.68 (s, OCH₃, H-21), 2.83 (2H, t, J= 9 Hz, H-13), 1.92 (d, J= 9 Hz, H-17), 1.79 (d, J= 9 Hz, H-16), 1.64 (2H, m, H-14), 1.45 (3H, s, H-19), 1.19 (3H, s, H-18), 0.97 (3H, t, J= 9 Hz, H-15).

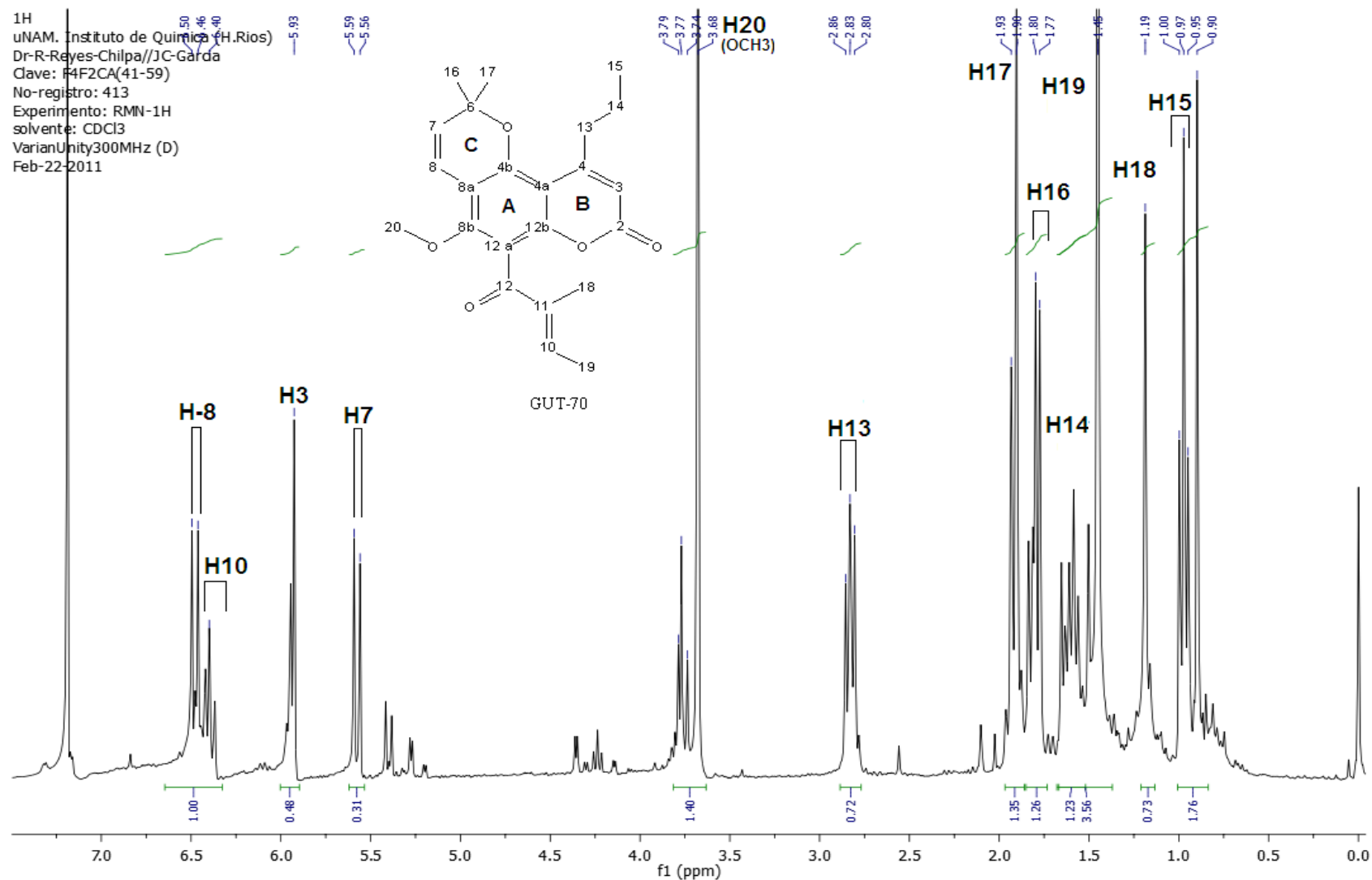


Figura 40. Espectro de RMN ¹H de GUT-70.

El resto de las sub-fracciones obtenidas fueron mezclas complejas. En la sub-fracción SF3-5 se identificó una mezcla de ácido apetalico más inofilum, en la sub-fracción SF2-6 y SF3-6 se detectó ácido apetalico más inofilum. Una mezcla de ácido apetalico e inofilum fue obtenida en la sub-fracción SF5-6, SF6-6 y SF7-6. En la sub-fracción SF2-7 se observó una mezcla de inofilum P y su derivado metoxilado. En las sub-fracciones SF3-7 y SF5-7 se identificó mezcla de inofilums, y finalmente, en las sub-fracciones SF4-8 y SF6-8 mezcla de calanólido e inofilum. Sin embargo, como se obtuvieron cantidades mínimas para seguir efectuando la purificación de sus componentes, se seleccionaron las sub-fracciones SF4-5 y SF6-5, SF2-6, SF7-6, SF2-7 y SF4-7 para su caracterización por CLAR-UV-EM, cuyos resultados se detallan adelante.

7.2.5. Identificación de Compuestos por CLAR-UV-EM

El perfil CLAR-UV-EM (ESI+) del ácido apetalico, GUT-70, (-)-calanólido B, (+)-inofilum P y los derivados 12-metoxil(-)-calnólido B y 12-metoxi-(+)-inofilum P fueron obtenidos para identificarlos dentro de las sub-fracciones seleccionadas previamente (Figura 41). La relación m/z observado para ácido apetalico (PM= 388) fue el ion de 389 $[M+H]^+$ y para GUT-70 (PM= 382) el ion 383 $[M+H]^+$; sin embargo, para (+)-inofilum P y su derivado 12-metoxi-(+)-inofilum P (PM= 404 y 418, respectivamente) el ion observado fue 387 $[M+H-H_2O]^+$ para ambos compuestos. Esto indica que ocurrió una transición de 405 \rightarrow 387 (Charles *et al.*, 2004), y para el (-)-calanólido B y su derivado 12-metoxi(-)-calanólido B (PM= 370

y 384, respectivamente) un ion de $353 [M+H-H_2O]^+$ para ambos compuestos, que también indica una transición de $371 \rightarrow 353$. En los casos del (+)-inofilum P y (-)-calanólido B hay pérdida de una molécula de H_2O (PM=18); mientras que en los derivados 12-metoxilado, la transición ocurre por la pérdida del metilo ($-CH_3$) y agua (H_2O), $[M+H-CH_3-H_2O]^+$. Respecto a las sub-fracciones analizadas por CLAR-UV-EM mostraron los siguientes patrones cromatográficos:

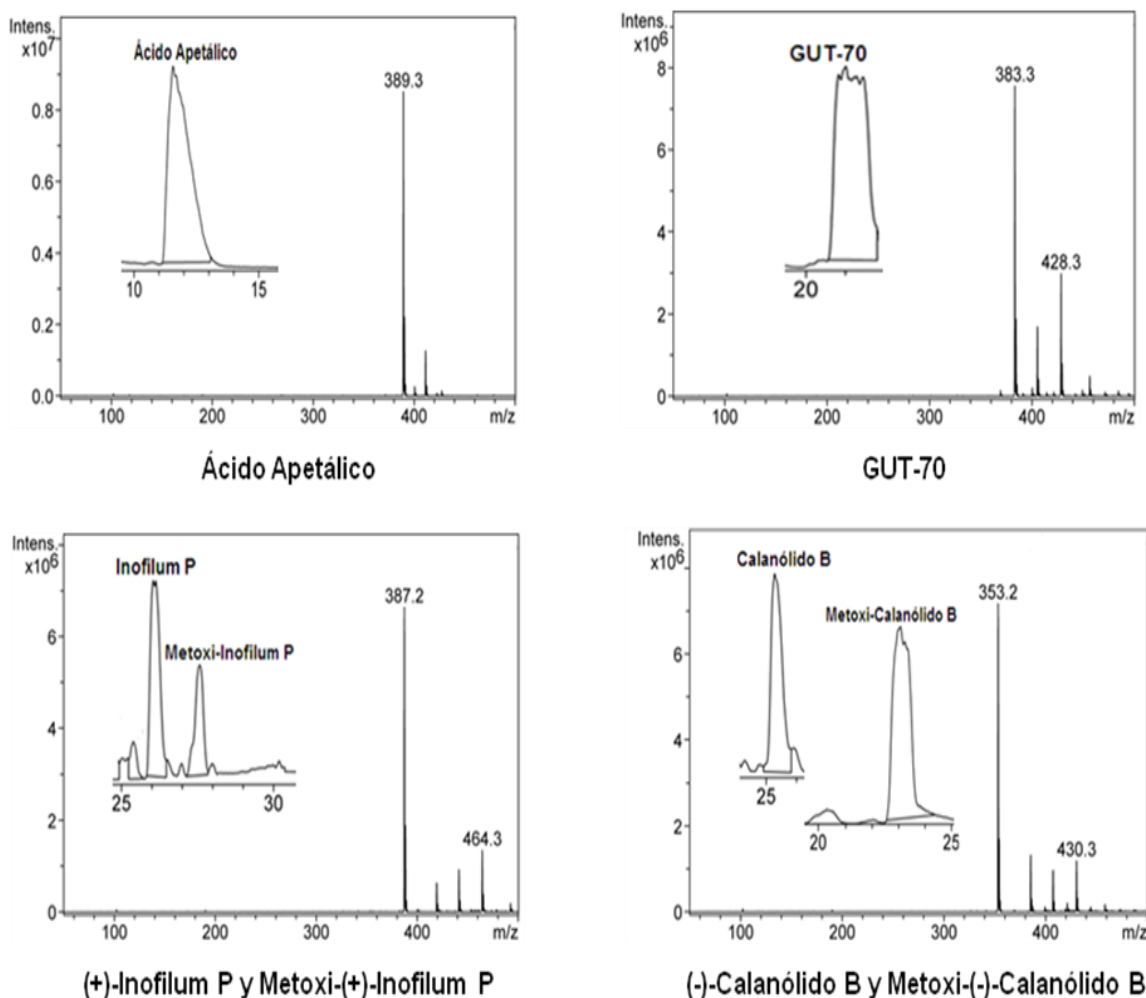


Figura 41. Perfil CLAR-UV-EM de ácido apetálico, GUT-70, inofilum P, calanólido B y los derivados 12-metoxilado.

En la *sub-fracción SF4-5* por RMN ^1H se había identificado ácido apetalico y la coumarina GUT-70, los cuales fueron confirmados por el perfil CLAR-EM, en donde se observaron dos picos abundantes, el primero correspondió a la coumarina tricíclica, GUT-70, PM= 382 (tr= 27.3 min, %Área= 31.1 min, $[\text{M}+\text{H}]^+= 383.2$); mientras que, el segundo se identificó como la cromanona, ácido apetalico, PM= 388 (tr= 28.9 min, %Área= 30.8, $[\text{M}+\text{H}]^+= 389.2$) (Figura 42).

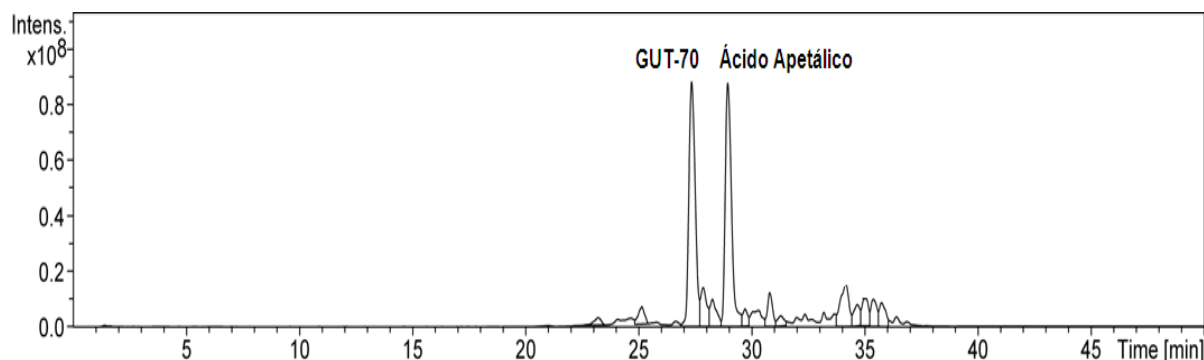


Figura 42. Cromatograma de la sub-fracción *SF4-5*.

En la *sub-fracción SF6-5* por RMN ^1H se había identificado una mezcla de ácido apetalico y una coumarina. En el perfil CLAR-EM se observó un pico mayoritario, el cual se identificó como un isómero de GUT-70, PM=382 (tr= 28.2 min, % Área= 57.7, $[\text{M}+\text{H}]^+= 383.2$). También se observaron dos picos minoritarios, el primero correspondió con GUT-70, PM=382 (tr= 27.3 min, % Área=13.8, $[\text{M}+\text{H}]^+= 383.2$); mientras que, el segundo se identificó como ácido apetalico, PM= 388 (tr= 29.7 min, % Área= 12.6, $[\text{M}+\text{H}]^+= 389.3$) (Figura 43).

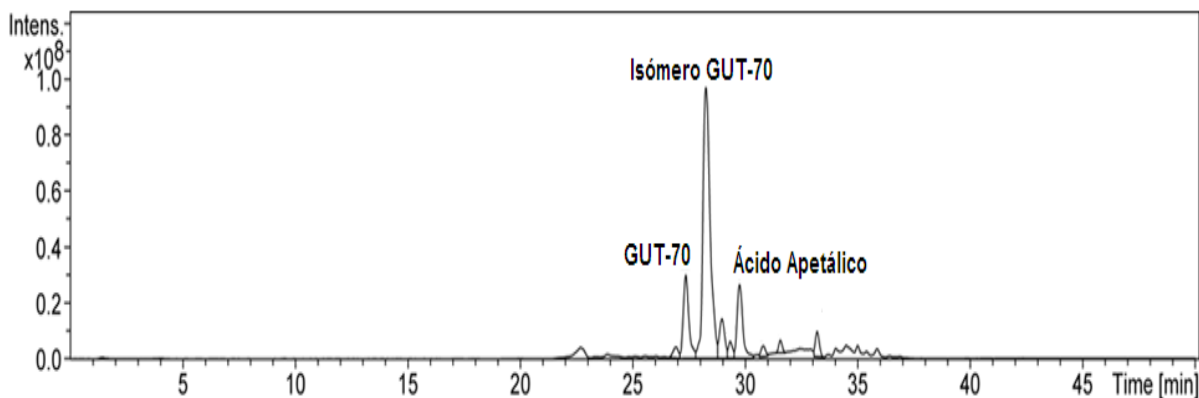


Figura 43. Cromatograma de la sub-fracción SF6-5.

En la *sub-fracción SF7-6* por RMN ^1H se había identificado una mezcla de calanólidos e inofilums, lo cual se confirmó por CLAR-EM. Se identificaron dos picos con mayor porcentaje, el primero correspondió a la dipiranocoumarina, inofilum P, PM=404 ($\text{tr}= 29.4$ min, % Área= 27.2, $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+= 387.2$), mientras que el segundo fue ácido apetálico, PM=388 ($\text{tr}= 29.6$ min, % Área= 14, $[\text{M}+\text{H}]^+= 389.2$) (Figura 44). Además se identificaron otros picos minoritarios cuyo ion fue de 353 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ y 383 $[\text{M}+\text{H}]^+$ que indican la presencia de calanólido (PM= 370) y GUT-70 (PM= 382), respectivamente, uno más de 387 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ para un isómero de inofilum P (PM= 404), y dos de 403 $[\text{M}+\text{H}]^+$ correspondiente con el inofilum C y E.

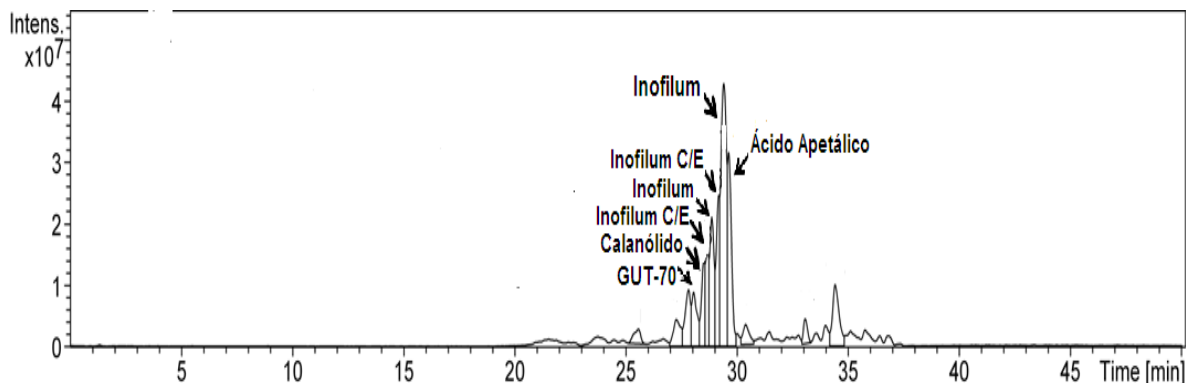


Figura 44. Cromatograma de la sub-fracción SF7-6.

En la *sub-fracción SF2-7* por RMN ^1H se había identificado inofilum P, y el derivado metoxilado, sin embargo, por CLAR-EM se identificaron un par de picos resueltos, los cuales indican la presencia del 12-metoxi-inofilum e isómero, $\text{PM}=404$ ($\text{tr}=24.8$ min, 25.6 min, % Área= 6.3, 18.4, $[\text{M}+\text{CH}_3]^+=419$). Los picos restantes se identificaron como GUT-70, $\text{PM}=382$ ($\text{tr}=27.2$ min, % A= 6.7, $[\text{M}+\text{H}]^+=383$), calanólido D e isómero ($\text{tr}=28$ min, 28.2 min, % Área= 10.5, 3.8, $[\text{M}+\text{H}]^+=369$), inofilum C y E, $\text{PM}=402$ ($\text{tr}=28.6$ min y 29.2 min, % Área= 8.5 y 12.7, $[\text{M}+\text{H}]^+=403.2$), e inofilum ($\text{tr}=30.5$ min, 8.4, $[\text{M}+\text{H}]^+=387$) (Figura 45).

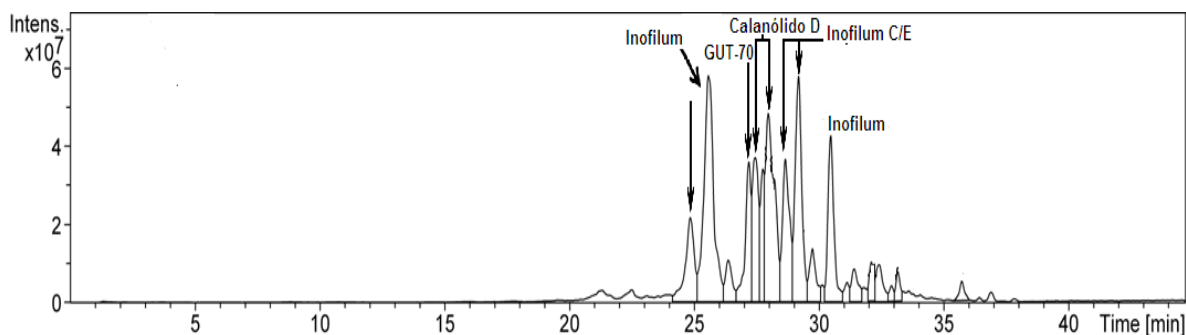


Figura 45. Cromatograma de la sub-fracción SF2-7.

Y finalmente, en la *sub-fracción SF4-7* por RMN ^1H se había identificado principalmente una mezcla de calanólidos A, B y C, sin embargo, por CLAR-EM se observó un pico mayoritario indicando la formación de 12-metoxi-calanólido ($t_r=24.9$ min, % Área= 13.1, $[\text{M}+\text{CH}_3]^+=385.2$), y una serie de picos para calanólido D e isómeros ($t_r=27.4$ min, 28.2 min y 28.8 min, % Área= 6.9, 10.8 y 7, $[\text{M}+\text{H}]^+=369.2$), inofilum C o E, PM= 402 ($t_r=29.2$ min, % Área= 9.3, $[\text{M}+\text{H}]^+=403$), y los calanólidos A, B y C y otro isómero ($t_r=30.1$ min, 30.9 min, 31.2 min y 32 min, % Área= 8.1, 5.6, 3.8 y 5.5, $[\text{M}+\text{H}]^+=353$), además se encontró la formación de dímeros en abundancia, tanto calanólido-inofilum, como calanólido-calanólido, esto pudo influir en la abundancia de los calanólidos A, B y C detectados por RMN ^1H (Figura 46). El perfil CLAR-EM de la *sub-fracción SF2-6* no se resolvió adecuadamente, sin embargo los espectros de masa indicaron una mezcla de inofilum C/E, inofilum P e isómeros de ambos compuestos, y abundante formación de dímeros.

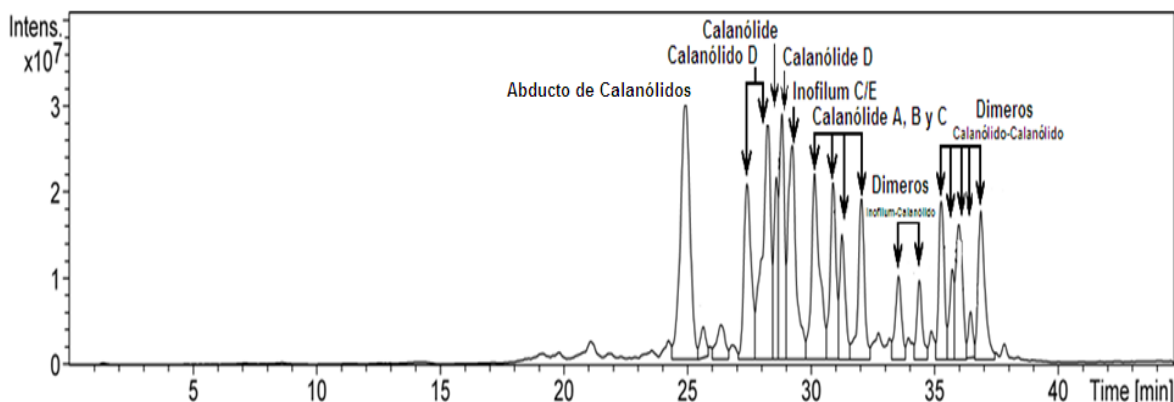


Figura 46. Cromatograma de la sub-fracción *SF4-7*.

7.2.6. Cuantificación de compuestos por CLAR-UV

Se cuantificó el contenido de (-)-calanólidos B, (+)- calanólido C y ácido apetalico, en los extractos de hexano de las colectas Selva y Soconusco, así como, de los quimiotipos 1 y 2. El mayor contenido de calanólido B lo presentó la muestra del QTP2, seguida de la colecta Soconusco; mientras que las muestras del QTP1 y la colecta Selva no contuvieron este compuesto. En el caso del calanólido C la mayor abundancia se presentó en la muestras de la colecta Soconusco, seguido de la colecta Selva; mientras que no se detectó en las muestras del QTP1 y QTP2. El contenido en ácido apetalico fue mayor para la muestra del QTP2, seguida por la colecta Soconusco, la colecta Selva y QTP1 (Tabla 10).

Por otro lado, se determinó por CLAR-EM el contenido de GUT-70 y su isómero, (+)-inofilum P y su derivado 12-metoxi-(+)-inofilum P, 12-metoxi-calanólido B, calanólido D, e inofilum C/E y la mezcla de calanólidos A, B y C en el extracto de hexano de la colecta Soconusco. La dipiranocoumarina (+)-inofilum P fue el compuesto más abundante, seguido del derivado 12-metoxi(-)-calanólido B, el isómero de la coumarina tricíclica GUT-70, la mezcla de calanólido A, B, y C, y el derivado metoxilado de (+)-Inofilum P, los compuestos GUT-70, calanólido D e isómeros y los inofilum C y E se detectaron en menor proporción (Tabla 11).

Tabla 10. Contenido de calanólidos B y C, y ácido apetalico de los extractos de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de la colecta Soconusco, Selva, QTP1 y QTP2.

Compuesto mg/kg hoja seca	QTP1	QTP2	SOCONUSCO	SELVA
(-)-Calanólido B (1)	N.D.	681.85	509.2	N.D.
(+)-Calanólido C (2)	N.D.	N.D.	2115.81	149.71
Ácido apetalico (3)	205.08	1681.85	1301.08	942.31

N.D. No detectado. El perfil cromatográfico de cada extracto se puede ver en la Fig. 8.

Tabla 11. Contenido de coumarinas y cromanonas del extracto de hexano de las hojas de *Calophyllum brasiliense* de la colecta Soconusco, Chiapas.

Compuesto (CLAR-EM)	mg/kg hoja seca
(+)-Inofilum P	2111.61
12-Metoxi(-)-Calanólido B	1544.7
Isómero de GUT-70	1471.4
Mezcla de Calanólidos A, B y C	1233.18
12-Metoxi(+)-Inofilum P	1057.92
GUT-70	793.08
Calanólido D e Isómeros	521.57
Inofilum C y E	447.66

8. DISCUSIÓN

Calophyllum brasiliense es una especie ampliamente distribuida en el continente americano (Stevens, 1980), y por lo tanto, químicamente diversa. Resultados previos han mostrado que las hojas de algunas poblaciones de *C. brasiliense* de México biosintetizan principalmente coumarinas tipo mammeas (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004) recibiendo el nombre de QTP1. Sin embargo, otros especímenes biosintetizan principalmente cromanonas, ácido apetalico, isoapetalico y calolónico, y en mucho menor cantidad las dipiranocoumarinas, calanólicos A, B y C y soulatrólido, denominándolo QTP2 (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b y Huerta-Reyes, 2004c). De manera similar, se ha observado la quimiodiversidad en otras especies de *Calophyllum* (Mckee *et al.*, 1998), tales como, *C. inophyllum* de las islas Polinesias (Laurè *et al.*, 2008), así como de especies de *Calophyllum* de Sri Lanka (Bandara *et al.*, 1986), también ha sido reportada.

En el análisis por cromatografía en capa fina se observó un patrón diferente en los extractos de hexano de hojas de *C. brasiliense* en dos poblaciones (Región Soconusco y Selva) de Chiapas (México), que indicó una composición química diferente. El presente trabajo ofrece un análisis químico del extracto vegetal hexánico de las hojas de *C. brasiliense* de la Región Soconusco, Chiapas. Además, dada la importancia de las dipiranocoumarinas, encontradas en esta especie, inhibiendo la actividad TR VIH-1, se determinó el perfil farmacológico y toxicológico de los extractos orgánicos de estas poblaciones de Chiapas.

En este estudio se obtuvo una mezcla aceitosa de las fracciones *F1* y *F2-41* del extracto de hexano de las hojas de *C.brasiliense*, de la colecta Soconusco (Chiapas, México) las cuales presentan principalmente compuestos de la clase terpenos, de ellos, los triterpenos, escualeno y estigmastan-3.5-dieno, y el sesquiterpeno, eudesma-4(14),11-dieno, parecen ser los más abundante. El escualeno, es reconocido por ser precursor de compuestos triterpénicos (Gunstone *et al.*, 1986). El estigmastan-3,5-dieno, se ha descrito como un compuesto de los aceites refinados, y su origen es resultado de la deshidratación del β -sitosterol (Cert *et al.*, 1994); sin embargo, algunas veces estos hidrocarburos pueden aparecer durante el análisis por CG, debido a las altas temperaturas y el ambiente reductor del sistema (León-Camacho *et al.*, 2004). Los eudesmanos han sido descritos como antialimentarios contra coleópteros y lepidópteros (Caballero-García, 2004). El derivado bromado del tetracosano también se ha encontrado en los volátiles del mango “Jinhuang”, siendo el más abundante (20.57 %) (Wei *et al.*, 2007).

Los triterpenos, friedelina y canofilol aislados del extracto de hexano de las hojas de *C. brasiliense* de la colecta Soconusco (Chiapas, México), son compuestos muy abundantes en esta especie y se han reportado tanto en el QTP1 (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004), como en el QTP2 (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b). Aunque ambos compuestos no tienen actividad anti TR (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b); canofilol y friedelina han mostrado ser potentes inhibidores del protozoario

Plasmodium falciparum cepa W2, el cual es resistente a cloroquina (CI_{50} = 15 y 7.2 μ M, respectivamente) (Tambou-NGouamegne *et al.*, 2008), además friedelina ha sido reportada que ejerce un efecto analgésico dosis-dependiente (Buffon-Isaias, 2005; Isaias *et al.*, 2004). La cromanona, ácido apetalico aislada aquí, también es un compuesto que se encuentra en proporciones abundantes en *C. brasiliense* QTP2 (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b y Huerta-Reyes, 2004c) de México, aunque no se ha aislado en el QTP1 (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004), sin embargo, no inhibe la actividad de la transcriptasa reversa (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b y Huerta-Reyes, 2004c); en contraste, este compuesto, posee actividad contra células cancerígenas (Ya-Ching *et al.*, 2004; Hay *et al.*, 2003).

Por otro lado, como se indicó en los antecedentes, las dipiranocoumarinas tetracíclicas: inofilums y calanólidos son consideradas como potentes inhibidoras de la actividad enzimática de TR VIH-1 (Kashman *et al.*, 1992, Patil *et al.*, 1993). En este trabajo se aislaron e identificaron del extracto de hexano de las hojas de *C. brasiliense* de la colecta Soconusco (Chiapas, México), tres compuestos de este tipo, una mezcla de (+)-inofilum P y su derivado metoxilado (12-metoxi-(+)-inofilum P), el derivado metoxilado de (-)-calanólido B (12-metoxi(-)-calanólido B). Un derivado similar el 12-metoxi-(+)-calanólido B, ya había sido descrito por Kashman *et al.* (1992). Adicionalmente, en las diferentes sub-fracciones se identificaron, mediante RMN 1H y CLAR-EM, (+)-calanólido A, (-)-calanólido B, (+)-calanólido C, (+)-calanólido D, GUT-70 y su isómero estructural, (+)-inofilum C y E,

así como isómeros estructurales de calanólidos e inófilums. Previamente, sólo se habían descrito (+)-calanólido A y C, (-)-calanólido B y un isómero de (+)-inofilum P (soulatrólido) (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b y Huerta-Reyes, 2004c), (+)-inofilum C y E (Kashman *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 2003), así como GUT-70 (Ito *et al.*, 2003) en *C. brasiliense*; mientras que los derivados metoxilados, 12-Metoxi-(+)-calanólido A y 12-metoxi(-)-calanólido B, (Kashman *et al.*, 1992) sólo se había identificado en *C. lanigerum*, respectivamente, pero no en *C. brasiliense*. De tal manera que, esta es la primera vez que las tetra dipiranocoumarinas (+)-inofilum P, 12-metoxi-(+)-inofilum P, (+)-calanólido D, y 12(-)-metoxi(-)-calanólido B, se encuentran en las hojas de *C. brasiliense* en poblaciones de México.

La cuantificación por CLAR de los compuestos marcadores, el (-)-calanólido B y (+)-calanólido C, además del ácido apetalico, en el extracto de hexano de las hojas de *C. brasiliense*, se encontró que la colecta de la Región Soconusco y Selva del estado de Chiapas, México, así como las de los quimiotipos 2 y 1 mostraron un perfil cromatográfico característico cada uno. Los primeros tres extractos contienen cantidades diferentes de calanólidos y ácido apetalico, mientras que el último, solamente mostró trazas de ácido apetalico, pero no calanólidos. Al respecto, el compuesto más abundante fue ácido apetalico, especialmente en el quimiotipo 2, seguido por Soconusco, Selva y quimiotipo 1. La más alta concentración del (-)-calanólido B se encontró en las hojas del quimiotipo 2, seguido del Soconusco, pero no fue detectado en el quimiotipo 1 y Selva. El

mayor contenido de (+)-calanólido C se encontró en el extracto de hexano del Soconusco, seguido por la Selva, pero indetectable en los quimiotipo 1 y 2.

En cuanto al contenido de ácido apetálico, resulta importante que la colecta Soconusco presente cantidades pequeñas de este compuesto respecto al quimiotipo 2, ya que se han reportado propiedades citotóxicas de los ácidos croman-4-ona (Hay *et al.*, 2003; Ernster *et al.*, 1963). Por otro lado, aunque en el quimiotipo 1 no se ha reportado la presencia de ácido apetálico (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004), resulta interesante haber detectado por CLAR trazas de este compuesto, ya que posiblemente, al ser cantidades mínimas, no se haya podido aislar en cantidad suficiente para poder dilucidar su presencia por métodos espectroscópicos. Por el contrario, aun cuando el (+)-calanólido C no fue detectado en el quimiotipo 2, este ya ha sido previamente aislado de esta población (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b y Huerta-Reyes, 2004c). Actualmente, (-)-calanólido B esta bajo estudio preclínico, y puede ser una alternativa al (+)-calanólido A, el cual se encuentra en bajas concentraciones en las especies de *Calophyllum* (Singh *et al.*, 2010). Al respecto, (-)-calanólido B ha sido obtenido con rendimientos de 10.6 % del látex de *C. teyssmannii* (Lin *et al.*, 1999); incluso la producción *in vitro* (cultivo de callos de hojas de *C. brasiliense*) de este calanólido, ha sido reportada con rendimientos tres veces mayores que en las hojas de invernadero y silvestres (Bernabé-Antonio *et al.*, 2010).

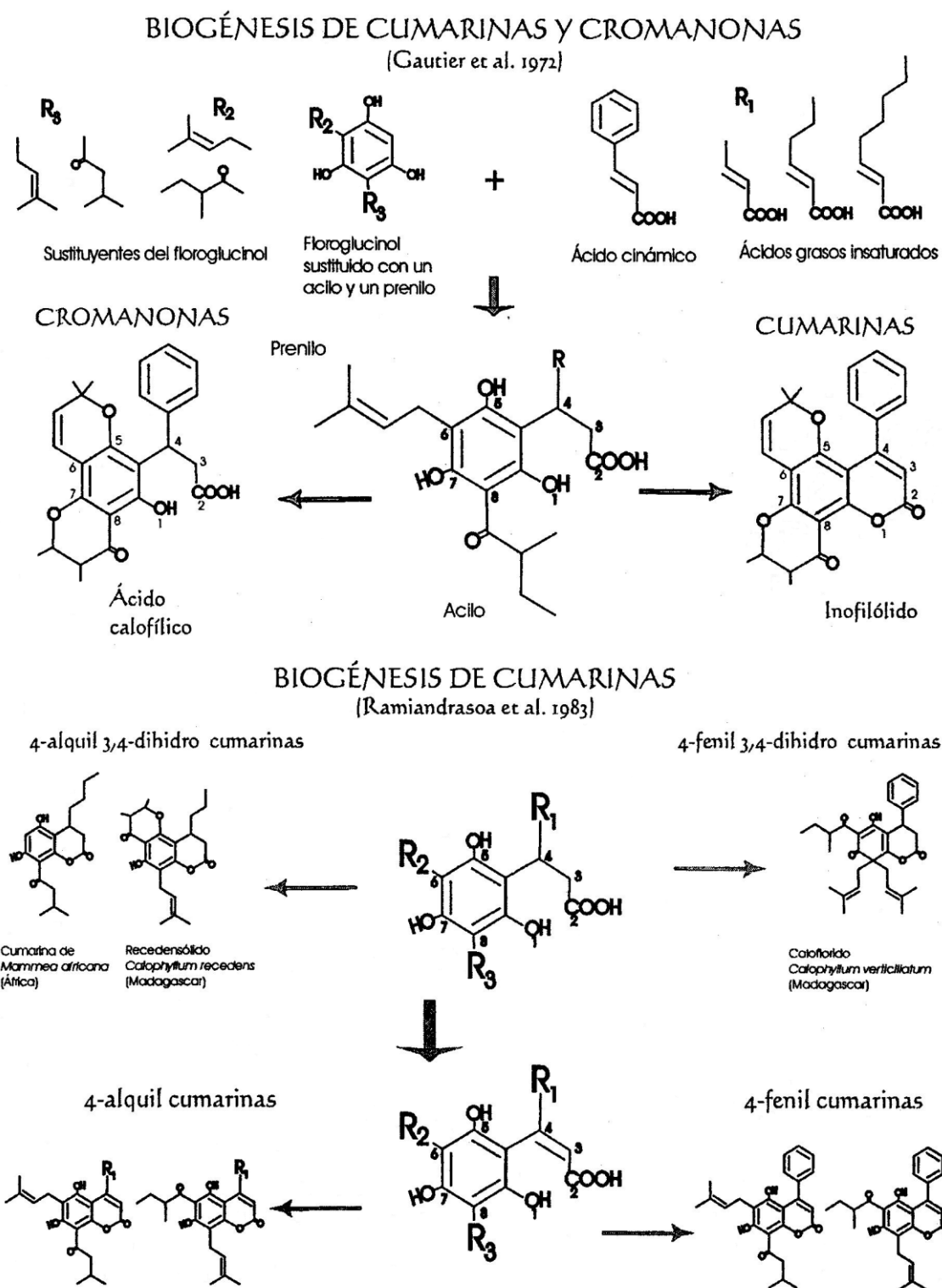
Además de los compuestos mencionados, se cuantificó mediante CLAR-EM, el contenido de las coumarinas tetracíclicas, (+)-inofilum P y su derivado 12-metoxi-(+)-inofilum P, (+)-inofilum C y E, (+)-calanólido D, la coumarina tricíclica GUT-70 y su isómero estructural, así como la mezcla de calanólidos A, B y C, y el derivado 12-metoxi(-)-calanólido B en el extracto de hexano de la colecta Soconusco. A continuación se enlistan los distintos compuestos presentes en el extracto en orden de abundancia, (+)-inofilum P > 12-metoxi(-)-calanólido B > isómero de GUT-70 > mezcla de calanólidos A, B y C > 12-metoxi-(+)-inofilum P > GUT-70 > (+)-calanólido D e isómeros > (+)-inofilum C y E e isómeros. Sin embargo, hasta ahora solamente el contenido de la coumarina (-)-mammea A/BB había sido cuantificado por CLAR-UV en extractos de hojas, tallos y frutos de *C. brasiliense* en poblaciones de Brasil (Brenzan *et al.*, 2010). En la siguiente tabla se resume la composición química de las poblaciones de *C. brasiliense* colectados en México.

Tabla 12. Compuestos aislados de los extractos de hexano de hojas de *Calophyllum brasiliense* colectados en México.

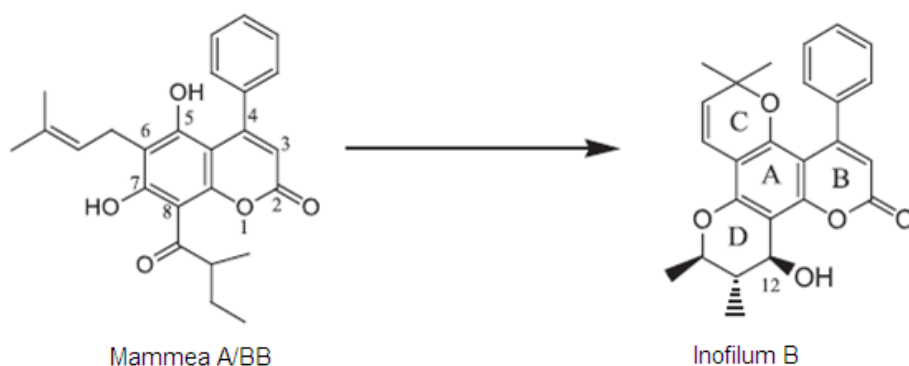
Compuesto	QTP1	QTP2	Soconusco	Selva
friedelina	✓	✓	✓	
canofilol	✓	✓	✓	
ácido apetalico		✓	✓	✓
(+)-calanólido A		✓	✓	
(-)-calanólido B		✓	✓	
(+)-calanólido C		✓	✓	✓
(±)-calanólido D			✓	
12-metoxi(-)-calanólido B			✓	
soulatrólido		✓		
(+)-inofilum P			✓	
inofilum C/E			✓	
12-metoxi-(+)-inofilum P			✓	
GUT-70			✓	
mammeas	✓			

La variabilidad química observada en los extractos de hexano de las hojas de poblaciones de *C. brasiliense* de México, sugiere que la biosíntesis de estos compuestos estaría sujeta a factores externos, tales como, época de colecta de la planta, nutrición, edad, entre otros. En este sentido, Castillo-Arellano (2009) encontró que cambios en el contenido nutricional originaron tres grupos químicos dentro de la población del QTP2, los que biosintetizan únicamente ácido apetalico o calanólidos y aquellos que contenían ambos compuestos; sin embargo, el factor nutricional no influía en la existencia de quimiotipos en las poblaciones de esta especie, además el contenido de estos compuestos entre plantas adultas y jóvenes no presentó diferencias. La estación del año de colecta tampoco parece estar asociada a la presencia de quimiotipos hasta ahora descritos, ya que estas se han realizado durante los meses de septiembre-diciembre. Por otro lado, para comprender la existencia de los quimiotipos en *C. brasiliense* es interesante observar las relaciones estructurales entre dipiranocoumarinas, cromanonas y mammeas, por la cual algunos autores han sugerido que la secuencia biogénica de estos compuestos está relacionada, dando lugar a la existencia de los quimiotipos. Gautier *et al.*, (1972) y Ramiandrasoa *et al.*, (1983) sugieren que la biosíntesis se inicia cuando una molécula de floriglucinol sustituido con un prenilo y un acilo se une a una molécula de ácido cinámico (para formar 4-fenil) o un ácido graso insaturado (formación de 4-alkil). Una vez formada la molécula precursora, esta puede dar lugar a la biosíntesis de una coumarina o cromanona.

En la formación de la dipiranocoumarina es necesario una deshidrogenación para producir un doble enlace entre los carbonos C3 y C4; así como una lactonización por la unión del COOH y el OH contiguo, para crear el anillo de lactona; por el contrario, para que se forme la cromanona, es indispensable que no se genere el anillo de lactona, ni el doble enlace entre los carbonos C3 y C4. Además, es absolutamente necesario que se ciclice tanto la cada de acilo como de prenilo para la formación de ambas moléculas; si estos sustituyentes permanecen como cadena abierta se originan coumarinas tipo mammea (esquema 1). Reyes-Chilpa *et al.*, (2004) sugieren que mammea A/BB, o una molécula relacionada con un sustituyente 2-metilbut-2-enoil en el carbono C8, podría ser un precursor de inofilum B (esquema 2). El anillo C y D pueden formarse por ciclización del OH en el carbono C5 con la cadena prenilo en C6, y el OH en el carbono C7 con el sustituyente acilo en el carbono C8, seguido por reducción del carbonilo en C12. Sin embargo, estudios de genética y biogénesis son necesarios con la finalidad de ofrecer información que contribuya a determinar la situación de esta especie en México. Además, estudios para determinar el perfil químico de los extractos vegetales con actividad anti-VIH y cuantificación de dipiranocoumarinas, empleando CLAR-UV-EM son importantes para estandarizar y desarrollar un fitofármaco (Singh y Bodiwala, 2010). En este sentido, las diferencias en el contenido y tipo de dipiranocoumarinas resultan de importancia debido a que permite identificar quimiotipos ricos en estos compuestos, los cuales pueden ser usados como fuente vegetal de fitofármacos anti-TR VIH-1.



Esquema 1. Biogénesis de coumarinas y cromanonas (Ramiandrasoa *et al.*, 1983 y Gautier *et al.*, 1972; Sustaita-Aranda, 2006).



Esquema 2. Mammea A/BB como precursor hipotético de Inofilum B (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004)

Respecto a la actividad anti-TR VIH-1 de los extractos vegetales, algunos autores han puntualizado que con $CI_{50} \leq 50 \mu\text{g/ml}$ pueden ser considerados como potentes inhibidores (Tan *et al.*, 1991; Min *et al.*, 2001). Por lo tanto, los extractos de hexano y acetona del Soconusco, así como el extracto de hexano de la Selva, pueden ser considerados dentro de esta categoría. El valor CI_{50} anti-TR VIH-1 encontrado para el extracto de hexano de la colecta Soconusco es similar al reportado por Huerta-Reyes *et al.* (2004) para esta especie (QTP2, $CI_{50} = 29.6 \mu\text{g/ml}$). Por otro lado, es conocido que los extractos polares (acetona y metanol) pueden contener taninos y otros polifenoles capaces de inhibir la transcriptasa reversa (Tan *et al.*, 1991), ADN topoisomerasa I y II (Kashiwada *et al.*, 1993), y el acoplamiento de la proteína gp120 de VIH con el receptor CD4 de células T (Collins *et al.*, 1997). Por lo que, debido a la alta afinidad que muestran los taninos por proteínas celulares afectando las reacciones bioquímicas, son considerados como inhibidores inespecíficos (Au *et al.*, 2001). Aunque los compuestos

metoxilados aislados 12-metoxi-(+)-inofilum P y 12-metoxi(-)-calanólido B, así como de la coumarina tricíclica GUT-70, no presentaron potente actividad vs transcriptasa reversa de VIH-1, se ha reportado que las dipiranocoumarinas, inofilums (Patil *et al.*, 1993) y calanólidos (Kashman *et al.*, 1992) presentan potente actividad anti TR VIH-1, y ya han sido anteriormente determinadas sus CI_{50} , siendo para inofilum B > P > C > D > A > E (Patil *et al.*, 1993), y para calanólido A > B > C. Sin embargo, de acuerdo a las relaciones de estructura-actividad propuestas para las dipiranocoumarinas de *Calophyllum*, las propiedades inhibitorias de estos compuestos ha sido descrito que radican en el anillo D (10,11-dimetilcroman-12-ol) (Kashman *et al.*, 1992; Patil *et al.*, 1993; McKee *et al.*, 1996, Ishikawa *et al.*, 1997). Al respecto, la actividad inhibitoria (anti TR VIH-1) más alta ha sido observada en el (+)-calanólido A que presenta una configuración *trans* entre los grupos metilo en C10 y C11, mientras que las otras configuraciones presentan una reducción en potencia. Una función oxigenada o hidroxilo en C12 (Galiniš *et al.*, 1996), así como los sustituyentes en C4 son también relevantes para la actividad inhibitoria contra la transcriptasa reversa de VIH-1. En este último caso, la potencia de la actividad anti TR VIH-1 sigue la serie propilo > fenilo > metilo (Ishikawa, 2000).

Por otro lado, se sabe que los derivados metoxilados 12-metoxi-(+)-calanólido A y 12-metoxi-(+)-calanólido B no presentan actividad anti TR VIH-1 (Kashman *et al.*, 1992) lo que concuerda con los datos aquí obtenidos para los compuestos 12-

metoxilados. Por lo tanto, la actividad anti TR VIH-1 *in vitro* del extracto de hexano de la colecta Soconusco mostrada aquí, se debe a la contribución de principalmente de compuestos como (+)-inofilum P, y la mezcla de (+)-calanólido A, (-)-calanólido B y (+)-calanólido C. Min *et al.* (2001) han sugerido que un perfil de citotoxicidad por arriba de 200 µg/ml es aceptable para la viabilidad celular (CC₅₀), en consecuencia la resolución en este valor fue baja para los extractos de hexano y acetona (Soconusco) y hexano (Selva). Sin embargo, aun cuando estos valores de viabilidad celular son bajos, resultan contrastantes con los bajos niveles de toxicidad obtenidos *in vivo* tanto para los ensayos con el crustáceo *Artemia salina* (CC₅₀ >1000 µg/ml), el cual se considera inactivo para un extracto vegetal (Anderson *et al.*, 1991), como con los ratones (DL₅₀= 1.99 g/kg), el cual resultado “ligeraamente tóxico” (Hodge y Sterner, 1943); incluso de acuerdo a Clarke y Clarke (1977) sustancias con DL₅₀ de 1000 mg/kg (oral) son considerados como seguras; por lo tanto, la DL₅₀ obtenida aquí es una indicación de que el extracto podría ser administrado con un buen grado de seguridad (Dennis, 1984).

El perfil neurofarmacológico mostró una fuerte reducción en la actividad motora y coordinación a la dosis más alta (5.62 g/kg) del extracto de hexano de la colecta Soconusco, lo cual ha sido previamente descrito en animales tratados con diazepam, 5 mg/kg (Sadraei *et al.*, 2006), lo que refleja que el extracto posiblemente tiene un efecto depresor del sistema nervioso central, caracterizado principalmente por falta de respuesta (movimiento) del animal al estímulo aplicado,

disminuyendo con el tiempo (Moscardo *et al.*, 2007); en consecuencia, los efectos disminuyeron ligeramente a dosis más bajas y en el tiempo, incluso no se detectaron cambios. Por otro lado, los valores de viabilidad celular obtenidos por Huerta-Reyes *et al.* (2004) para el QTP2 (CC_{50} = 92.5 μ g/ml) aunque también resultan estar por debajo del nivel establecido (200 μ g/ml), son mayores al obtenido para el extracto de hexano del Soconusco (CC_{50} = 32.36 μ g/ml). Así mismo, se encontró un alto nivel de inhibición (>80 %) del extracto del Soconusco sobre las cinco líneas celulares de carcinoma humano probadas en este estudio. En ese sentido, la coumarina tricíclica, GUT-70, ha sido descrita como un potente inhibidor de células de leucemia humana HL-60 (IC_{50} = 35.4 μ M) (Ito *et al.*, 2006). El mecanismo es través de la apoptosis mediada por caspasas e independiente de p53; además no inhibe la formación de colonias de progenitores hematopoyéticas, ni la proliferación de hepatocitos normales humanos (Kimura *et al.*, 2005, Jin *et al.*, 2011). También se ha reportado que el ácido apetalico inhibe la proliferación de tumores humanos de tipo epidermoide oral, KB (DE_{50} = 13.64 μ g/ml) y epiteloide cervical, HeLa (DE_{50} = 17.73 μ g/ml) (Ya-Ching *et al.*, 2004). La friedelina, también, se ha reportado como inhibidor del crecimiento de la línea celular de cáncer de próstata, PC3 (61.9 %) (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004). Adicionalmente, los ácidos cromon-4-ona presentan similitudes en la estructura química con el bien conocido inhibidor de la cadena respiratoria, rotenona (Hay *et al.*, 2003; Ernster *et al.*, 1963), y debido a que el ácido apetalico que contiene el extracto de hexano de *C. brasiliense*, pertenece a este grupo de compuestos, es posible que el efecto

citotóxico observado sobre linfocitos sea causado principalmente por este compuesto. Además, dado que la administración i.p. en ratones resultó no tóxica, es posible que al igual que la rotenona, los compuestos cromano-4-ona, como el ácido apetalico, sean rápidamente degradado por el hígado, (Robertson y Smith-Vain, 2008), lo cual parece reflejarse en este trabajo, sin embargo se requiere confirmarlo con un estudio a fondo.

Como parte de los estudios preclínicos, se analizó el efecto del extracto de hexano del Soconusco sobre los órganos de los ratones tratados a la más alta dosis (5.62 g/kg i.p.). No se observaron diferencias en el peso y morfología de los órganos de los ratones; a excepción de la aparición de petequias en los pulmones. En consecuencia, el estudio histopatológico reveló que no hay alteración en el tejido hepático, pero si fue observado un proceso regenerativo caracterizado por el incremento en el número de hepatocitos binucleados. Tampoco se observó daño en tejido linfoide de bazo, por el contrario fue observado un incremento en el número de megacariocitos en sincicio o en proceso de cariocinesis, sugiriendo que el extracto tiene un efecto inmuno-estimulante. Al respecto, se ha reportado que el extracto de metanol de las raíces de *C. brasiliense* induce crecimiento de células del bazo de ratones *in vitro* (Zadonai *et al.*, 2010). De forma similar, se ha descrito que este extracto presentó actividad inmuno-estimuladora sobre células mononucleares de sangre periférica humana de una manera dosis-dependiente en concentraciones de 10-200 µg/ml (Phillipi *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, se observó que el extracto metanólico de la colecta Soconusco no inhibió la proliferación celular de linfocitos humanos, incluso en concentraciones de 400 µg/ml. Por otra parte, las petequias observadas macroscópicamente en pulmones, están relacionadas con la congestión de los vasos sanguíneos y la ruptura alveolar, revelada por el análisis histopatológico, sugiriendo que los ratones sufrieron dificultad para respirar *pre-mortem*, y esta fue la causa de muerte. El efecto vasodilatador observado con la administración del extracto probablemente está relacionado con la congestión vascular.

9. CONCLUSIONES

En el extracto de hexano de las hojas de *C. brasiliense* del Soconusco (Chiapas) se identificó un precursor de triterpenos, el escualeno, y dos triterpenos, friedelina y canofilol, una cromanona, ácido apetalico, las dipiranocoumarinas tetracíclicas, calanólidos A, B, C, D, el derivado 12-metoxi(-)-calanólido B y los inofilums P, C, E, y el derivado 12-metoxi(+)-Inofilum P, así como una coumarina tricíclica, denominada trivialmente como GUT-70 y un isómero de ella. Esta es la primera vez que se identifican inofilums P, C y E, calanólido D, los derivados 12-metoxilados y GUT-70 e isómero en hojas de *C. brasiliense* en poblaciones de México. Por otro lado, aunque es necesario continuar con los estudios preclínicos, se encontró que el extracto de las hojas tiene actividad anti-TR similar al observado en el QTP2 e inhibe la proliferación de células cancerígenas. Los calanólidos e inofilums son los responsables de la inhibición de la enzima TR VIH-1, mientras que GUT-70 y ácido apetalico serian los principales responsables de la actividad observada contra las células cancerígenas. Además, este extracto resultó relativamente no tóxico *in vivo* (ratones); tampoco causó daño hepático, y aparentemente ejerce efecto inmuno-estimulante sobre órgano linfoide (bazo). Adicionalmente, con la administración del extracto hexánico en los ratones se observó efecto vasodilatador, lo que indicaría actividad sobre el sistema cardiovascular. También se observó efecto depresor sobre el sistema nervioso central. Con base en lo anterior, se puede concluir que el extracto de hexano de las hojas de *C. brasiliense* de la colecta Soconusco, Chiapas (México), esta

químicamente relacionado con el QPT2, pero presenta variaciones en el tipo y contenido de dipiranocoumarinas que biosintetiza. Además, los estudios preclínicos sugieren continuar con el estudio del extracto que lleve al desarrollo de un extracto estandarizado (fitofármaco). En este sentido, como sugiere Singh y Bodiwala (2010), es importante enfatizar en el desarrollo de una terapia alternativa usando plantas medicinales (extractos) con actividad anti-VIH. Los extractos de plantas con actividad anti-VIH podrían ser estandarizados usando técnicas tales como CLAR-UV-EM para determinar el perfil químico y así el fitofármaco pueda ser usado como un medicamento alternativo para el tratamiento del VIH/SIDA.

10. REFERENCIAS

Abe F, Shinya N, Hikaru O, Hiroshige A, Estrada-Muñiz E, Huerta-Reyes M, Reyes-Chilpa R, 2004. Trypanocidal Constituents in Plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biol. Pharm. Bull.* 27:141-143.

Anderson JE, 1991. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. 2: 107-111.

Au TK, Lam TL, Ng TB, Fong WP, Wan DCC, 2001. A comparison of HIV-1 integrase inhibition by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbal. *Life Sci* 68:1687-1694.

Bandara BMR, Ranjith H, Dharmaratne W, Sotheeswaran S, Balasubramaniam S, 1986. Two chemically distinct groups of *Calophyllum* species from Sri Lanka. *Phytochem.* 25:425-428.

Bernabé-Antonio A, Estrada-Zúñiga ME, Buendía-González L, Reyes-Chilpa R, Chávez-Ávila VM, Cruz-Sosa F, 2010. Production of anti-HIV-1 calanolides in callus culture of *Calophyllum brasiliense* (Cambes). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 103: 33-40.

Betancourt AB, 1987. *Silvicultura Especial de Árboles Maderables Tropicales*. Habana, Cuba. Editorial Científico Técnica. Pp 427.

Bisse J, 1981. *Árboles de Cuba*. Ed. Científico-Técnica. La Habana. Pp 384.

Brenzan MA, Nakamura CV, Prado Dias Philo B, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Garcia-Cortez DA, 2007. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leshmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 101: 715-722.

Brenzan MA, Piloto-Ferreira IC, Campana-Lonardon MV, Honda PA, Filho ER, Nakamura CV, Dias-Filho BP, Ueda-Nakamura T, Garcia-Cortez DA, 2008. Activity of Extracts and Coumarins from the Leaves of *Calophyllum brasiliense* on *Leishmania braziliensis*. *Pharmaceutical Biology*. 46(6):380-386.

Brenzan MA, Nakamura CV, Filho BPD, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Mitsui ML, Cortez DAG, 2010. Quantitative and qualitative análisis of (-)-mammea A/BB coumarin in extracts of *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae) by HPLC, *J. Liq. Chrom. Rel. Tech.* 33 283-295.

Buffon-Isaias DE, 2005. Isolamento e Identificação de principios ativos de *Calophyllum brasiliense* Camb. (*Clusiaceae*). Mestre em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Itajaí. Pp 83.

Butler MS, 2005. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 22: 162-195.

Buttler MS, 2008. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 25: 475-516.

Caballero-García C, 2004. Efectos de terpenoides naturales y hemisintéticos sobre "*Leptinotarsa decemlineata* (Say) *Coleoptera: Chrysomelidae*) y *Spodoptera exigua* (Hübner) (*Lepidoptera: Nocturnae*). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, España. Pp 107.

Castillo-Arellano JI, 2009. Efecto de los nutrientes sobre el crecimiento de plántulas de *Calophyllum brasiliense* y la biosíntesis de metabolitos secundarios de interés farmacológico. Tesis Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México, DF. Pp 1-99.

Clarke EGC and **Clarke** ML, 1977. *Veterinary Toxicology*. Cassel and Collier MacMillan Publisher, London. Pp. 268-277.

Cechinel-Filho V, Meyre-Silva C and Niero R, 2009. Chemical and Pharmacological Aspects of the Genus *Calophyllum*. Chemistry and Biodiversity. 6:313-327.

Cert A, Lanzón A, Carelli A, Albi T, Amelotti G, 1994. Formation of stigmas – 3-, 5-diene in vegetable oils. Food Chemistry. 49, , 287-293.

Charles, F. Laure, P. Raharivelomanana, J.P. Bianchini, 2004. Sheath liquid interface for the coupling of normal-phase liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and its application to the analysis of neoflavonoids, J. Mass Espectrom. 40: 75-82.

Chudnoff M, 1984. Tropical Timbers of the World. USDA Forest Service. Ag. Handbook No.607.

Cos P, Maes L, Vanden Berghe D, Hermans N, Pieters, Vlietinck L. 2004. Plant substances as anti-HIV agents selected according to their putative mechanism of action. J. Nat. Prod. 67: 284-293.

Collins RA, Ng TB, Fong WP, Wan CC, Yeung HW, 1997. A comparison of human immunodeficiency virus type 1 inhibition by partially purified aqueous extracts of Chinese medicinal herbs. Life Sci 60:345-351.

CONASIDA/CENSIDA, 2011. disponible en: www.conasida.gob

Cottiglia F, Dhanapal B, Sticher O, Heilmann J, 2004. New Chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. Jour. Nat. Prod. 67:537-541.

Creagh T, Ruckle JL, Tolbert DT, Gilbner J, Eiznhamer DA, Dutta B, Flavin MT, Xu ZQ, 2001. Safety and Pharmacokinetics of Single Doses of (+)-Calanolide A, a Novel Naturally Occuring Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, In Healthy, Human Immunodeficiency Virus-Negative Human Subjects. Antimicrob.

Agents Chemother. 45:1379-1386.

Dalgleish AG, Beverly PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves M F, Weiss RA, 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature, 312:763-767.

Da Silva KI, Dos Santos AR, Manttos PE, Yunes RA, Delle-Monache F, Cechinel-Filho V, 2001. Chemical Composition and Analgesic Activity of *Calophyllum brasiliense* Leaves. Therapie. 56(4):431-434.

De Clercq E, 2000. Reverse transcriptase inhibitors as anti-HIV Drugs. En: Unger RE, Kreuter J, Rübsamen-Waigmann H, eds. Antivirals Against AIDS. NY: Marcel Dekker, Inc, 107-150.

Dharmaratne HRW, Wanigasekera WMA, Mata-Greenwood E, Pezzuto JM, 1998. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase activity by cordatolides isolated from *Calophyllum cordatooblongum*. Planta Med 64:460-461.

DennisVP, 1984. Mammalian metabolism of xenobiotic chemicals. En: Kacew S, Reasor MJ (Eds.). Toxicology and Newborn, Pp 1-3.

Do Souza AM, 2006. Estrutura Genética de Populações Naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb. Na Bacia do Alto Rio Grande. Tese Doutorado. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, Brasil. 154pp.

Echenique-Manrique R, 1970. Descripción, Características y Usos de 25 Maderas Tropicales Mexicanas. México. Cámara Nacional de la Industria de la Construcción.

Eiznhamer DA, Creag T, Ruckle JL, Tolbert DT, Giltner J, Dutta B, Flavin MT, Jenta T and Xu ZQ, 2002. Safety and Pharmacokinetic Profile of Multiple Escalating Doses of (+)-Calanolide A, a Naturally Occurring NonNucleoside Reverse

Transcriptase Inhibitor, in Healthy HIV-negative Volunteers. HIV Clin. Trials. 3:435-450.

Emendörfen F, Emendörfen F, Bellato F, Noldin VF, Niero R, Cechinel-Filho V, Maia CA, 2005. Evaluation of the Relaxant Action of Some Brazilian Medicinal Plants in Isolated Guinea-Pig Ileum and Rat Duodenum. Jour. Pharm. Pharmaceut. Sci. 8:63-68.

Ernstern L, Dallner G, Azzone GF, 1963. Differential effects of Rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer. J. Biol. Chem. 238: 1124-1131.

Estrada-Muñiz E, 2001. Cumarinas y Xantonas de *Calophyllum brasiliense*: Evaluación de su Actividad Antiviral, Citotóxica y Antibacteriana. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 65pp.

Evans LA y Levy JA, 1993. The heterogeneity and pathogenicity of HIV. En: Morrow WJW, Haigwood NL, eds. HIV. Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment. The Netherlands: Elsevier, 29-74.

Fauci AS, 1996. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. Nature, 384: 529-533.

Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM, 2000. Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. ASM. Washington, EEUU. 804 pp.

Flores W, Fuentes R, Galindo D, González F, Hernández G, Hernández K, Hidalgo I, Zamudio del Carpio D, Castañeda B, Ibañez L y Larrea H, 2008. Evaluación de los Efectos Antioxidante, Antibacteriano y Antifúngico de *Calophyllum brasiliense* Cambess (Lagarto Caspi). Rev. Horizonte Med. 8(2):7-16.

Fonseca MA. 2008. Quimiotipos de *Calophyllum brasiliense*: Distribución Geográfica en México y Evaluación de la Actividad Hipoglucemiante del Ácido Apetálico. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Freed EO y **Martin** MA, 2001. HIVs and Their Replication. En: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. 4ta. Ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins, 1971-2041.

Galinis DL, Fuller RW, McKee TC, Cardellina JHII, Gulankowski RJ, McMahon JB, Boyd MR, 1996. Structure-Activity modifications of the HIV-1 inhibitors (+)-Calanolide A and (-)-Calanolide

García-Barriga H, 1992. Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica. Vol.2, 2ª. Edición. Tercer Mundo Editores. Bogota, Colombia. Pp 537.

Gasparotto Jr A, Brenzan MA, Piloto IC, Nakamura CV, Prado-Dias Filho B, Rodrigues-Filho E, Ferreira AG, 2005. Phytochemical Study and Evaluation of the Molluscicidal Activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. (*Clusiaceae*). Quim. Nova. 28(4):575-578.

Gautier J, Cave A, Kunesch G and Polonsky J, 1972. On the Biosynthesis of Neoflavonoids. Specialia. 759-761.

Geleziunas R y **Greene** WC, 2000. Molecular insights into HIV-1 infection and patogenezis. En: The medical management of AIDS. (eds. M. A. Sande y P. A. Volderbing). USA: W.B. Saunders Company.

Goff SP, 2001. Retroviridae: the Retroviruses and their replication. En: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. 4ta. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1987-1939.

González-Paredes M, 1999. Aislamiento e Identificación de Metabolitos

Secundarios de los Frutos de *Calophyllum brasiliense*. Tesis de Licenciatura en Biología Experimental. UAM-1. México, D.F. Pags. 3-24.

González-Paredes M, 2006. Estudio Etnobotánico de *Calophyllum brasiliense* Cambess (Guttiferae): Anatomía de Fruto, Fitoquímica y Evaluación de la Actividad Antiviral de Hojas y Frutos. Tesis de Maestría en Horticultura. Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo. México, D.F.129pp.

Guide for the care and use of laboratory animals, 2011. National Academy of Sciences. 8a. Ed. Printed in USA. Pp 220.

Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB, 1986. The Lipid Handbook. Dictionary Section, Ed. Chapman and Hall. London and New York. ISBN0412244802 Pag. 223 224.

Hay AE, Guilet D, Morel C, Larcher G, Macherel D, Le Ray AM, Litaudon M, Richomme P, 2003. Antifungal chromans inhibiting the mitochondrial respiratory chain of pea seeds and new xanthones from *Calophyllum caledonicum*. Planta Med 69:1130-1135.

Herrera J, Lines K y Vázquez W, 2008. Estudio de la Germinación y la Conservación de Semillas de Cedro Maria (*Calophyllum brasiliense*). Tecnología en Marcha. 19:61-72. Disponible en: www.revista_19-1_pag_61-72.pdf (2008).

Hodge HC y **Sterner JH**. 1943. Determination of substances acute toxicity by LD50. Am Ind Hyg Assoc 10: 93.

Hu WS y **Temin HM**, 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. Science, 250:1227-1233.

Huang TB, Fong WP, Yeung HW, 1997. Anti-human immunodeficiency virus (Anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase

inhibitors. Life Sci. 61:933-949

Hupfeld J y Efferth T, 2009. Drug resistance of human immunodeficiency virus and overcoming it by natural products. In vivo 23: 1-6.

Huerta-Reyes M, Basualdo M, Lozada L, Jimenez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R. 2004a. HIV-1 Inhibition by Extracts of Clusiaceae Species from Mexico. Biol. Pharm. Bull. 27(6): 916-920.

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

Huerta-Reyes M. 2004c. Evaluación de la Actividad Inhibitoria de Metabolitos Secundarios de *Clusiaceae* Mexicanas sobre el VIH-1. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Instituto de Ciencias Biomédicas. UNAM. México, D.F.

INFOSIDA, 2011. disponible en: www.infosida.com

Ishikawa T, Oku Y, Kotake K, 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: 14915-14928.

Ishikawa T, 2000. Anti HIV-1 active *Calophyllum* coumarins: distribution, chemistry, and activity. Heterocycles 53: 453-473.

Isaias DEB, Niero R, Noldin VF, de Campos-Buzzi F, Yunes RA, Delle-Monache F, Cechinel-Filho V, 2004. Pharmacological and Phytochemical Investigations of Different Parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). Die Pharmazie 59(11):879-881.

Ito C, Itoigawa M, Mishina Y, Cechinel V, Mukainaka T, Tozuda H, Nishino H. 2002. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliensis*: Structure elucidation of seven

new xantones and their cancer chemopreventive activity. J. Nat. Prod. 65: 267-272.

Ito C, Itoigawa M, Mishina Y, Cechinel V, Enjo F, Tozuda H, Nishino H, Furukawa H, 2003. Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliense*: Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. Jour. Nat. Prod. 66:368-371.

Ito C, Murata T, Itoigawa M, Nakao K, Kaneda N, Furukawa H, 2006. Apoptosis inducing activity of 4-substituted coumarins from *Calophyllum brasiliense* in human leukaemia HL-60 cells. J Pharmacy and Pharmacology. 58: 975-980.

Jin L, Tabe Y, Kimura S, Zhou Y, Kuroda J, Asou H, Inaba T, Konopleva M, Andreeff M, Miida T, 2011. Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. British J Cancer. 104: 91-100.

Joker D y Salazar R, 2000. *Calophyllum brasiliense* Cambess. Seed Leaflet. CATIE Nota Técnica No. 46.

Kashiwada Y, Nonaka G, Nishioka I, Lee KJ, Bori I, Fukushima Y, Bastow KF, Lee KH, 1993. Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II in vitro. J Pharm Sci 82:487-492.

Kashman Y, Gustafson KR, Fuller RW, Cardellina JH II, McMahon JB, Currens MJ, Buckheit RW Jr, Hughes SH, Cragg GM, Boyd MR, 1992. The Calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. J Med Chem, 35: 2735-2743.

Kearns DM, Berry PE, Stevens PF, Cuello NL, Pipoly JJ III, Robson NKB, Holst BK, 1998. Flora of the Venezuela Guayana Vol. 4 *Caesalpinaceae-Ericaceae* Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, Missouri, U.S.A. 799p.

Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Johnson M, Nowak M A, Shaw GM, Saag MS, 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41 mediated virus entry. *Nature Medicine*, 4:1302-1307.

Kimura S, Ito C, Jyoko N, Segawa H, Kuroda J, Okada M, Adachi S, Nakahata T, Yuasa T, Cechinel Filho V, Furukawa H, Maekawa T, 2005. *Int. J. Cancer*. 113: 158.

Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L, 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 312: 767-771.

Laurè F, Raharivelomanana P, Butaud JF, Bianchini JP, Gaydou EM, 2008. Screening of anti-HIV-1 inophyllums by HPLC–DAD of *Calophyllum inophyllum* leaf extracts from French Polynesia Islands. *Analyt Chim Act* 624: 147-153.

León-Camacho M, Álvarez-Serrano M, Graciani-Constante E, 2004. Formation of stigmastan-3,5-diene in olive oil during deodorization and/or physical refining using nitrogen as stripping gas. *Grasas y Aceites*. 55(3): 227-232.

Levy JA, 1998. *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. 2a. ed. Washington DC: ASM Press, Pp 588.

Levy SIT, Aguirre-Rivera JR, García-Pérez JD, Martínez-Romero MM, 2006. Aspectos florísticos de Lacanhá Chansayab, Selva Lacandona, Chiapas. *Acta Botánica Mexicana*, 77:69-98.

Lin YM, Anderson HM, Jenta TR, Williams MJ, Flavin MT, 1999. An efficient and scalable method for the isolation of costatolide, a naturally-occurring anti-HIV agent, from the latex of *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. *Pharm Biol* 37:71-76.

Luciw, PA, 1996. Human Immunodeficiency Viruses and their replication. En: Virology (eds. B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley). Vol. 2. USA: Lippincott-Raven Publishers.

Luciw PA y **Shacklett** BL, 1993. Molecular biology of the Human and Simian Immunodeficiency Viruses. En: Morrow WJW, Haigwood NL, eds. HIV. Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment. The Netherlands: Elsevier, 123-220.

Matthée G, Wroight AD, Köning GM, 1999. HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta Medica*, 65: 493-506.

McKee TC, Fuller RW, Covington CD, Cardellina JHII, Gulakowski RJ, Krepps BL, McMahon JB, Boyd MR, 1996. New pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*. *J. Nat. Prod.* 59: 754-758.

McKee TC, Covington CD, Fuller RW, Bockesch HR, Young S, Cardellina JH II, Kadushin MR, Soejarto DD, Stevenes PF, Cragg GM, Boyd MR, 1998. Pyranocoumarins from Tropical Species of Genus *Calophyllum*: A Chemotaxonomic Study of Extracts on the National Cancer Institute Collection. *Jour. Nat. Prod.* 61: 1252-1256.

McLaughlin JL, 1991. Bench-top bioassay for the discovery of bioactive natural products: and update. 9: 383-409.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL, 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45:31-34.

Min BS, Kim YH, Tomiyama M, Nakamura N, Miyashiro H, Otake T, Hattori M, 2001. Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities. *Phytother Res* 15: 481-486.

Moscardo E, Maurin A, Dorigatti R, Champeroux P, Richard S, 2007. An optimised methodology for the neurobehavioural assessment in rodents. *J Pharm Toxicol Methods* 56:239-255.

Mossman T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.

Noldin VF, Isaias DB, Cechinel-Filho V, 2006. Gênero *Calphyllum*: Importância Química e Farmacologica. *Quim. Nova.* 29(3):549-554.

NOM-059-SEMARNAT-2001. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Publicado en: Diario Oficial de la Federación: Sección Dos, 6 de Marzo de 2002.

NOM-62-ZOO-1999. Secretarías de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Publicado en: Diario Oficial de la Federación, 6 de Diciembre de 1999.

OFI-CATIE. Árboles de Centroamérica. Pags. 427-430. disponible en: www.calophyllum_brasiliense.pdf. (2008).

ONUSIDA/OMS, 2011. Situación de la Epidemia del SIDA 2010. Programa Conjunto de las Naciones Unidas y la Organización Mundial de la Salud. Pp 60.

Ortega-Escalón F, Castillo-Morales I, Carmona-Valdovinos T, 1991. Anatomía de la Madera de Veintiseis Especies de la Selva Lacandona, Chiapas. *Angiospermas Arbóreas de México No.3.* La Madera y su Uso 26. Instituto de Ecología A. C.&UAM, México, D.F. 200p.

Patil AD, Freyer AJ, Eggleston DS, Haltiwanger RC, Bean MF, Taylor PB, Caranfa MJ, Breen AL, Bartus HR, Johnson RK, Hertzberg RP, Westley JW, 1993. The Inophyllums, novel Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the

Malaysian Tree, *Calophyllum inophyllum* Linn, J. Med. Chem. 36: 4131-4138.

Pennington TD y **Sarukhan** J, 1968. Manual para la Identificación de Campo de los Principales Árboles Tropicales de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. México, D.F. 413pp.

Pereira MO, Gottlieb OR, Magalhaes MT, 1966. Constituintes Xantônicos do *Calophyllum brasiliense*. An. Acad. Bras. Cien. 38: 425-427.

Pereira MO, Gottlieb OR, Magalhaes MT. 1967. Novas Xantonas do *Calophyllum brasiliense*. An. Acad. Bras. Cien. 38: 425-427.

Phillipi ME, Duarte BM, Vieira CDS, DeSouza MT, Niero R, Cechinel-Filho V, Casagrande-Bueno E, 2010. Immunostimulatory activity of *Calophyllum brasiliense*, *Ipomoea pes-caprae* and *Matayba elaeagnoides* demonstrated by human peripheral blood mononuclear cells proliferation. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research (Natural Drugs). 67: 69-73.

Plattner RD, Spencer GF, Weisleder D, Kleiman R, 1974. Chromannone acids in *Calophyllum brasiliense* Seed Oil. Phytochemistry. 13:2597-2602.

Pretto JB, Cechinel-Filho V, Noldin VF, Sartori MRK, Isaias DEB and Bella-Cruz A, 2004. Antimicrobial Activity of Fractions and Compounds from *Calophyllum brasiliense* (*Clusiaceae/Guttiferae*). Zeitschrift für Naturforschung. 59c:657-662.

Pullen KA y **Champoux** JJ, 1990. Plus-strand origin for human immunodeficiency virus type 1: implications for integration. J Virol, 64:6274-6277.

Ramiandrasoa F, Kunesch N, Poisson J, 1983. Le calofloride, intermédiaire d'un type nouveau de la biogénese des Néoflavonoïdes. Tetrahedron, 39(23): 3923-3928.

Reyes-Chilpa R, Jiménez-Estrada M, Estrada-Muñiz E, 1997. Antifungal

Xanthones from *Calophyllum brasiliense* Heartwood. Jour. Chem. Ecol. 23(7):1901-1911.

Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz, E, Román B, Torres-Sosa C, Jiménez-Estrada M y Béjar E, 1999. In: International Conference on Ethnomedicine and Drug Discovery. Nov. 3-5. Silver Spring, Maryland. U.S.A.

Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Ramírez-Apan T, Amekraz B, Aumelas A, Jankowsky C, Vazquez-Torres M, 2004. Cytotoxic Effects of Mammea Type Coumarins from *Calophyllum brasiliense*. Life Sci. 75:1635-1647.

Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Vega-Avila E, Abe F, Kinjo J, Hernandez-Ortega, 2008. Trypanocidal Constituents in Plants . 7.Mammea-Type Coumarins. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 103(5):431-436.

Reyes-Chilpa R y Huerta-Reyes M, 2009. Compuestos Naturales de Plantas de la Familia *Clusiaceae*: Inhibidores del Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1. Interciencia. 34(6):1-8.

Robertson R y Smith-Vaniz WF, 2008. Rotenona: Una herramienta esencial pero difamada para la evaluación de la diversidad de los peces marinos. FORUM. BioScience. 58(2): 165-171. En: www.biosciencemag.org. [Febrero, 2008].

Rodríguez ME, Cardozo AE, Krauczuk ER, Fontana JL, Iriart D. 2009. *Calophyllum brasiliense* (*Clusiaceae*): Nuevo registro para la flora de la Argentina. Bol Soc. Argent. Bot. 44:361-366.

Sadraei H, Asghari G, Zeinodin M, 2006. Evaluation of systemic effect of *Pycnocycla spinosa* extract in mice using Irwin test. Research Pharmaceutical Sciences. 1: 22-29.

Saleem R, Ahmad M, Azmat A, Ahmad SI, Faizi Z, 2005. Hypotensive activity,

toxicology and histopathology of opuntoside-I and methanolic extract of *Opuntia dillenii*. Biol. Pharm. Bull. 28(10): 1844-1851.

Salgado-Mora MG, Ibarra-Nuñez G, Macías-Sámamo JE, López-Baez O, 2007. Diversidad arbórea en cacaotales del Soconusco, Chiapas, Mexico. Interciencia, 32:763-768.

Sartori NT, Canepelle D, De Souza P, Martins DTO, 1999. Gastroprotective Effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. Bark on Experimental Gastric Lesions in Rats and Mice. Jour. of Ethnopharmacol. 67(2):149-156.

Shetty Akhila J, Shyamjith D, Alwar MC, 2007. Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. Current Science. 93(7): 917-920.

Sierra S, Kupfer B, Kaiser R, 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. J.Clin. Virol. 34: 233-244.

Singh IP, Bharate S., Bhutani KK, 2005. Anti- HIV natural products. Curr. Sci. 89: 269-290.

Singh IP y **Bodiwala** HS, 2010. Recent Advances in anti-HIV natural products. Nat. Prod. Rep. 27: 1781-1800.

Singh DT, Kumar BC, Patidar A, Kumar P, Kumar P, Lal C, 2010. Anti-HIV agents: a step towards future. Int J Pharm Sci Rev and Res 3:10-18.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Visitica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR, 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J National Cancer Institute. 82(13): 1107-1112.

Splitter P, 1997. Descripción de Siete Especies Forestales Nativas del Bosque Húmedo Tropical en el Sur de Costa Rica. Eschborn, Alemania. Pp 77.

Stevens PF, 1980. A Revision of the Old World Species of *Calophyllum* (*Guttiferae*). Jour. of the Arnold Arboretum. 61(2): 117-171.

Soto-Núñez JC, 1995. Las Plantas Medicinales y Su Uso Tradicional en la Cuenca del Rio Balsas: Estado de Michoacán y Guerrero, México. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. Pp. 231

Stout GH, Krhan MM, Breck GG, 1968. *Calophyllum* Products II: Brasiliensie and Inophyllodie acids. Tetrahedron Lett. 29:3285-3290.

Sustaita-Aranda I, 2006. Contribución al conocimiento taxonómico del género *Calophyllum* (*Guttifereae*): Quimiotipos de *C. rekoii* Standl. y *C. brasiliense* Cambess. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. Pp. 56.

Tambou-Ngouamegne E, Soh-Fongang RS, Ngouela S, Fekam-Boyom F, Rohmer M, Tsamo E, Gut J, Jon-Rosenthal P, 2008. Endodesmiadiol, a friedelane triterpenoid, and other antiplasmodial compounds from *Endodesmia calophylloides*. Chem. Pharm. Bull. 56(3): 374-377.

Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD, 1991. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type1 (HIV-1) reverse transcriptase. J Nat Prod 54:143-154.

Teng WS, 1993. Bioactive Natural Products: Toxicity Testing Using the Brine Shrimp: *Artemia salina*. Pags 441-457.

Thirakul S, 1992. Manual de Dendrología del Bosque Latifoliado. La Ceiba, Honduras. ACDI/COHDEFOR. 461p.

Viqar Uddin Ahmad and **Atta-ur-Rahman**, 1994. Handbook of Natural Products Data: Pentacyclic Triterpenoids, Elsevier, Vol. 2, Pp 1556. Amsterdam, The

Netherlands.

Vlietinck AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA, 1998. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. *Planta Medica*, 64:97-109.

Ya-Ching S, Li-Tang W, Ashraf Taha K, Yao-Haur K, 2004. Chromanones and dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*, *Chem. Pharm. Bull.* 52 4002-4005.

Xiao-Hui S, Man-Li Z, Li-Geng L, Chang-Hong H, Yu-Cheng G and Qing-Wen S. 2008. Chemical Constituents of the Plants of the Genus *Calophyllum*. *Chemistry and Biodiversity*. 5:2579-2608.

Xu ZQ, Bukheit RW, Stup TL, Flavin MT, Khilevich A, Rizzo JD, Lin L, Zenbower DE, 1999. In vitro Anti-Human Immunodeficiency Virus (HIV) Activity of the Chromanone Derivate, 12-Oxocalnolide A, a Novel NNRTI. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 8:2179-2184.

Xu ZQ, Barrow WW, Suling WJ, Westbrook L, Barrow E, Lin YM, Flavin MT, 2004. Anti- HIV natural product (+)-calanolide A is active against both drug-susceptible and drugresistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 1199-1207.

Wei Chang-bin, Wu Hong-xia, Ma Wei-hong, WANG Song-biao, SUN Guang-ming, 2007. Studies on aroma compounds of "Jinhuang" mango at fully ripening stage of fruit. *Guangxi Agricultural Sciences*. [Abstract].

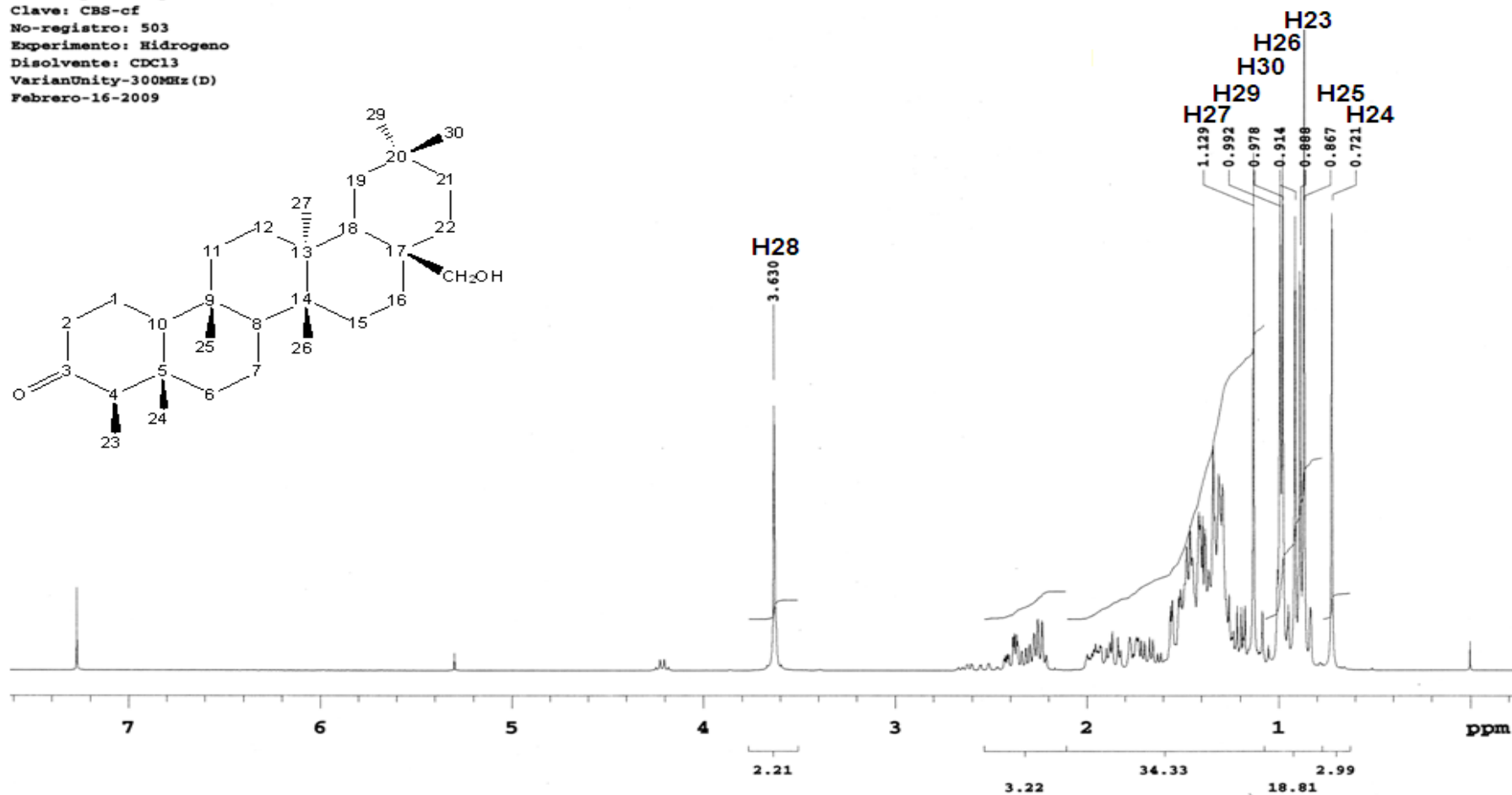
Weiss RA, 2000. Getting to know HIV. *Trop. Med. Int. Health.* 5: 10-15.

Zadonai RH, Coelho F, Ferreira J, Bittencourt AK, Weber M, Niero R, Cechinel V, Casagrande E, 2010. Evaluation of the proliferative activity of methanol extracts from six medicinal plants in murine spleen cells. *Braz J Pharm Sci* 46:323-333.

ANEXOS

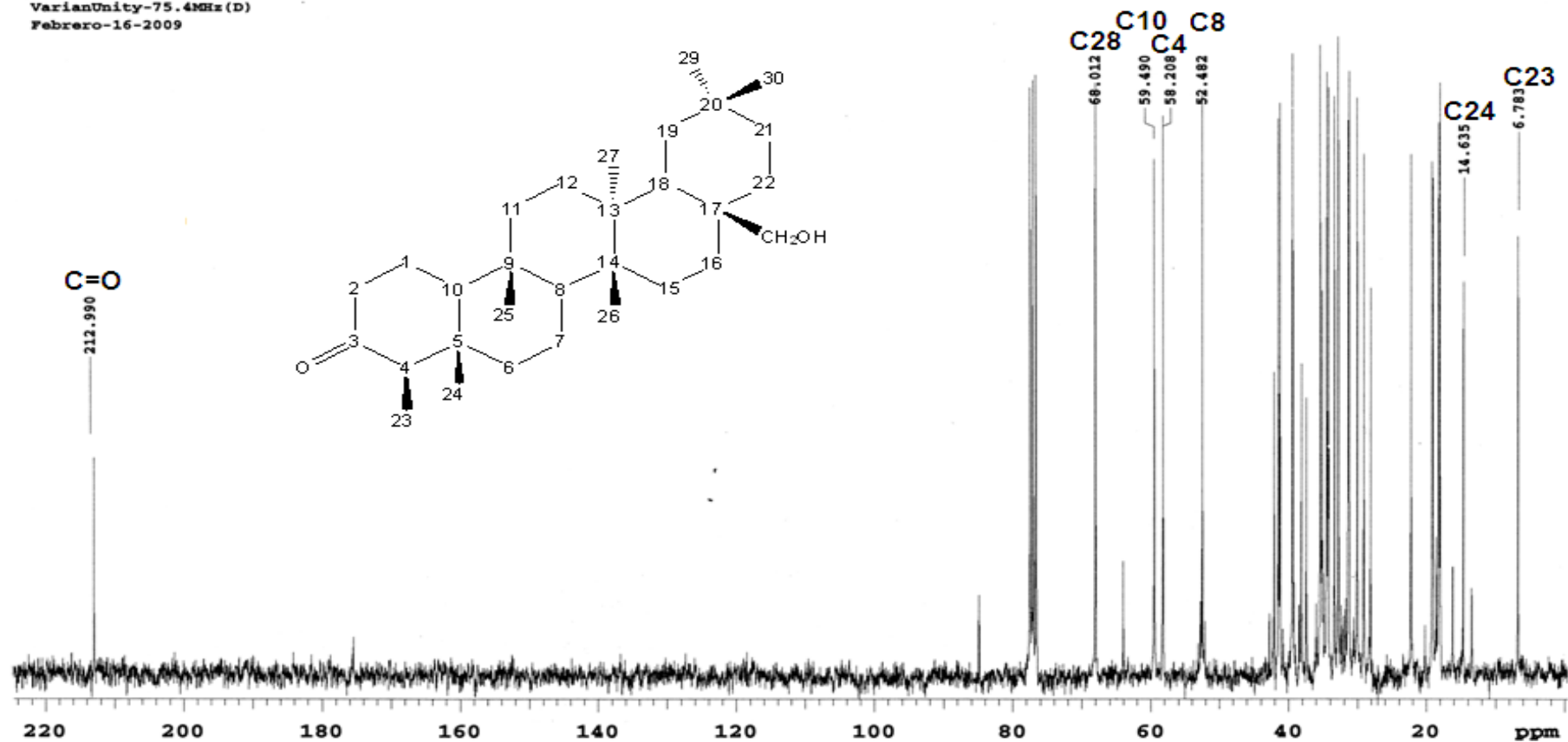
CANOFILOL

Instituto de Química. UNAM (H.Rios)
 Dr-R-Reyes-Chilpa/JC-García
 Clave: CBS-cf
 No-registro: 503
 Experimento: Hidrogeno
 Disolvente: CDCl₃
 VarianUnity-300MHz (D)
 Febrero-16-2009

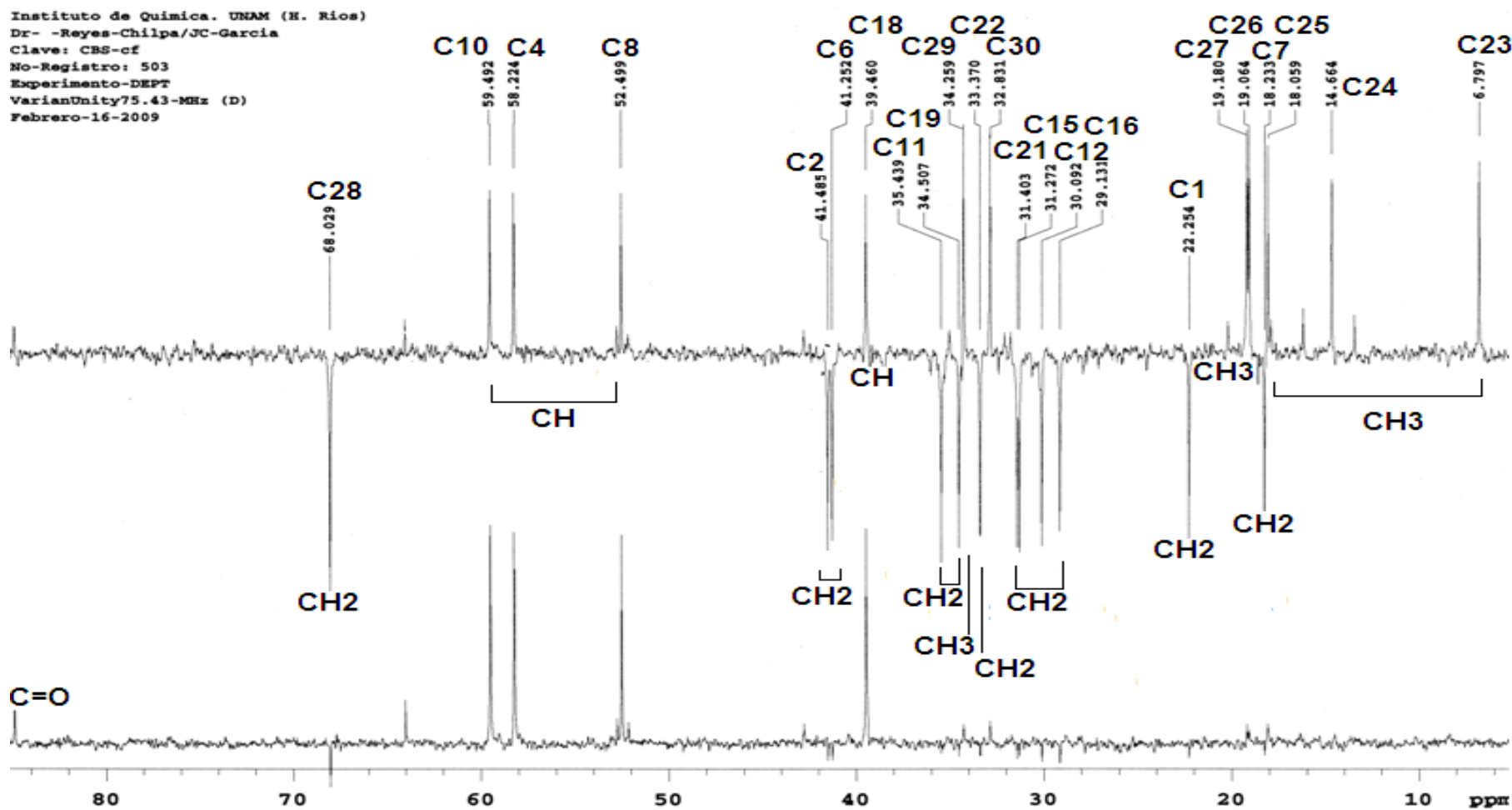


Espectro 1. Espectro de RMN ¹H del Canofilol.

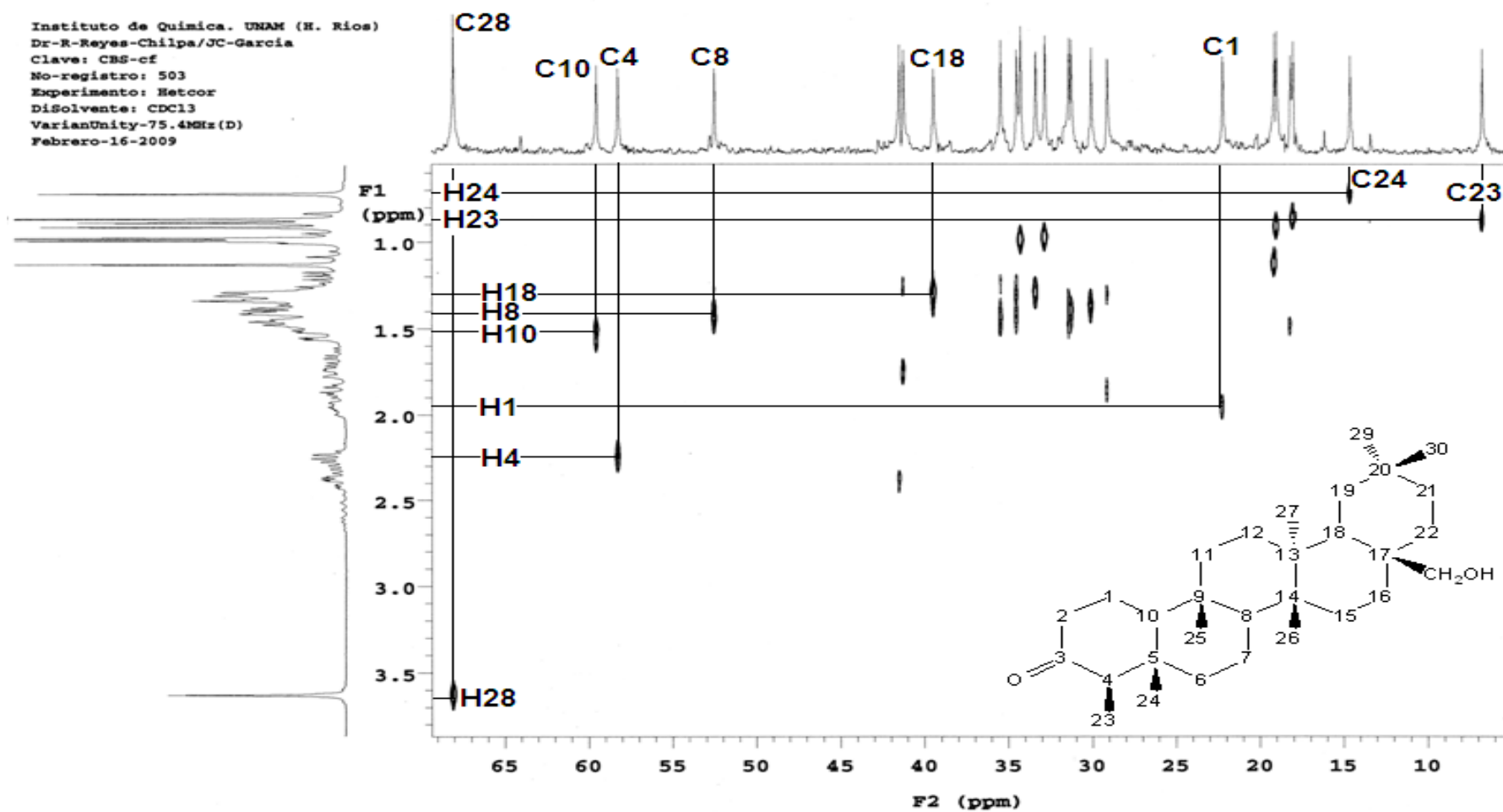
Instituto de Química. UNAM (H. Ríos)
 Dr-R-Reyes-Chilpa/JC-García
 Clave: CBS-cf
 No-registro: 503
 Experimento: C13
 Disolvente: CDCl₃
 VarianUnity-75.4MHz(D)
 Febrero-16-2009



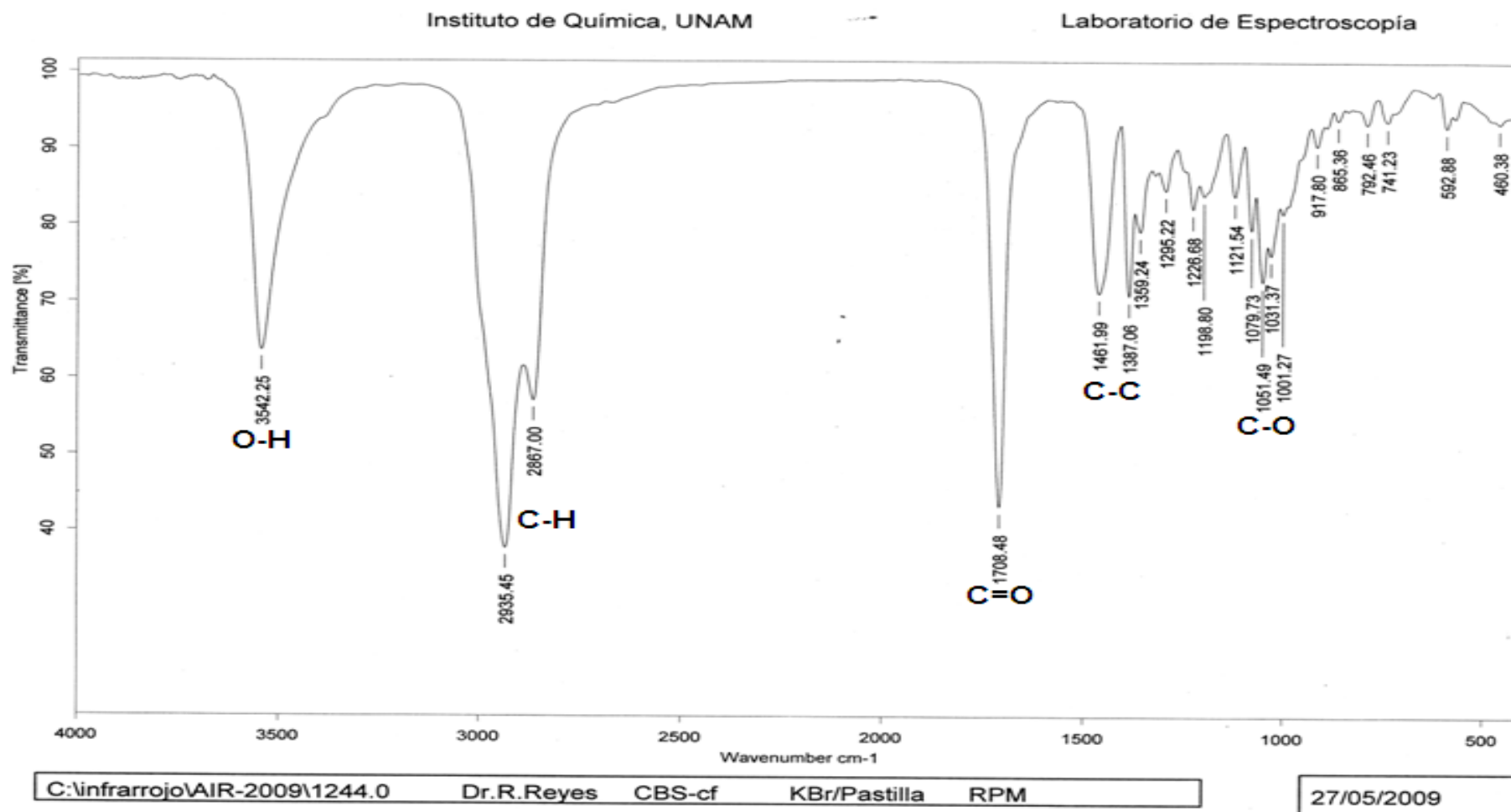
Espectro 2. Espectro de RMN ¹³C del Canofilol.



Espectro 3. Espectro de RMN ^{13}C -Experimento DEPT- del Canofilol.

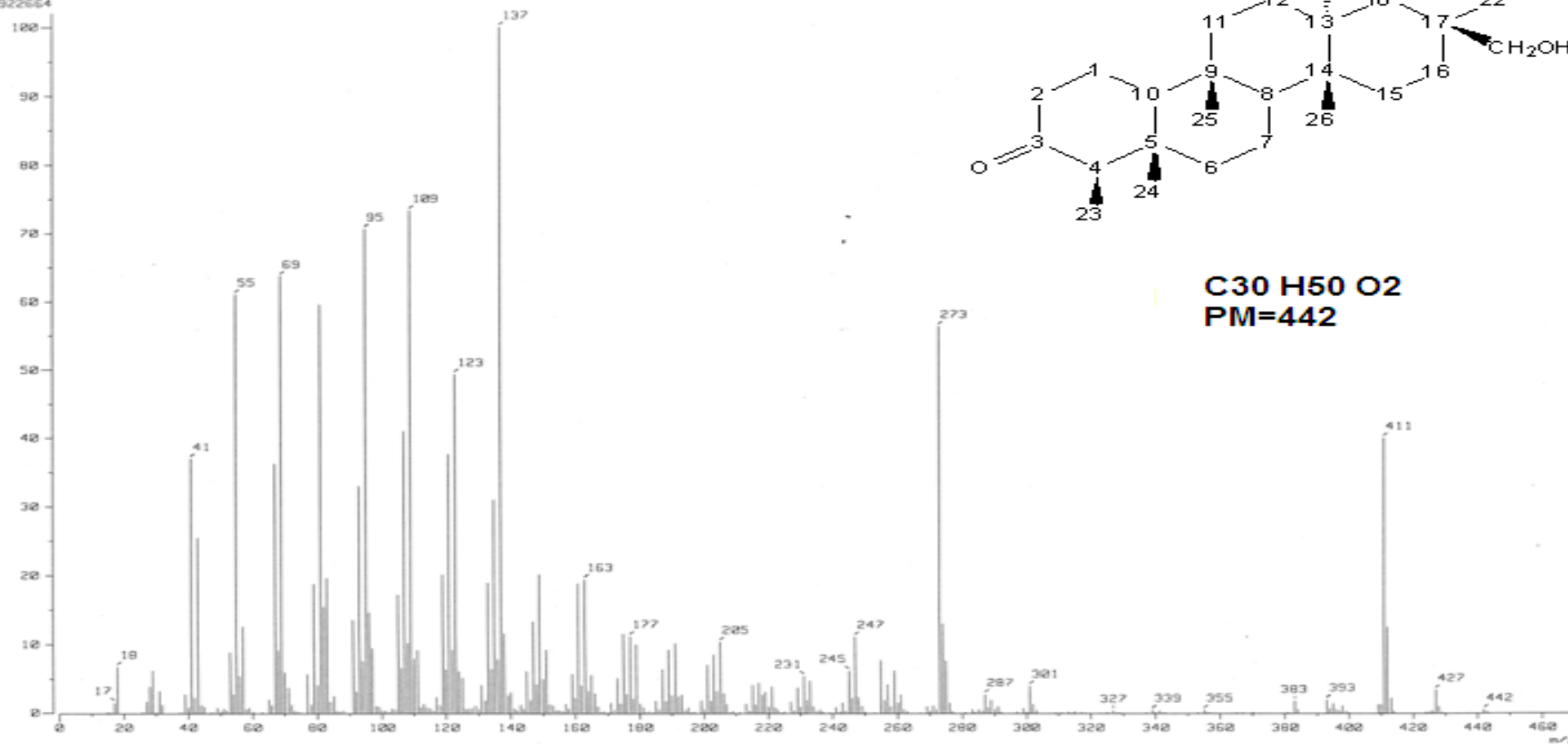


Espectro 4. Espectro de RMN¹H-¹³C -Experimento HETCOR- del Canofilol.



Espectro 5. Espectro de IR del Canofilol.

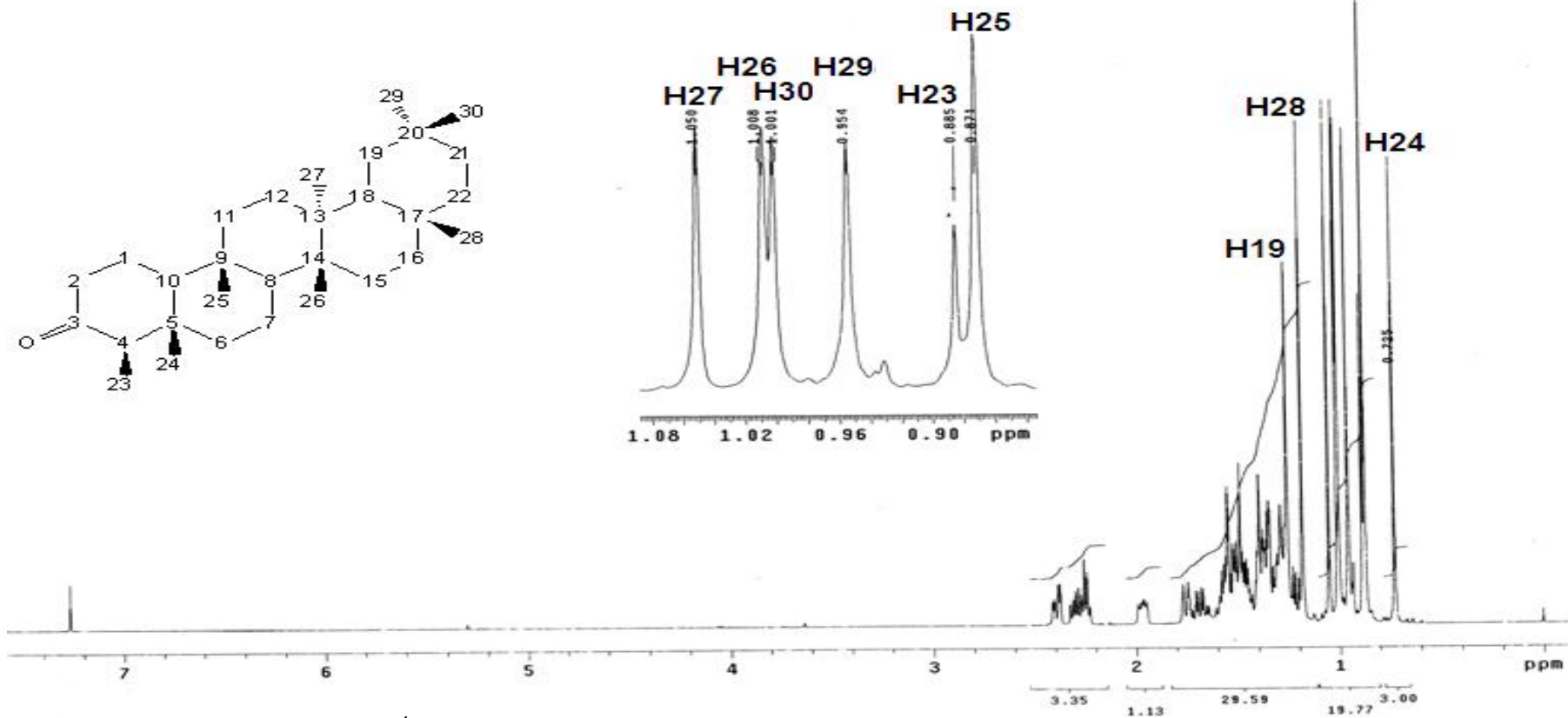
[Mass Spectrum]
 Date : 26-May-2009 11:19
 Sample: 1150 IE CBS-ef JeolSX102R
 Note : -
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)
 RT : 8.79 min Scan# : 115,28
 BP : m/z 137,0000 Int. : 834,06
 Output m/z range : 8.0000 to 478.0297
 Cut Level : 0.00 %
 8922664



Espectro 6. Espectro de Masas del Canofilol.

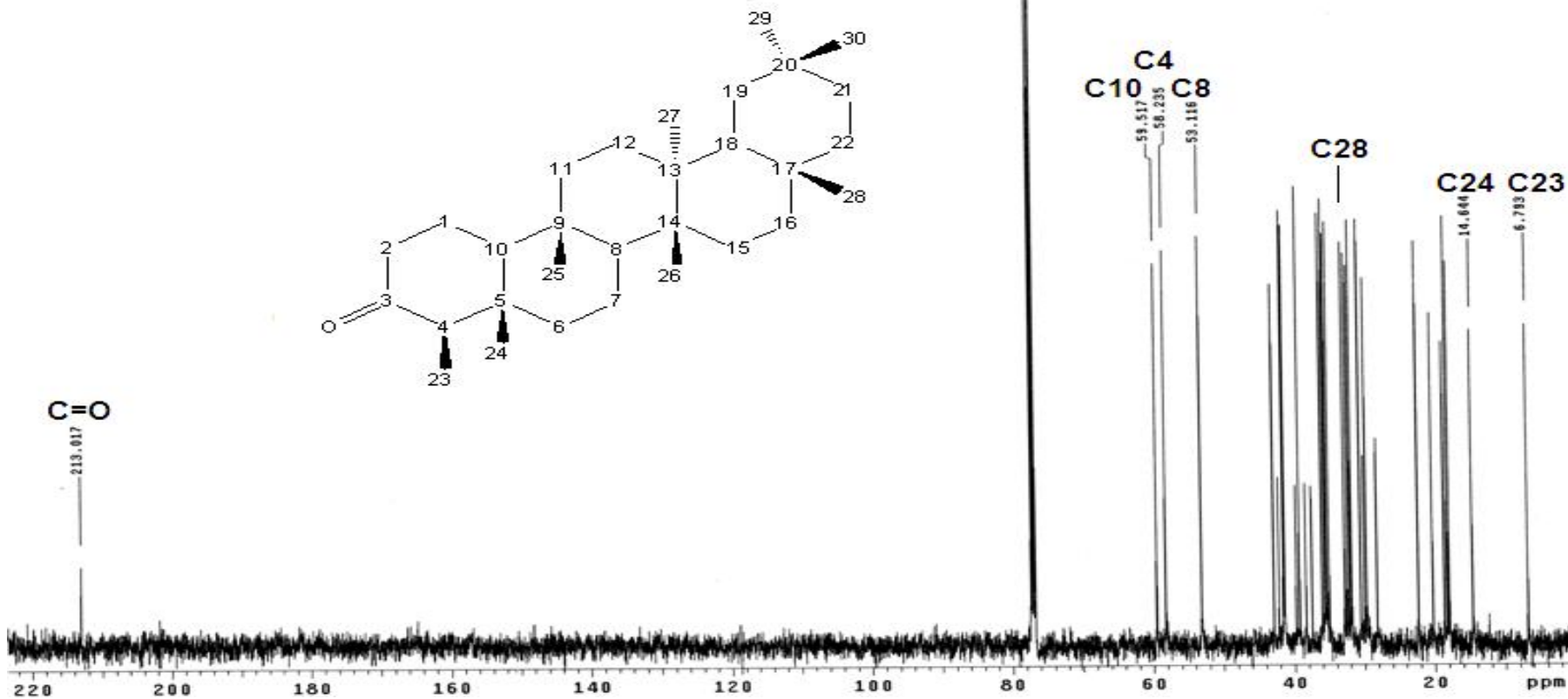
FRIEDELINA

UNAM. Instituto de Química. (M. Ríos)
 Dr-Ricardo-Reyes/JC-García
 Clave: Fried
 No. Registro: 1456
 Experimento: Hidrogeno
 Disolvente: CDCl₃
 VarianInova-500MHz (G)
 Junio-30-2009
 File: std1h
 Pulse Sequence: s2pu1

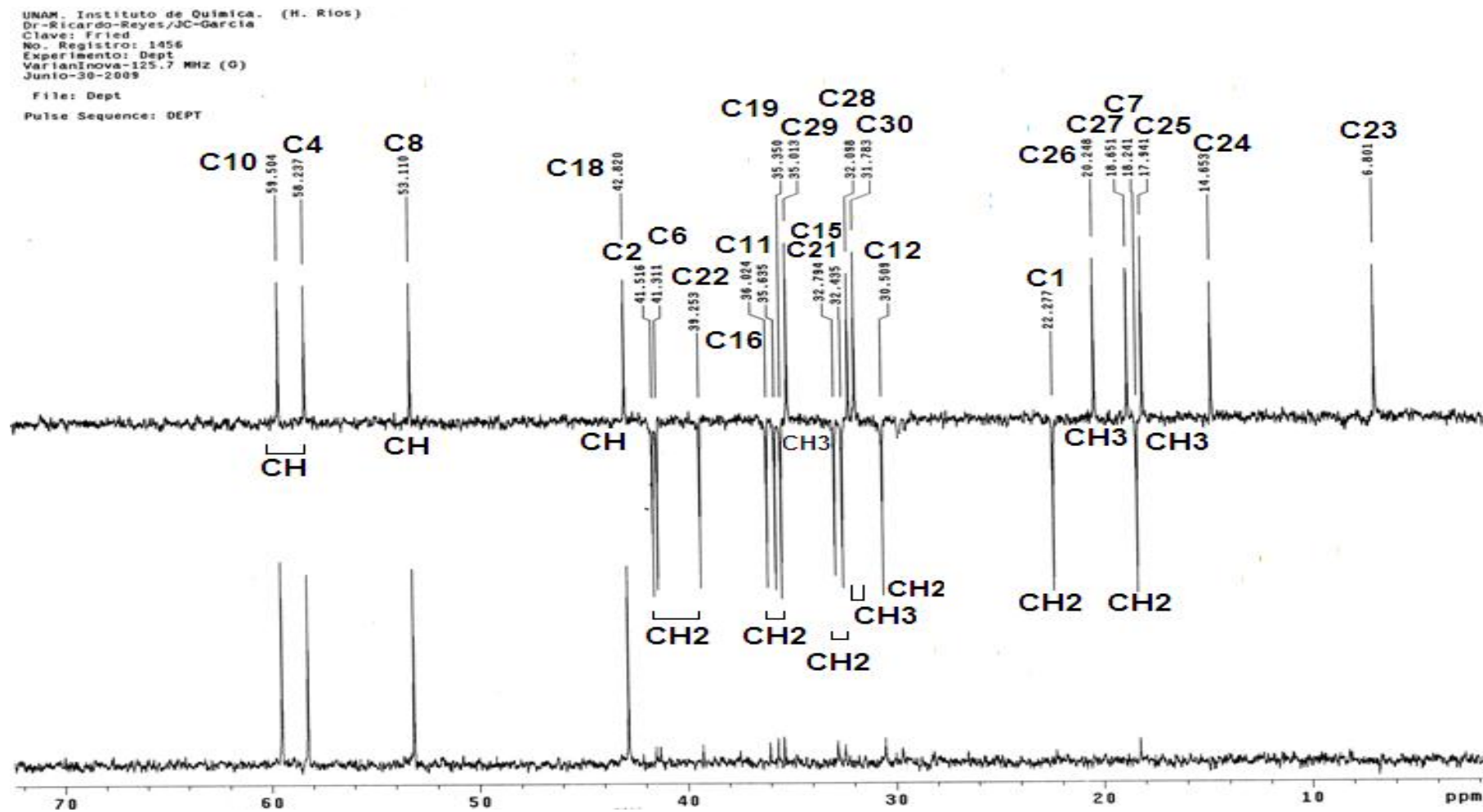


Espectro 7. Espectro de RMN ¹H de la Friedelina.

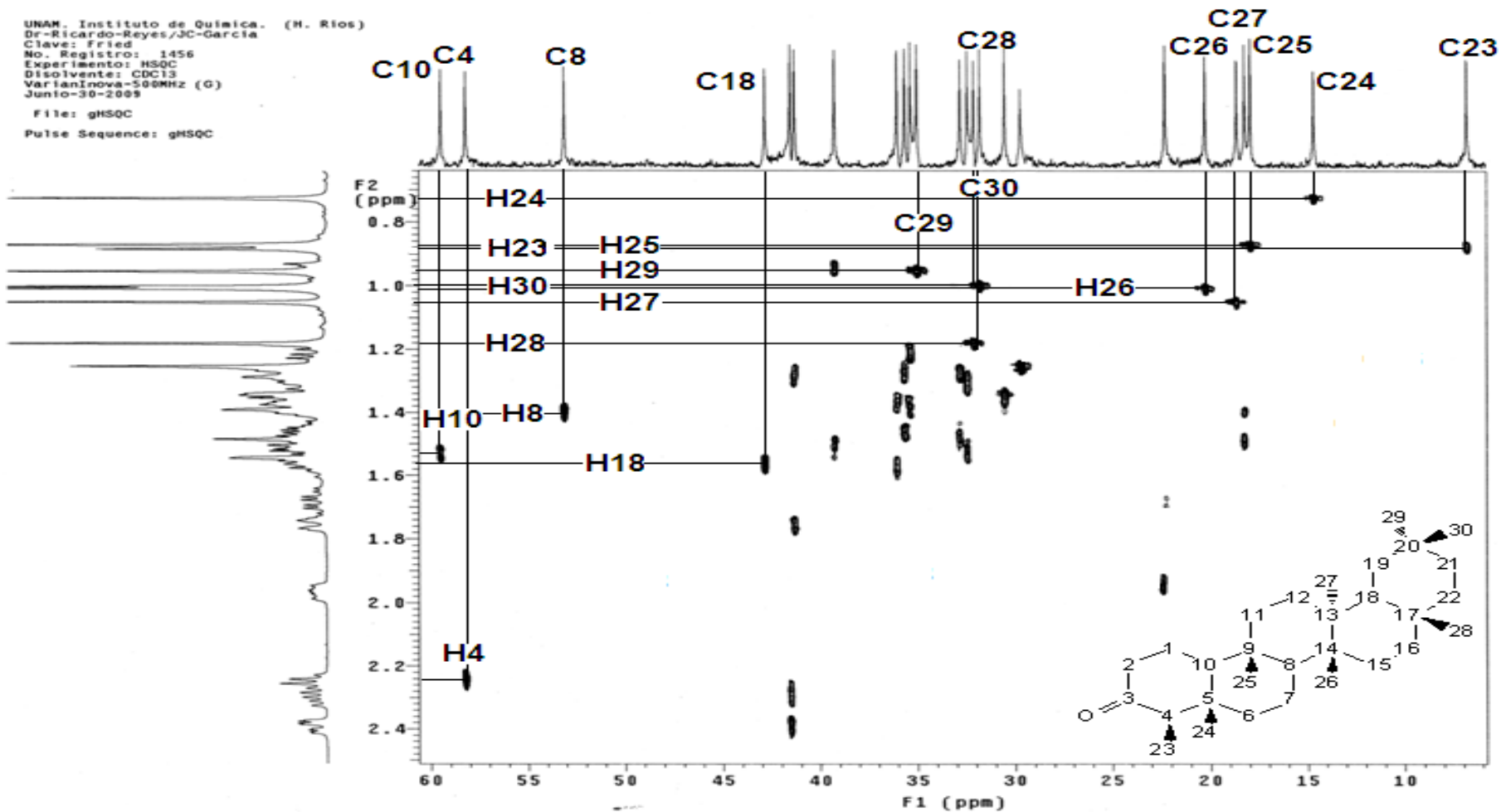
UNAM, Instituto de Química (H. Rios)
 Dr-Ricardo-Reyes/JC-Garcia
 Clave: fried
 No. registro: 1456
 Experimento: C13
 Disolvente: CDCl3
 UnityInova-125.71MHz (G)
 Junio-30-2009
 File: Carbon
 Pulse Sequence: s2pu1



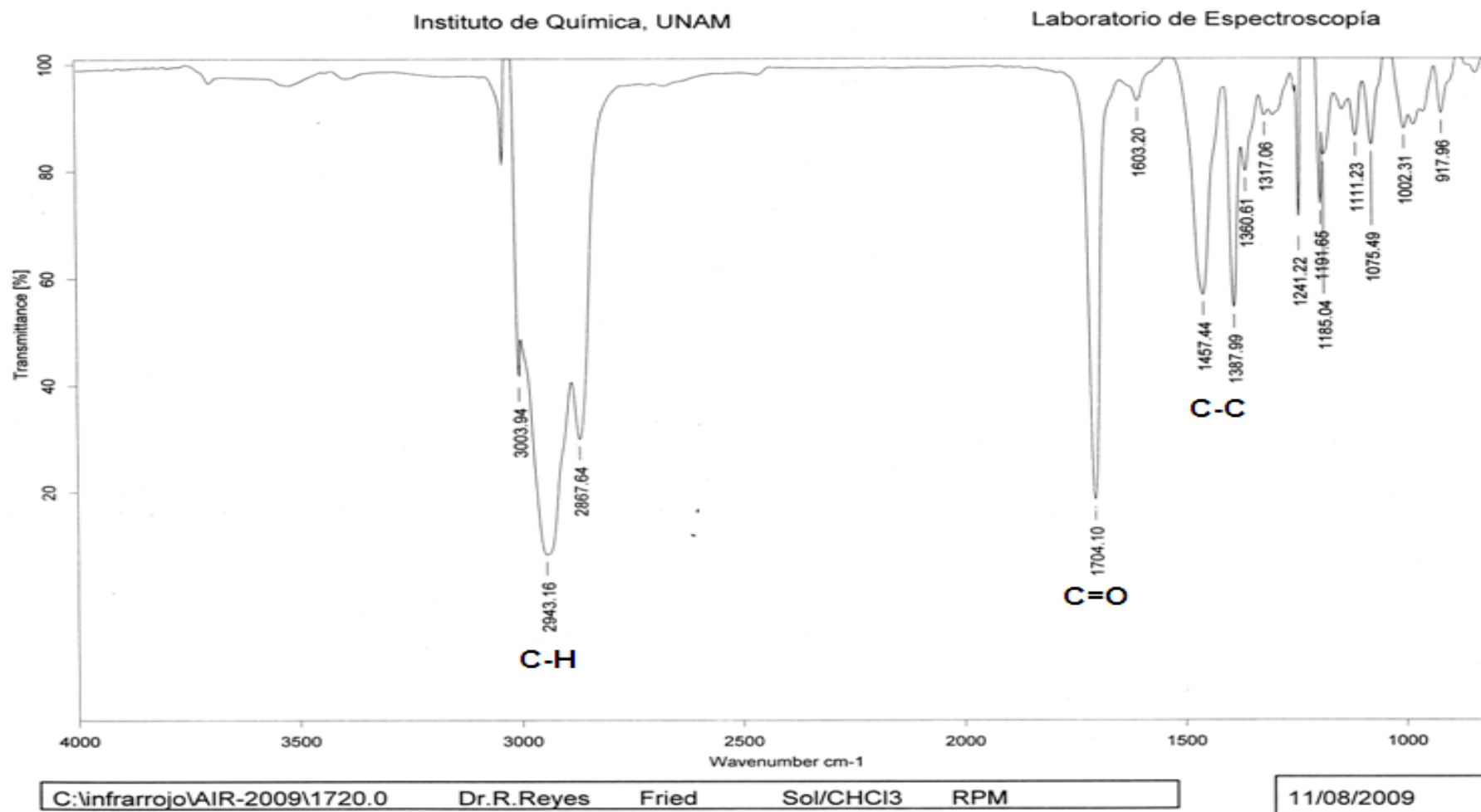
Espectro 8. Espectro de RMN ¹³C de la Friedelina.



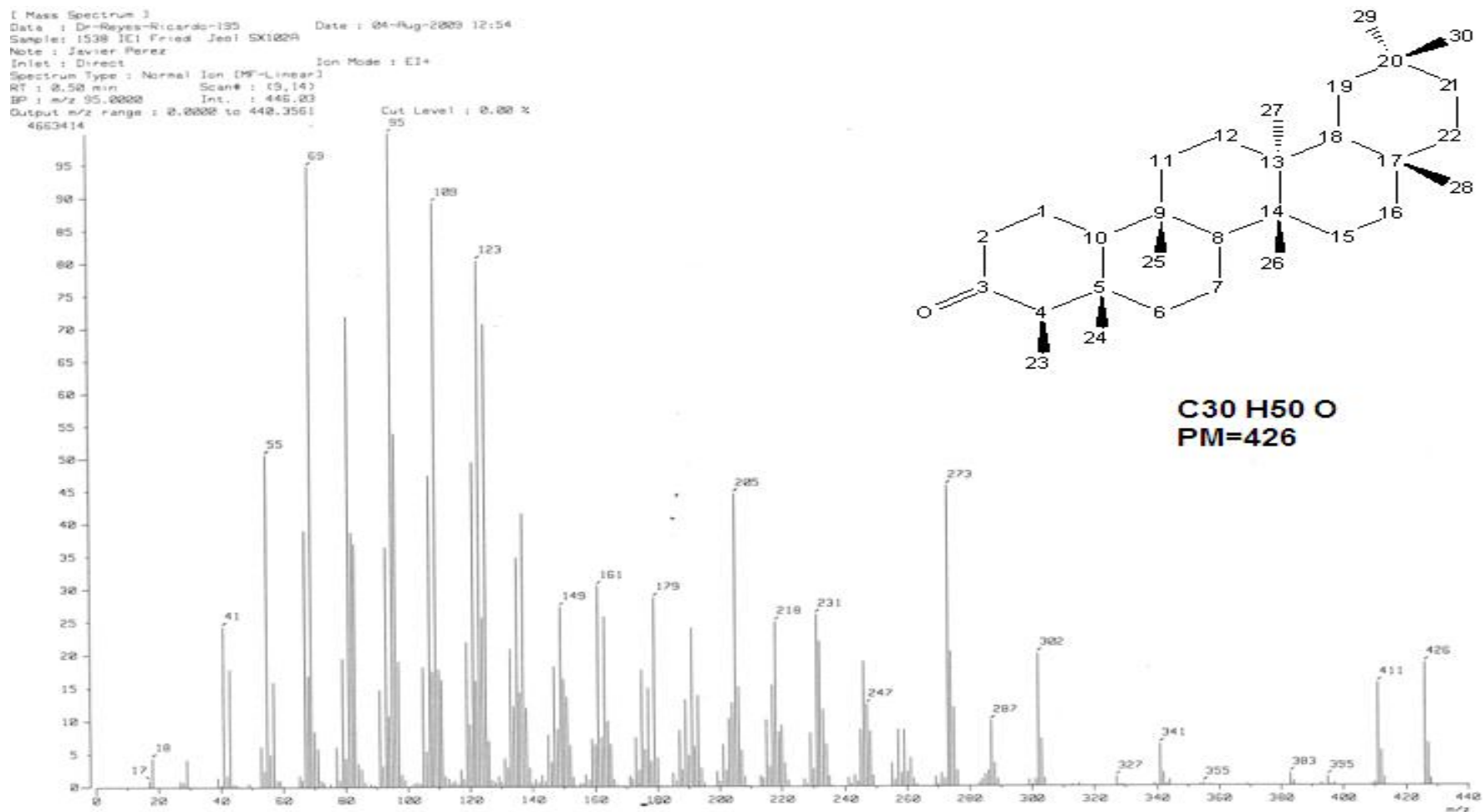
Espectro 9. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -Experimento DEPT de la Friedelina.



Espectro 10. Espectro de RMN ^{13}C -Experimento HSQC- de la Friedelina.



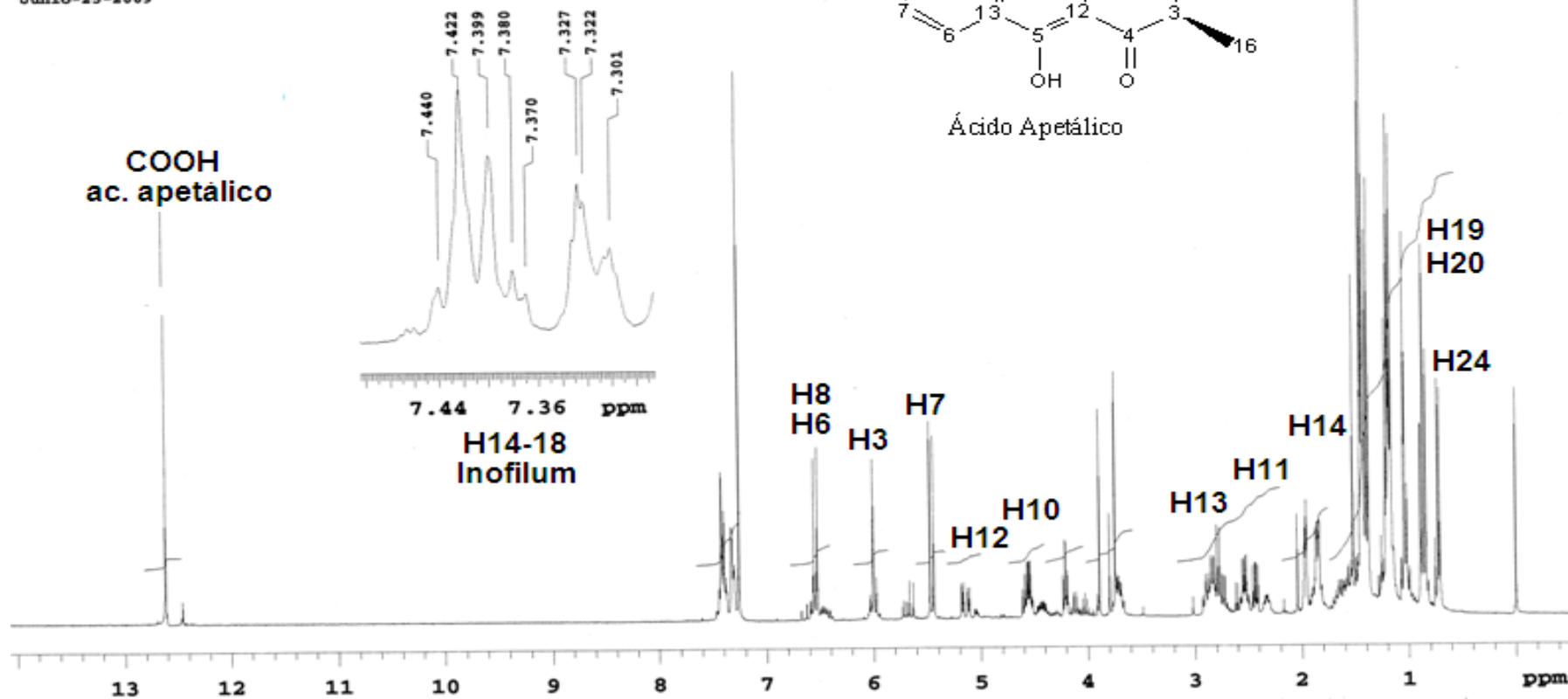
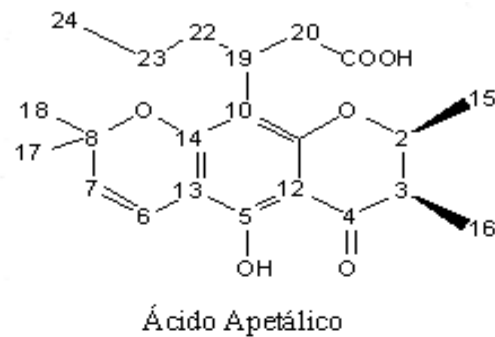
Espectro 11. Espectro de IR de la Friedelina.



Espectro 12. Espectro de Masas de la Friedelina.

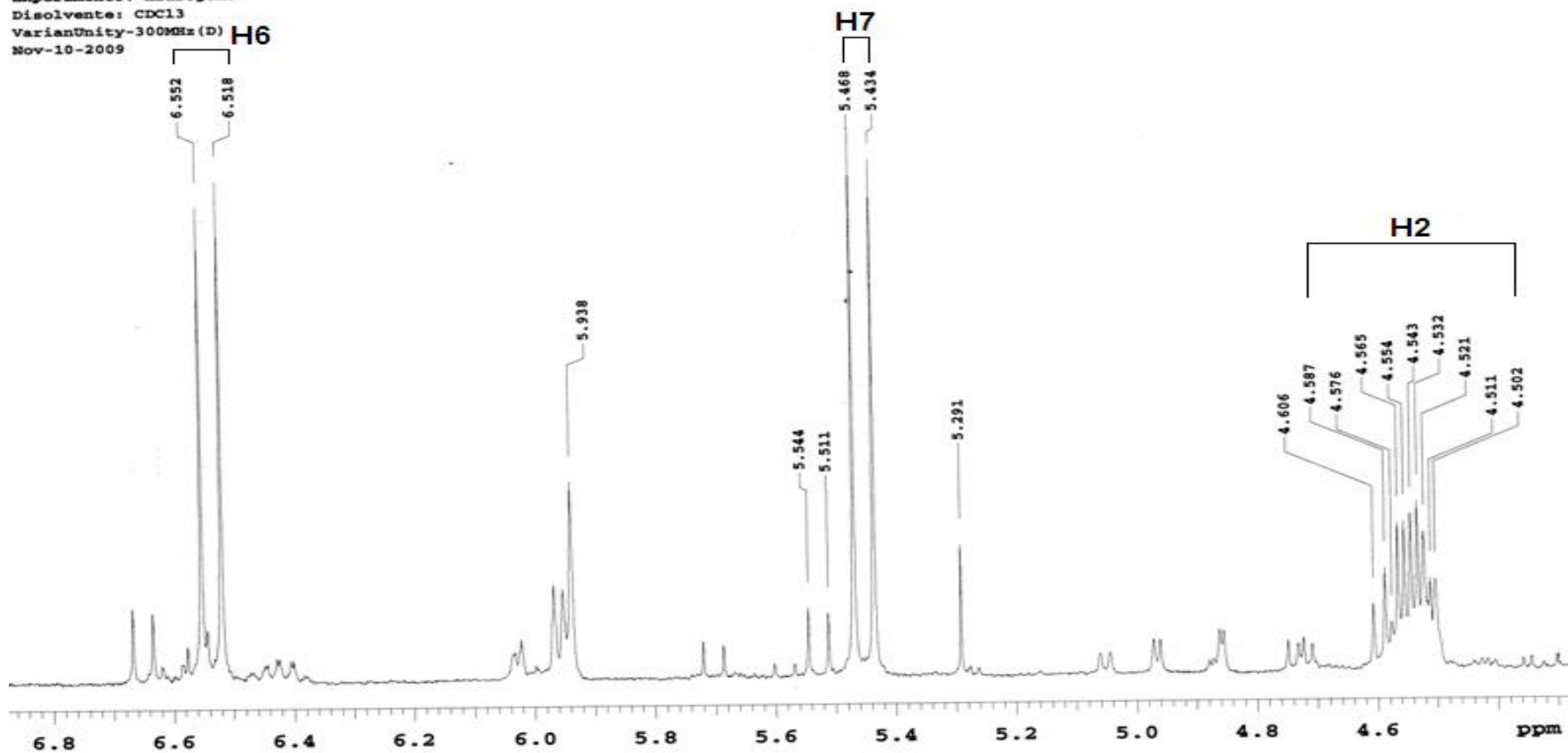
ÁCIDO APETÁLICO

Instituto de Química, UNAM (H. Ríos)
 Dr-R-Reyes-Chilpa/JC-García
 Clave: FR5
 No-registro: 1457
 Experimento: Hidrogeno
 Disolvente: CDCl₃
 VarianUnity-300MHz(D)
 Junio-25-2009

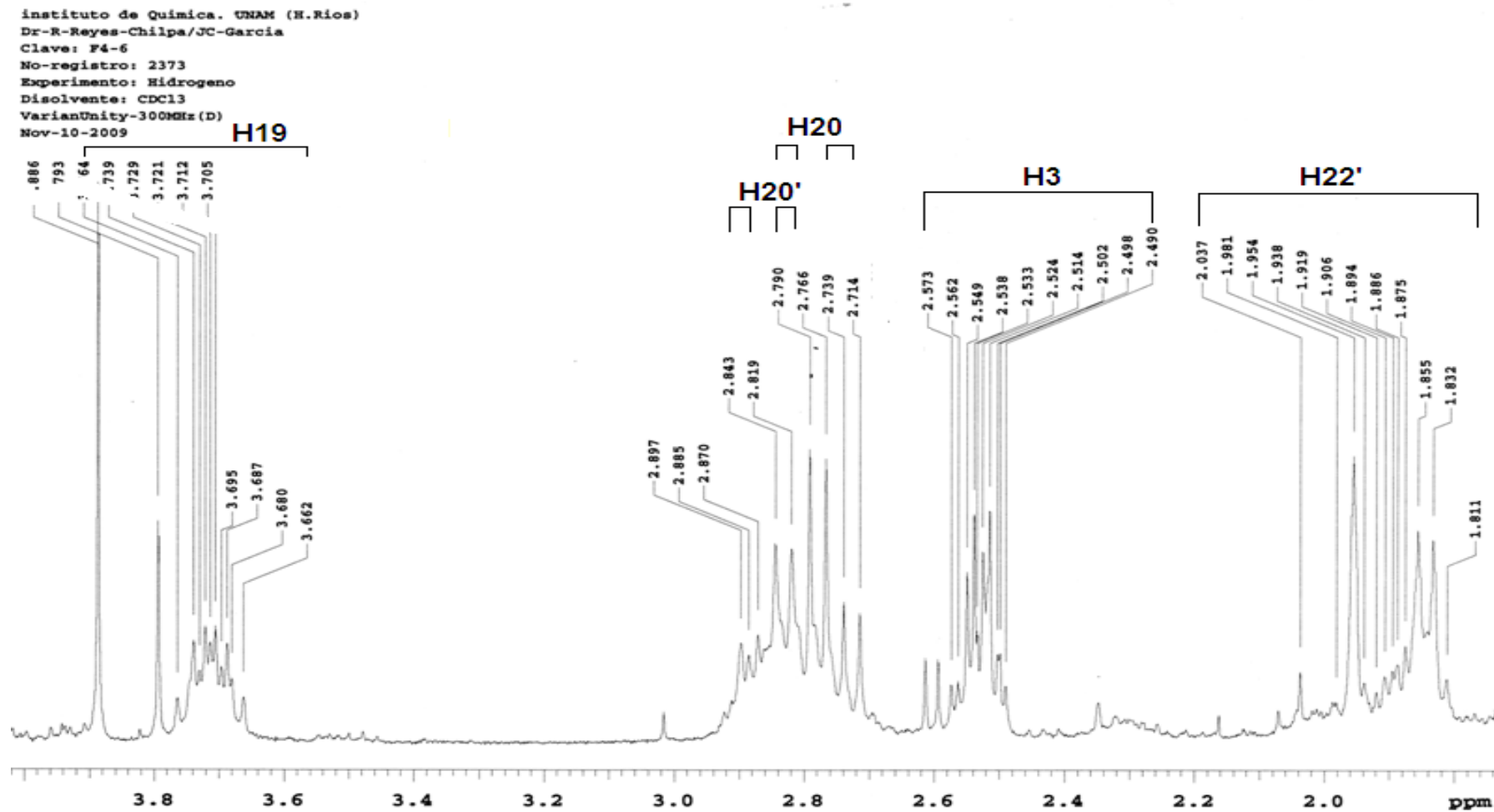


Espectro 13. Espectro de RMN ¹H del Acido Apetálico.

instituto de Química. UNAM (H.Rios)
 Dr-R-Reyes-Chilpa/JC-Garcia
 Clave: F4-6
 No-registro: 2373
 Experimento: Hidrogeno
 Disolvente: CDCl3
 VarianUnity-300MHz(D)
 Nov-10-2009

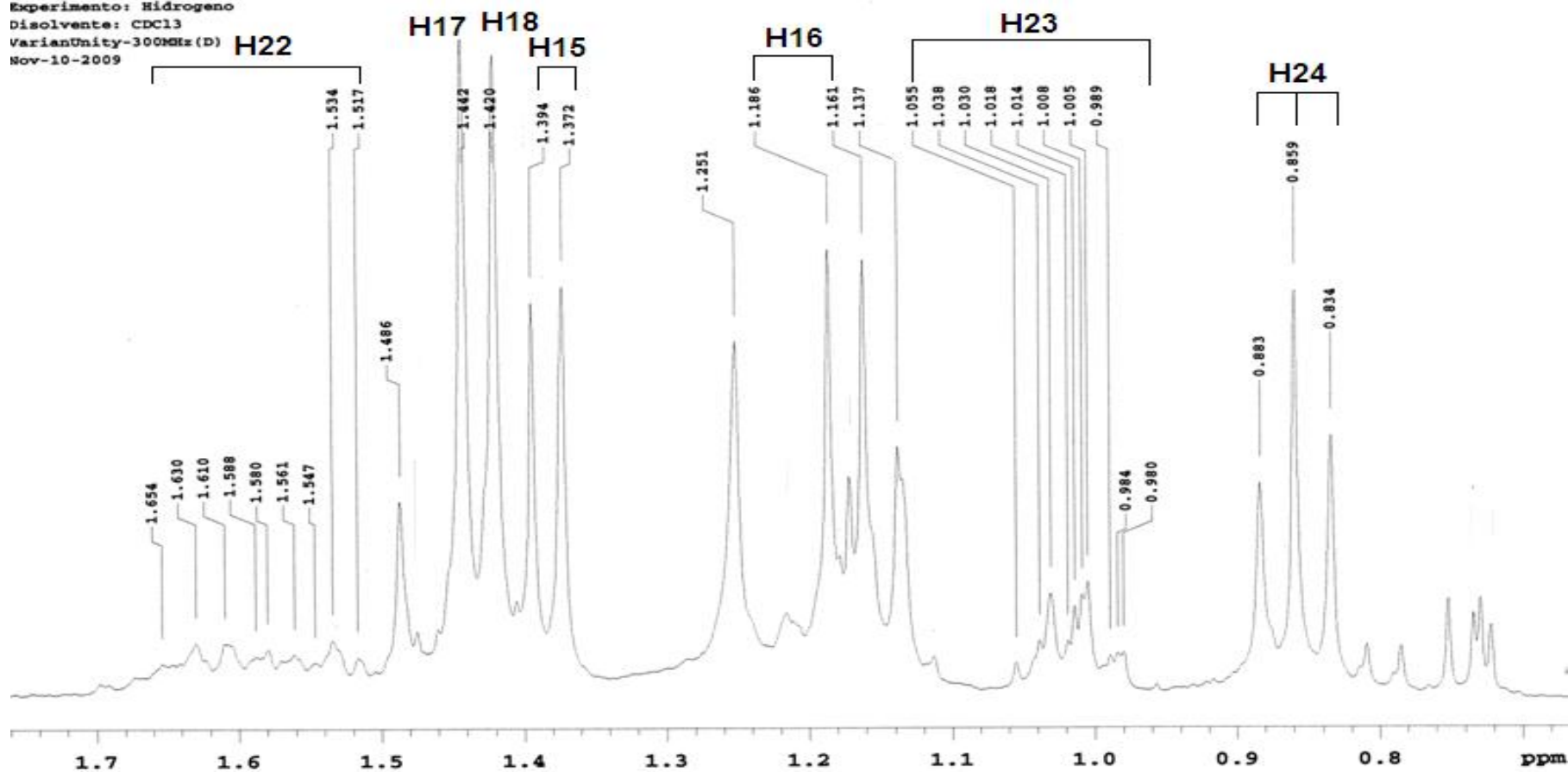


Espectro 14. Ampliación del espectro de RMN ^1H del Ácido Apetálico (4-8 ppm).



Espectro 15. Ampliación del espectro de RMN ¹H del Ácido Apético (2-4 ppm).

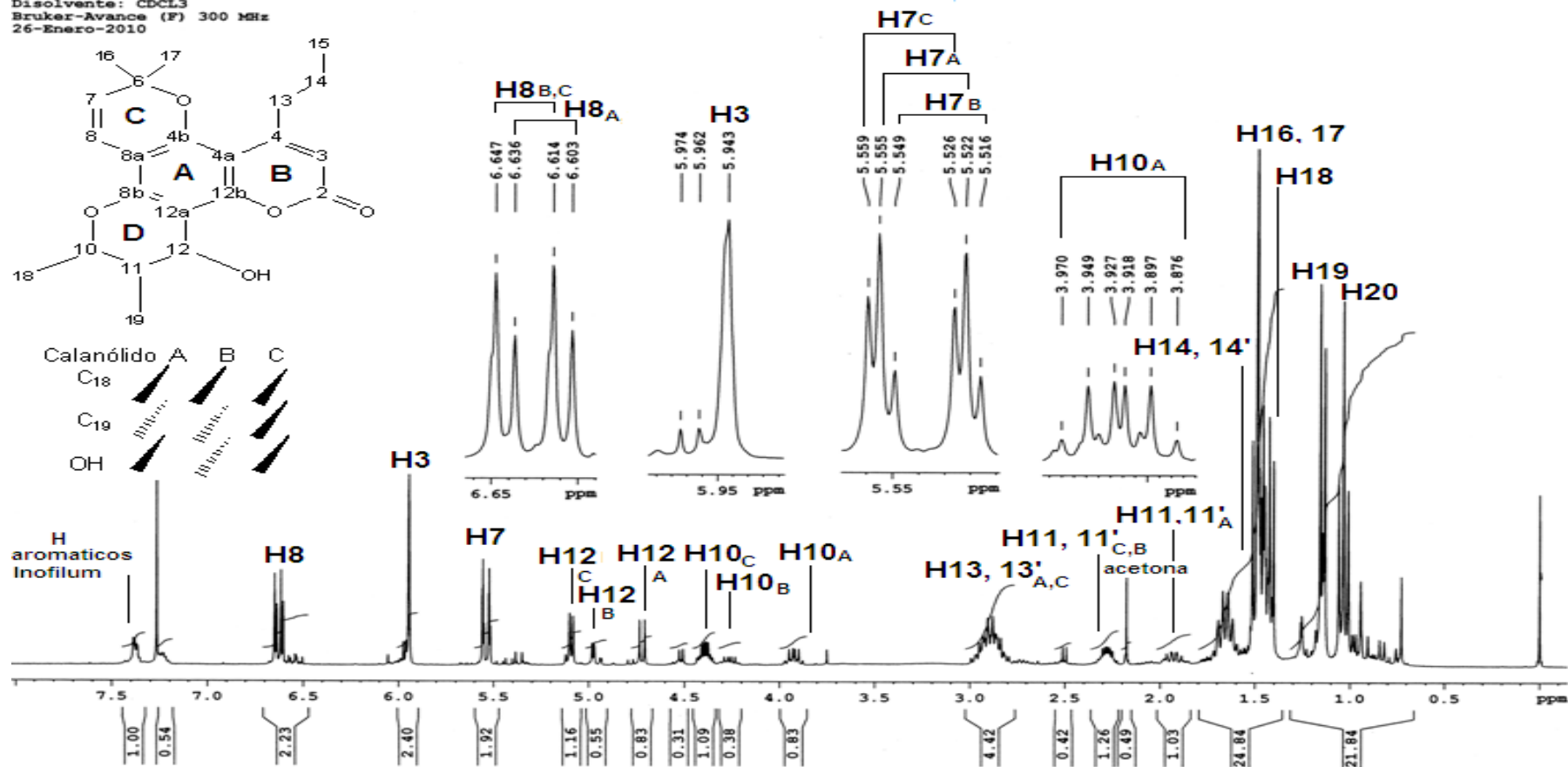
Instituto de Química, UNAM (H.Ríos)
 Dr-R-Reyes-Chilpa/JC-García
 Clave: F4-6
 No-registro: 2373
 Experimento: Hidrogeno
 Disolvente: CDCl3
 VarianUnity-300MHz (D)
 Nov-10-2009



Espectro 16. Ampliación del espectro de RMN ¹H del Ácido Apetálico (0-2 ppm).

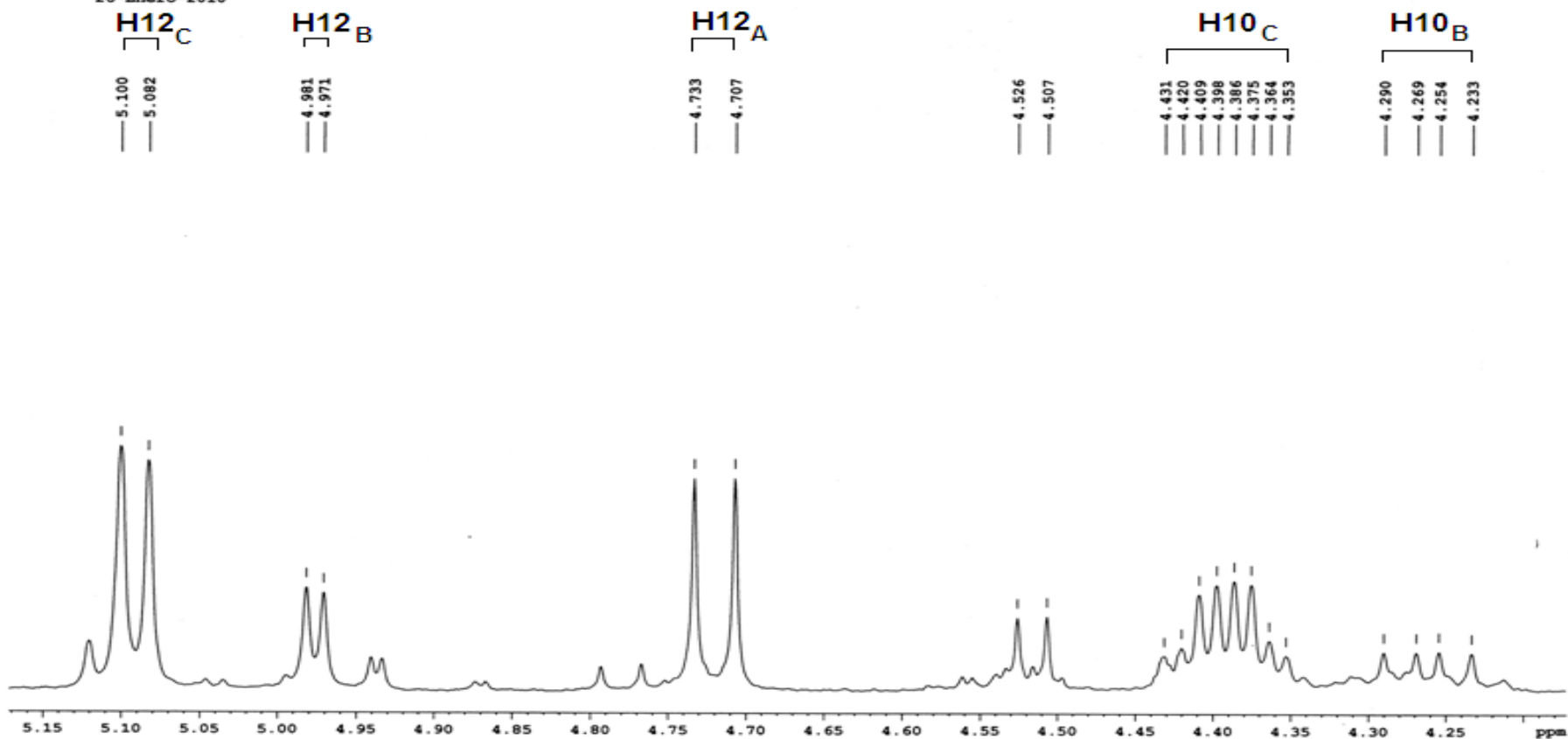
***MEZCLA DE
CALANÓLIDOS
A, B Y C***

Instituto de Química UNAM (BQG)
 Dr. R. Reyes / J. C. García
 Clave: F4-7
 No. de Registro: 0138
 Experimento: 1H
 Disolvente: CDCl₃
 Bruker-Avance (F) 300 MHz
 26-Enero-2010

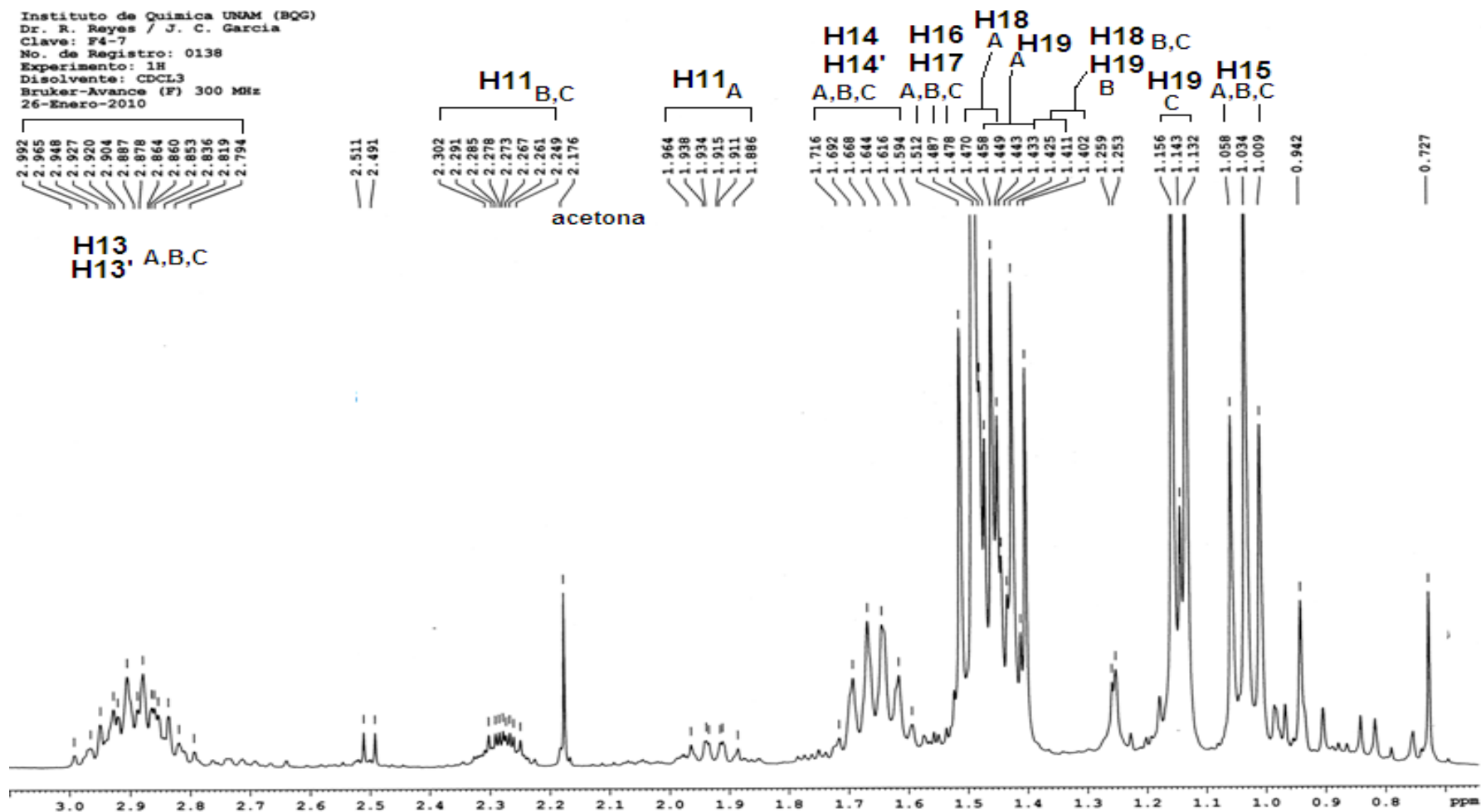


Espectro 17. Espectro de RMN ¹H de la mezcla de calanólidos A, B y C y trazas de Inofilum.

Instituto de Química UNAM (BQG)
 Dr. R. Reyes / J. C. García
 Clave: F4-7
 No. de Registro: 0138
 Experimento: 1H
 Disolvente: CDCL₃
 Bruker-Avance (F) 300 MHz
 26-Enero-2010

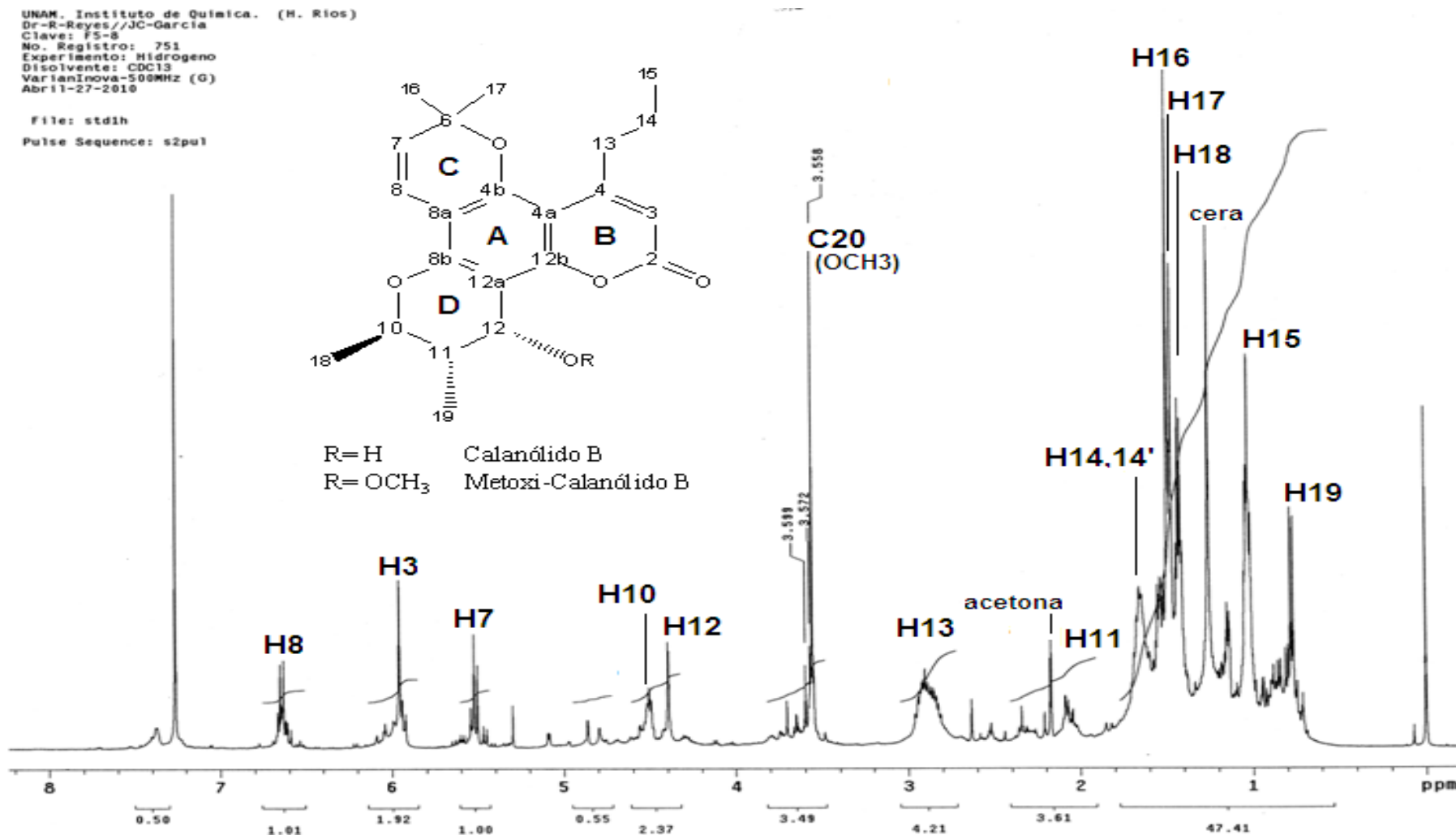


Espectro 18. Ampliación del espectro de RMN ¹H de la mezcla de Calanólidos A, B y C.

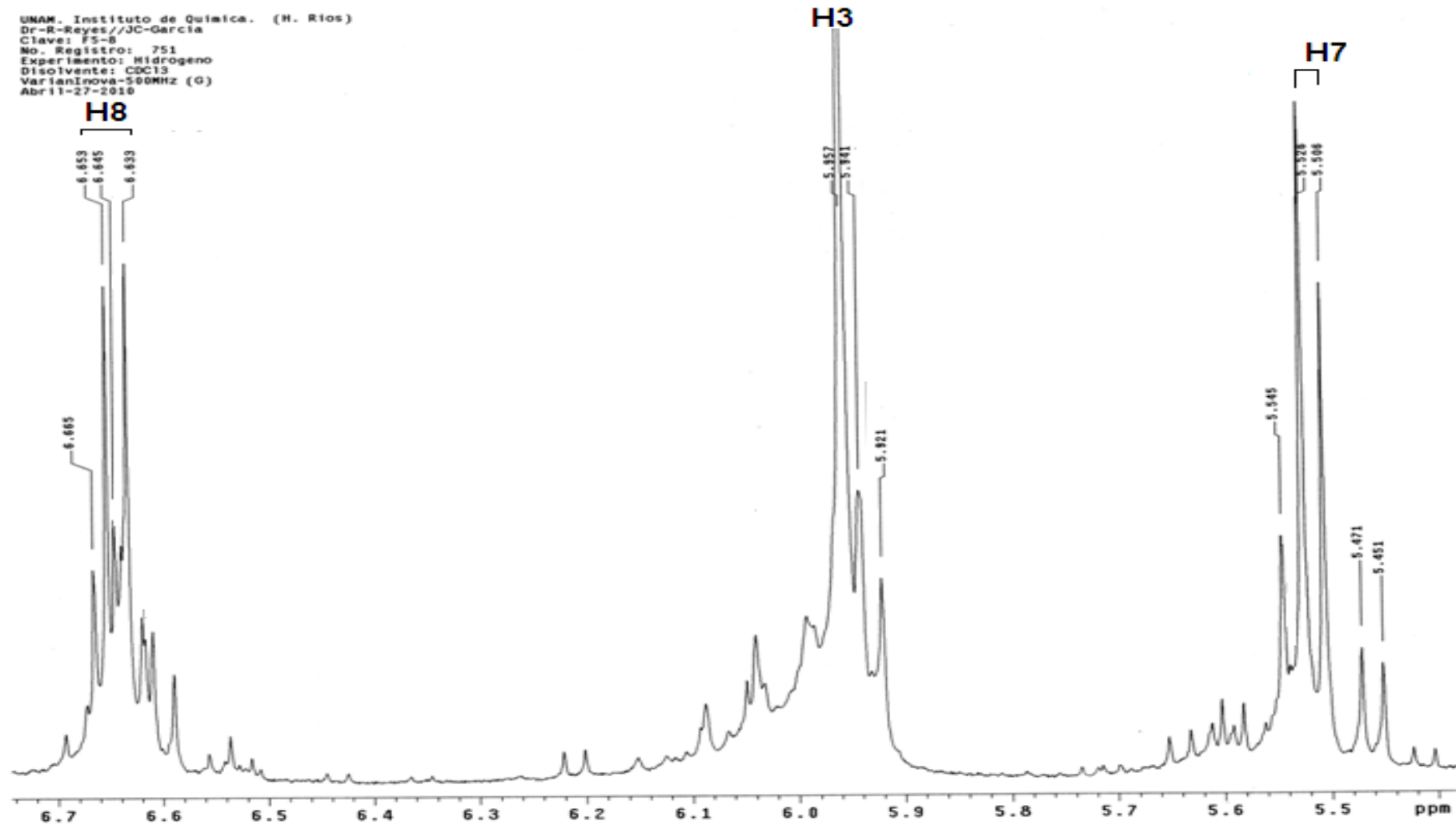


Espectro 19. Ampliación del espectro de RMN ¹H de la mezcla de Calanolidos A, B y C.

12-METOXI-(-)-CALANÓLIDO B



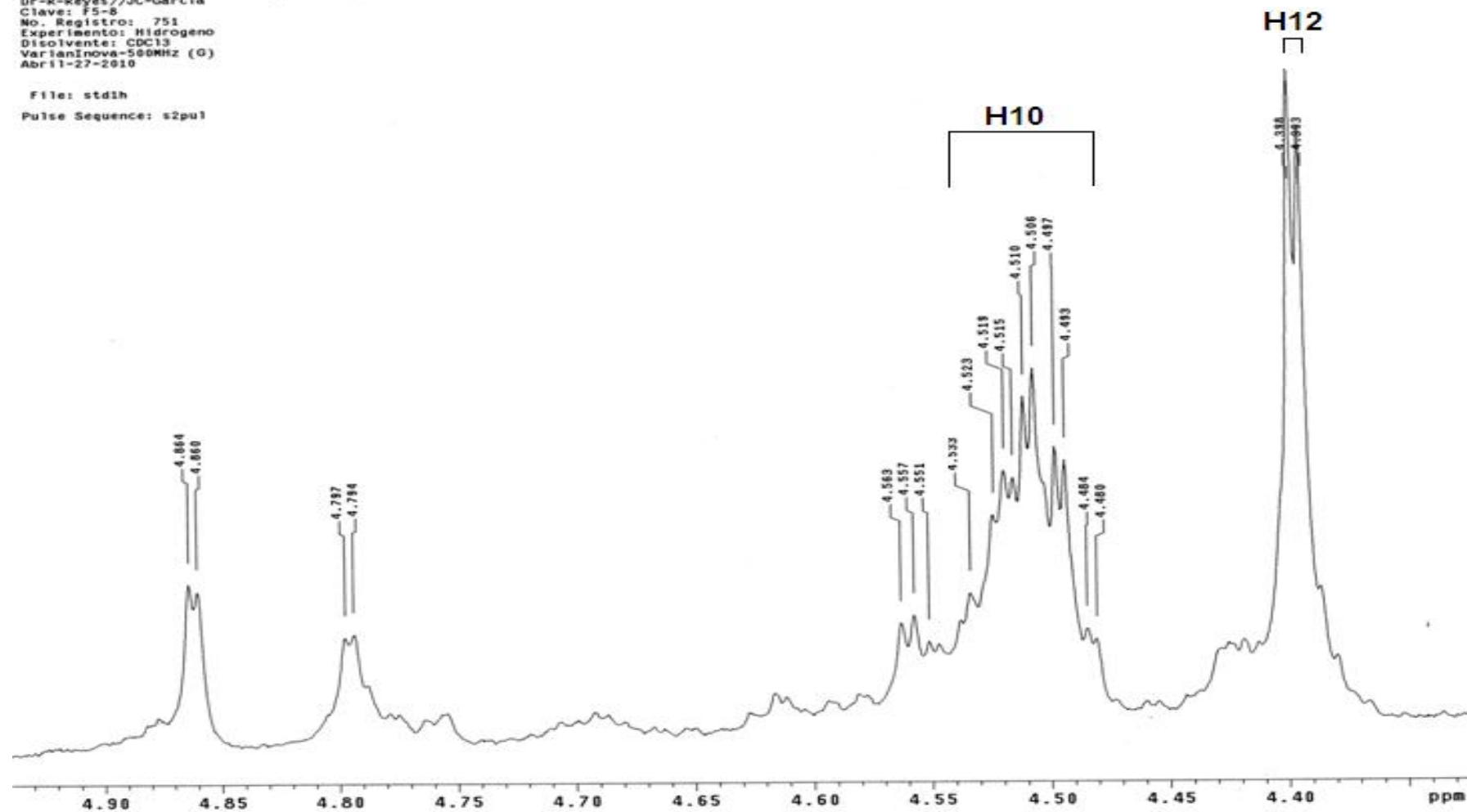
Espectro19. Espectro de RMN ¹H del 12-Metoxi(-)-Calanólido B.



Espectro 20. Ampliación del espectro de RMN ¹H del 12-Metoxi(-)-Calanolido B (5-7 ppm).

UNAM. Instituto de Química. (M. Ríos)
Dr-R-Reyes/JC-García
Clave: F5-8
No. Registro: 751
Experimento: Hidrogeno
Disolvente: CDCl₃
VarianInova-500MHz (G)
Abr11-27-2010

File: std1h
Pulse Sequence: s2pu1

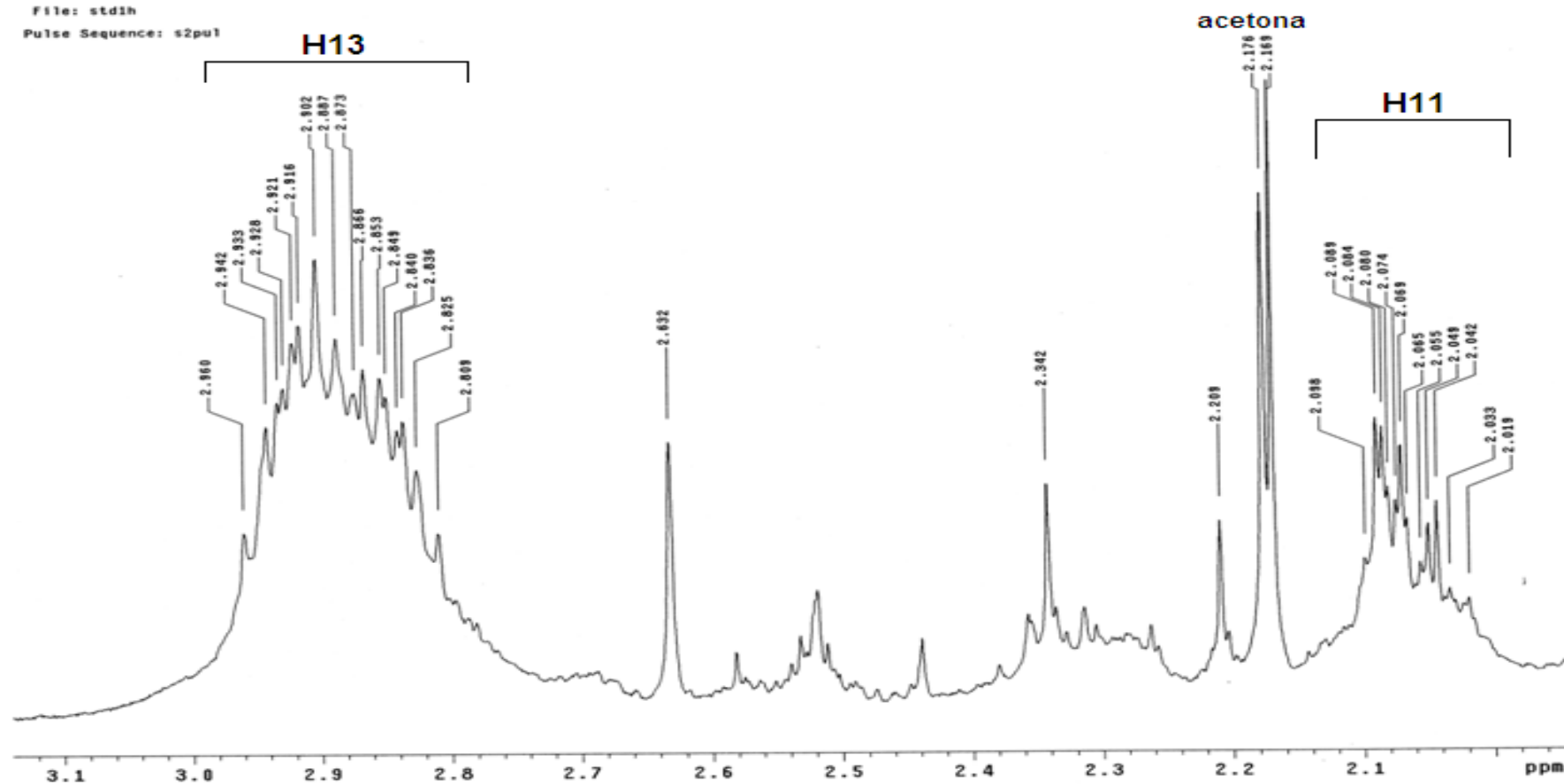


Espectro 21. Ampliación del espectro de RMN ¹H del 12-Metoxi(-)-Calanolido B (4-5 ppm).

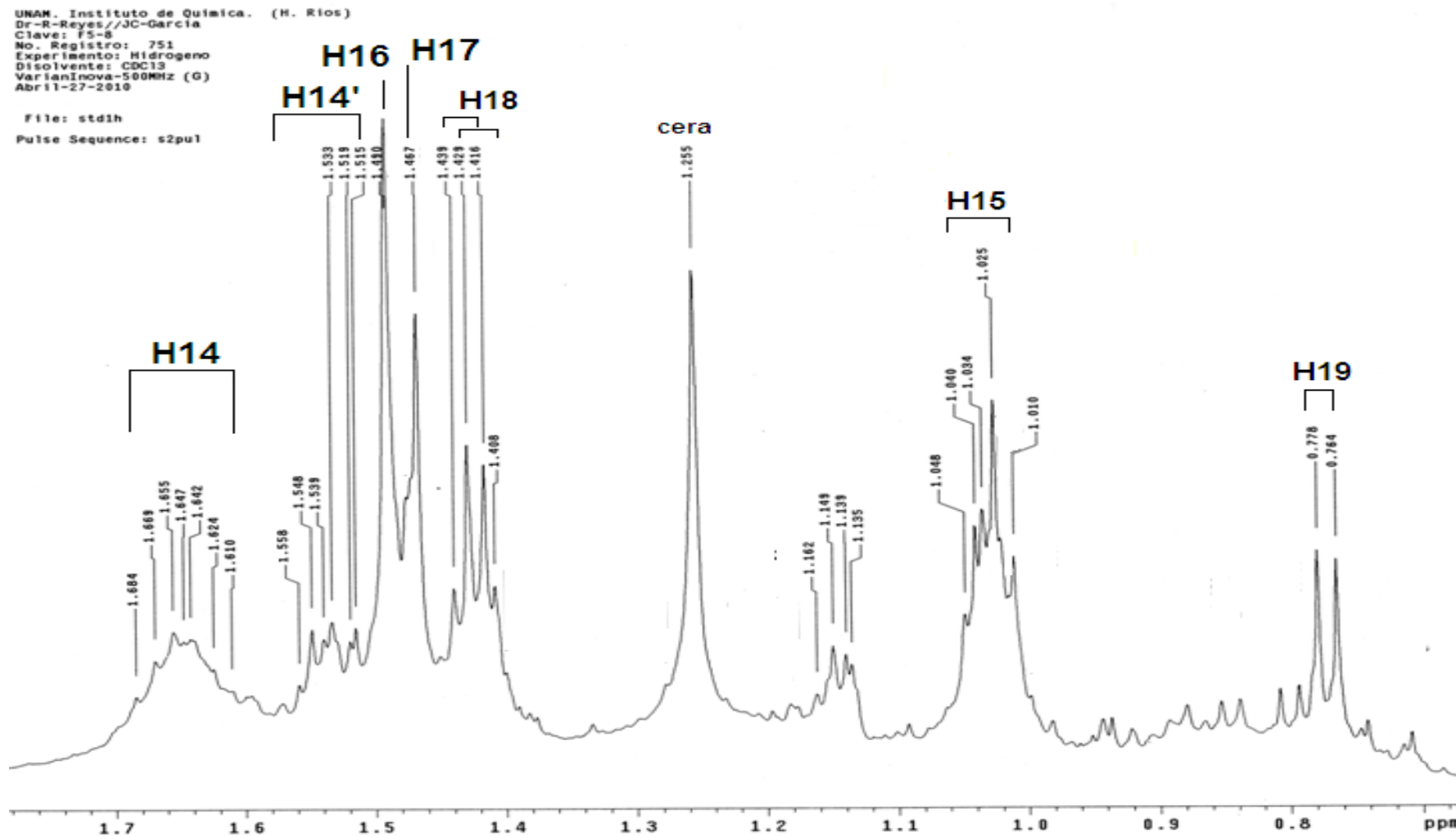
UNAM. Instituto de Química. (H. Ríos)
Dr-R-Reyes//JC-García
Clave: F5-B
No. Registro: 751
Experimento: Hidrogeno
Disolvente: CDCl₃
VarianInova-500MHz (G)
Abril-27-2010

File: std1h

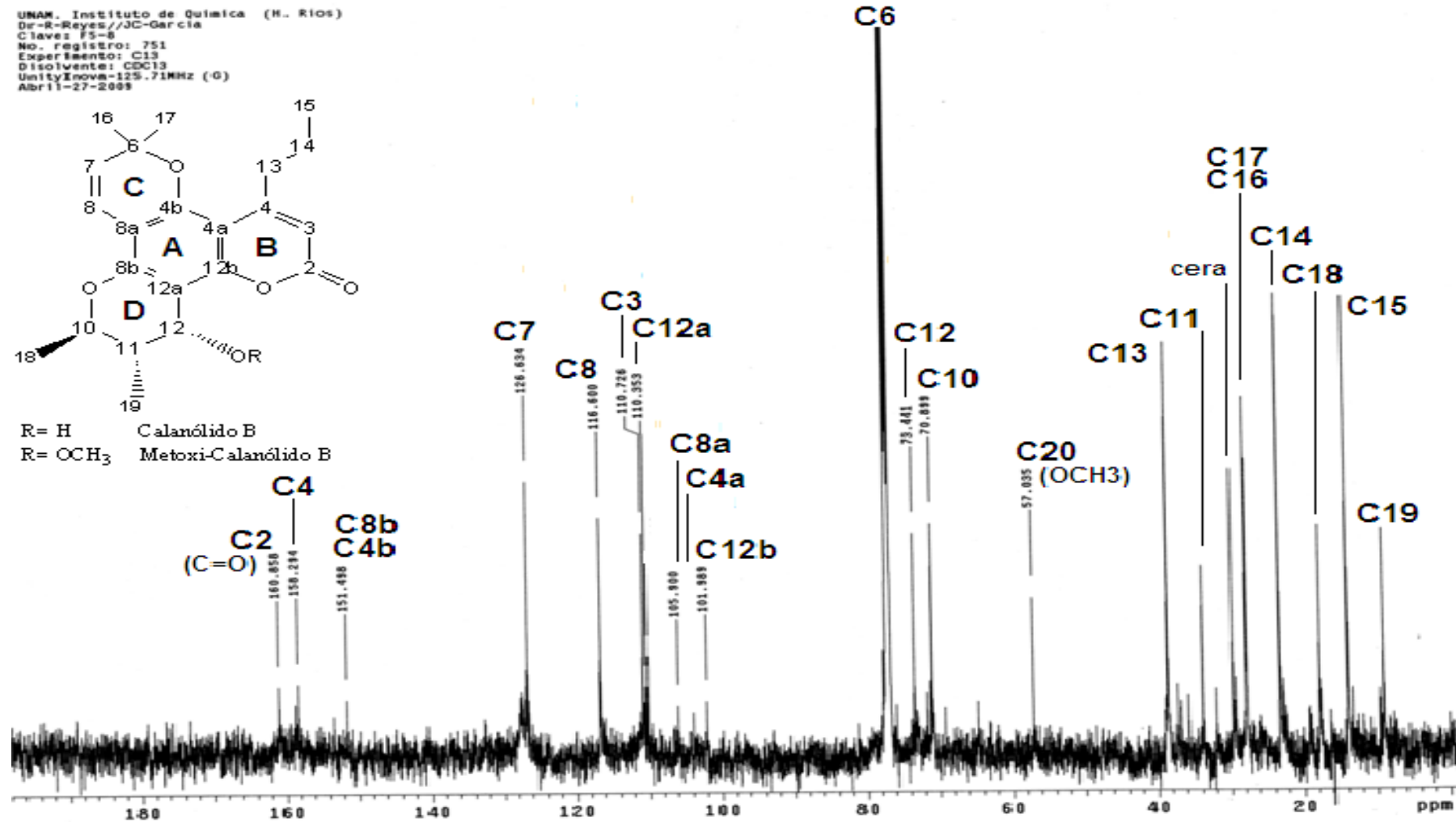
Pulse Sequence: s2pul



Espectro 22. Ampliación del espectro de RMN ¹H del 12-Metoxi(-)-Calanolido B (2-4 ppm).



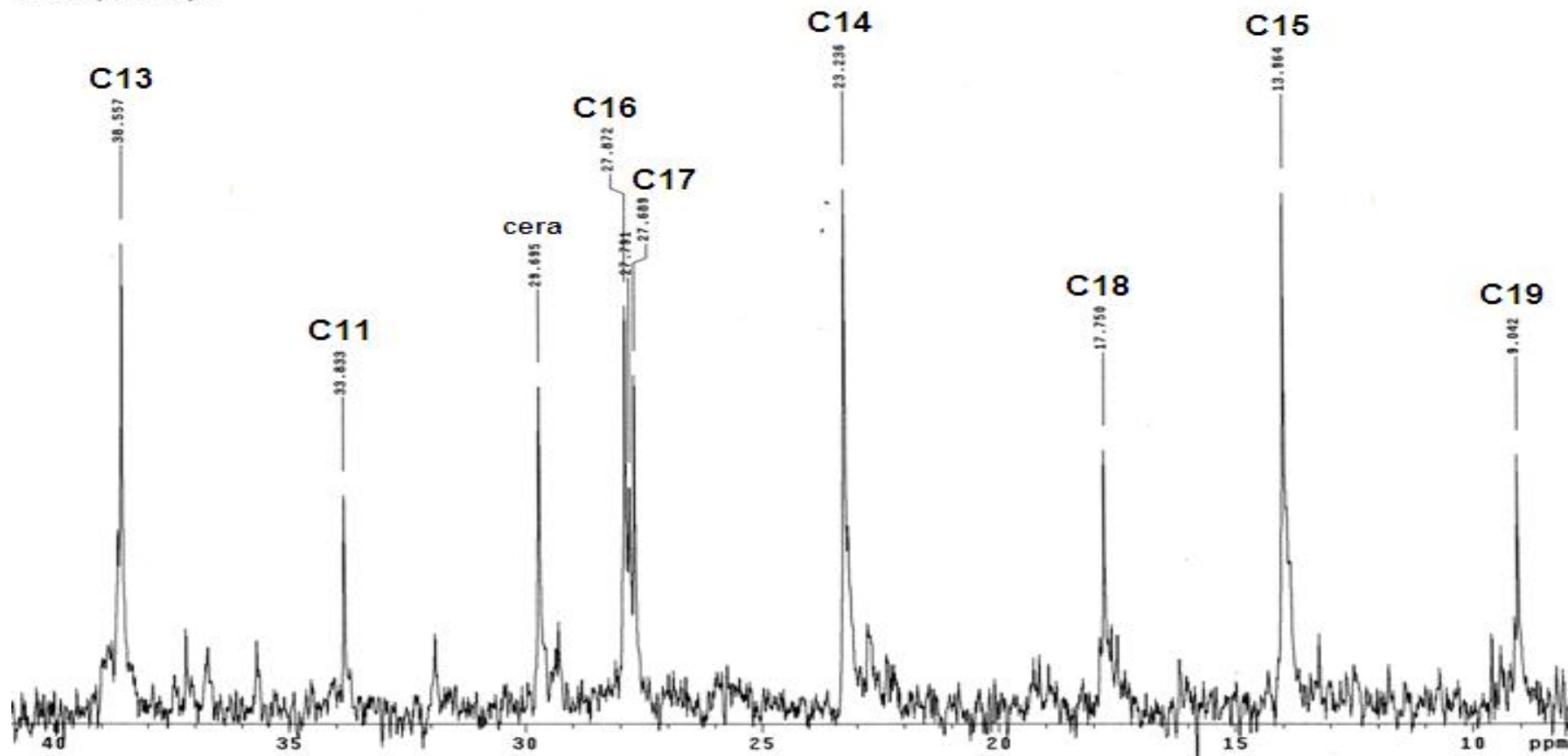
Espectro 23. Ampliación del espectro de RMN ^1H del 12-Metoxi(-)-Calanolido B (0-2 ppm).



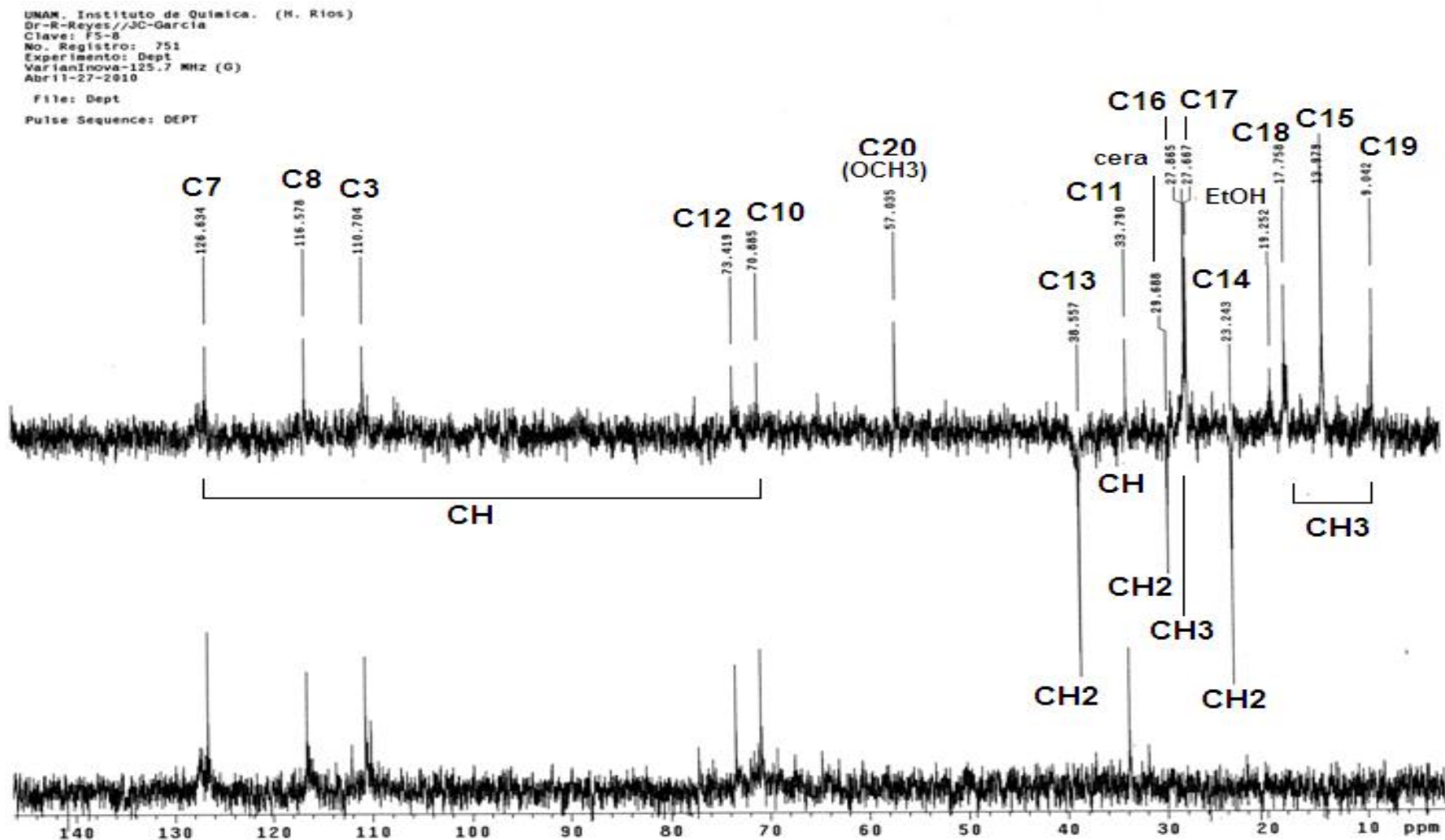
Espectro 24. Espectro de RMN ¹³C del 12-Metoxi(-)-Calanólido B.

UNAM. Instituto de Química (H. Rios)
Dr-R-Reyes//JC-Garcia
Clave: F5-8
No. registro: 751
Experimento: C13
Disolvente: CDCl3
UnityInova-125.71MHz (G)
Abril-27-2009

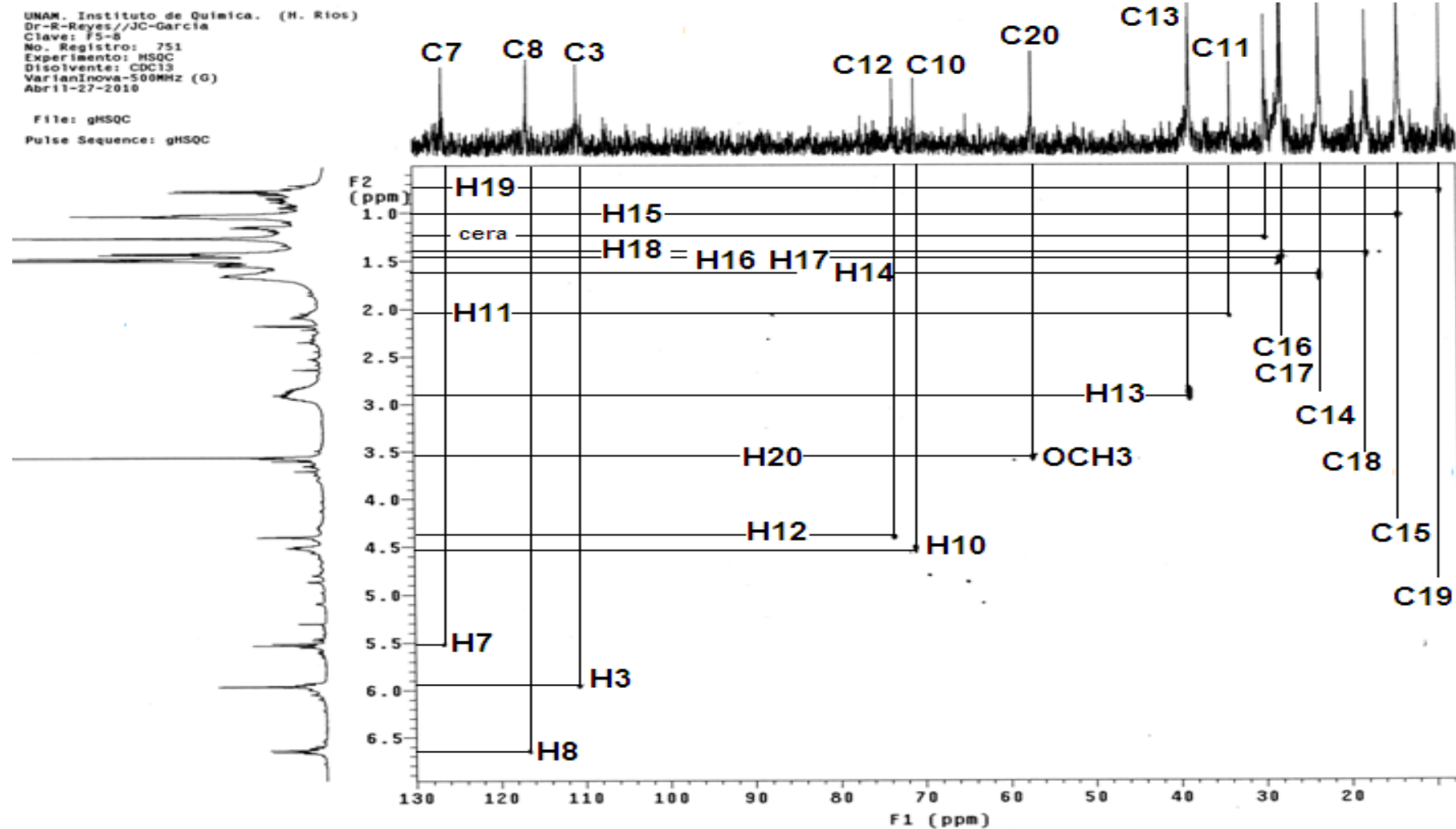
File: Carbon
Pulse Sequence: s2pul



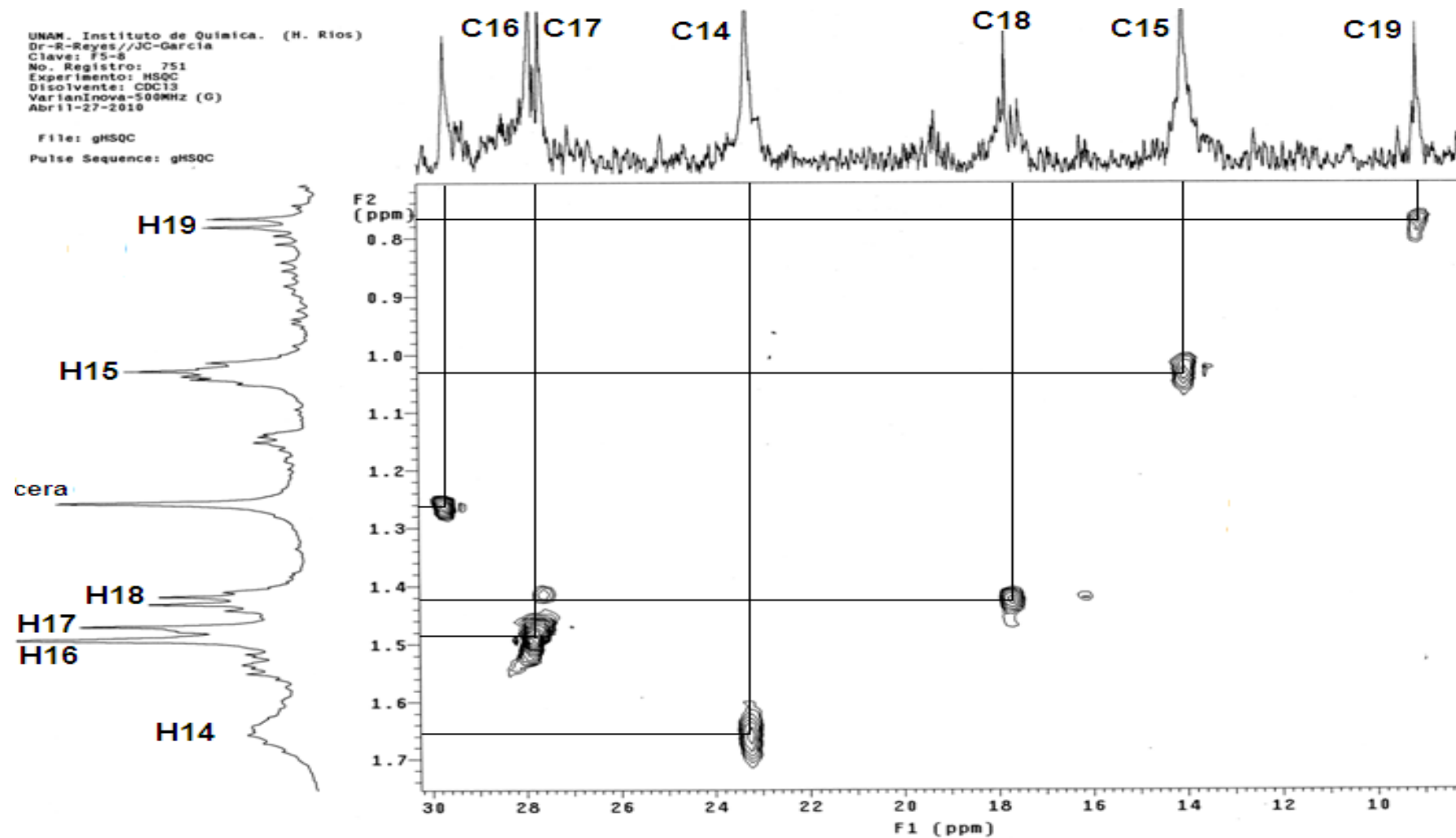
Espectro 25. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C del 12-Metoxi(-)-Calanólido B. (10-40 ppm).



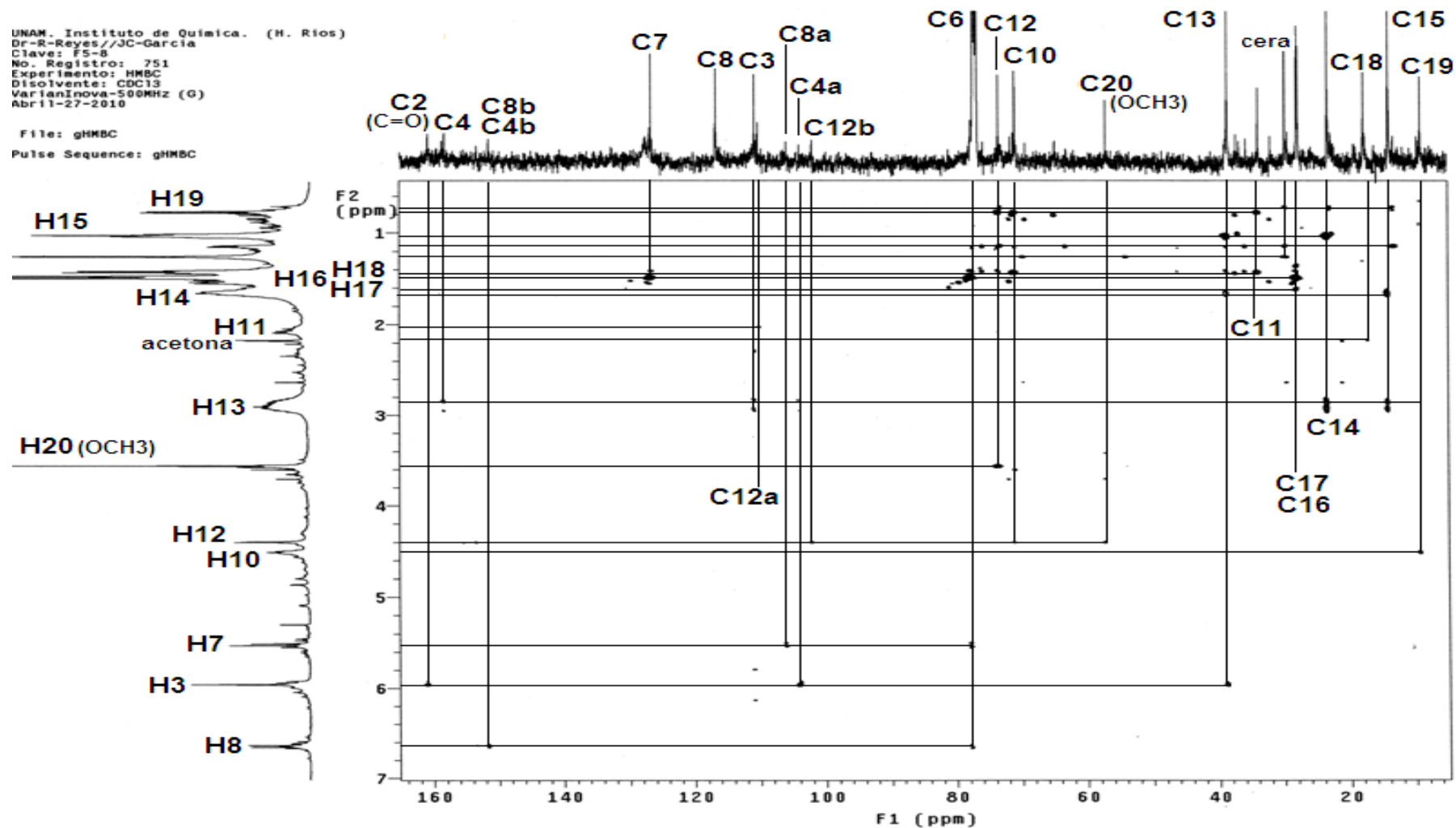
Espectro 26. Espectro de RMN ^{13}C –Experimento DEPT- del 12-Metoxi(-)-Calanolido B.



Espectro 27. Espectro de RMN ¹H-¹³C -Experimento HSQC-del 12-Metoxi(-)-Calanólido B.



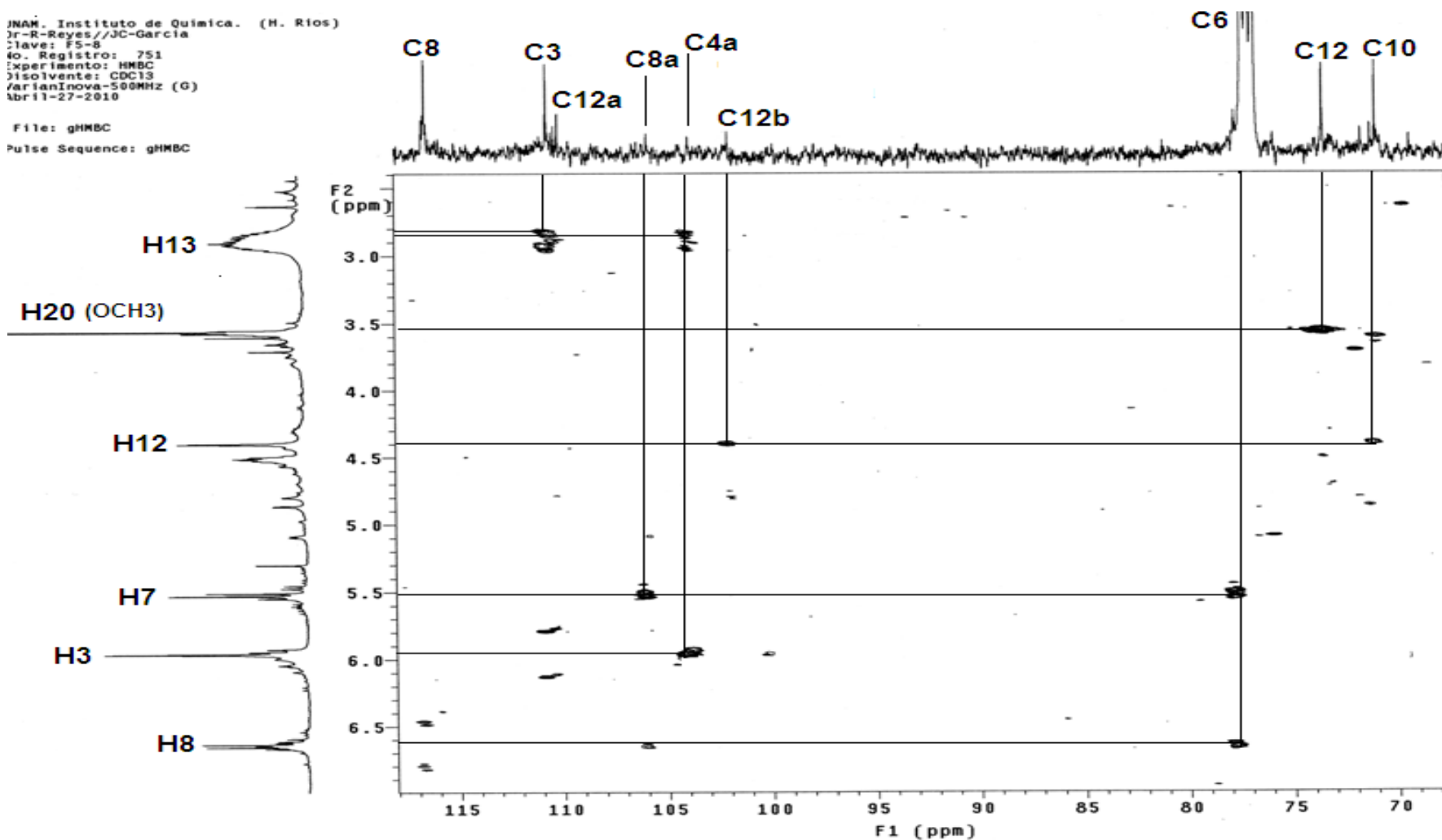
Espectro 28. Ampliación del espectro de RMN ¹H- ¹³C -Experimento HSQC - del 12-Metoxi(-)-Calanolido B (0-30 ppm).



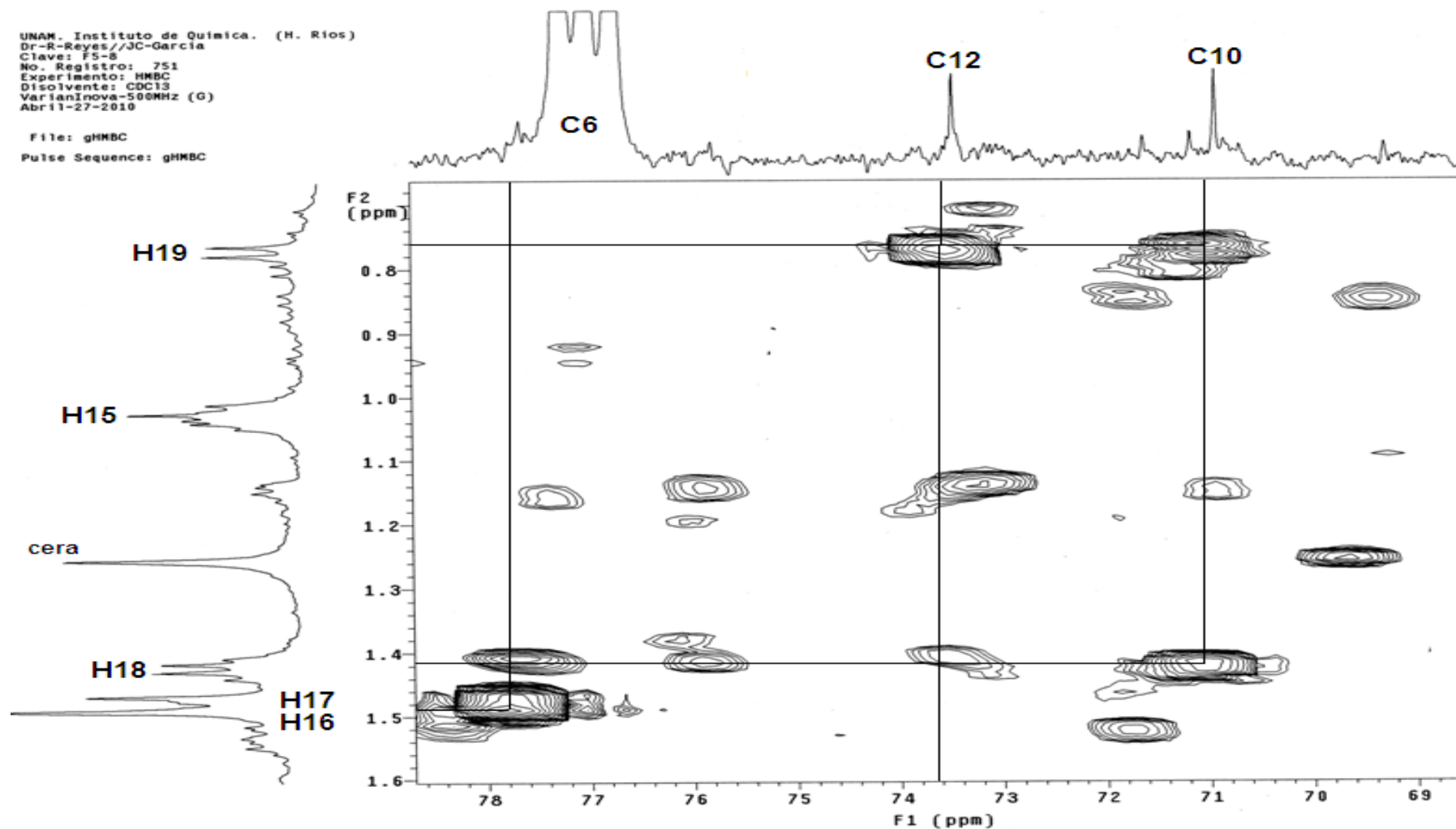
Espectro 29. Espectro de RMN ¹H- ¹³C –Experimento HMBC- del 12-Metoxi(-)-Calanólido B.

JNAM. Instituto de Química. (H. Rios)
Jr-R-Reyes/JC-García
Clave: F5-8
No. Registro: 751
Experimento: HMBC
Disolvente: CDCl₃
VarianInova-500MHz (G)
Abril-27-2010

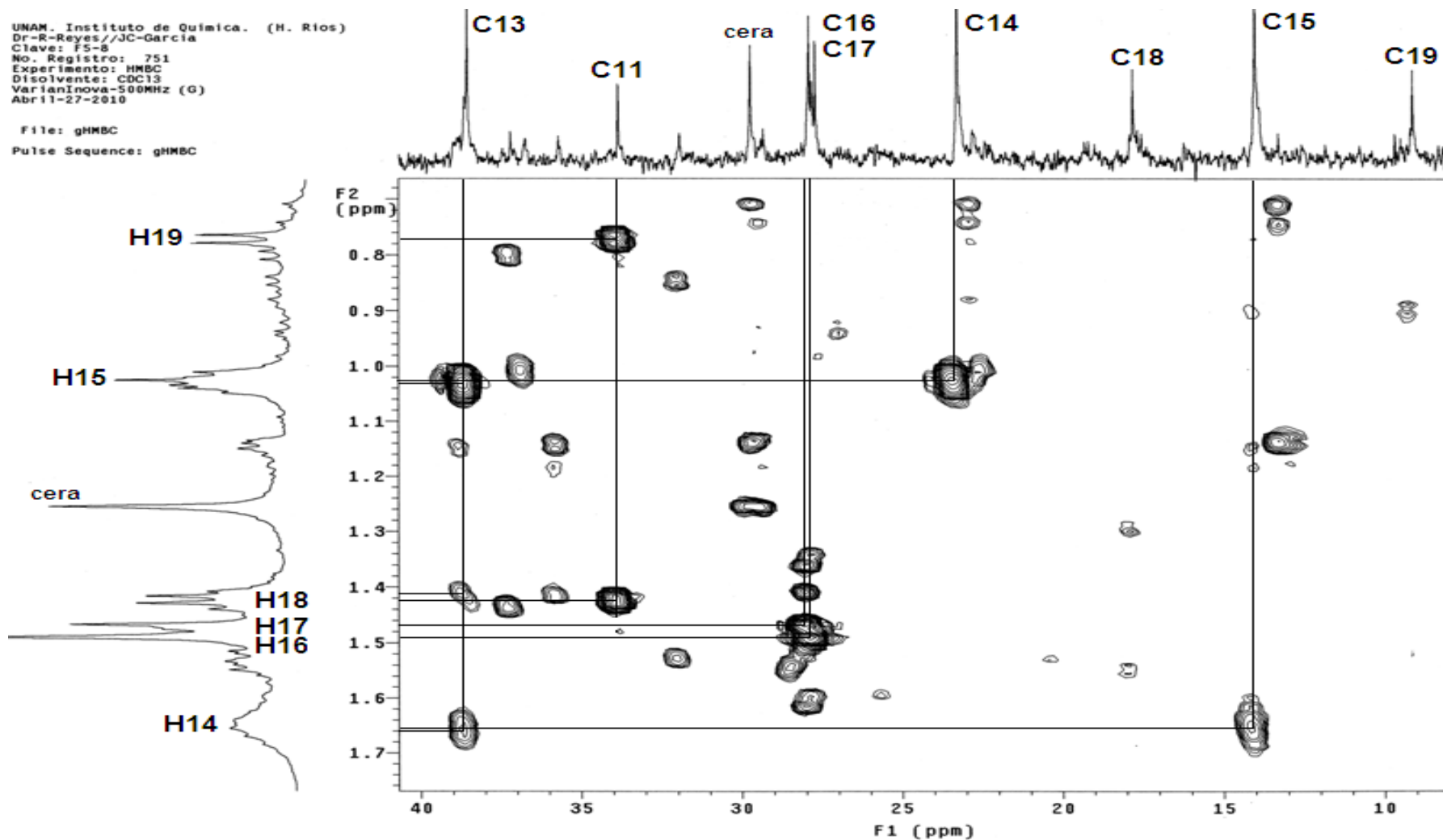
File: gHMBC
Pulse Sequence: gHMBC



Espectro 31. Ampliación de RMN ¹H-¹³C –Experimento HMBC- del 12-Metoxi(-)-Calanólido B (70-120 ppm).

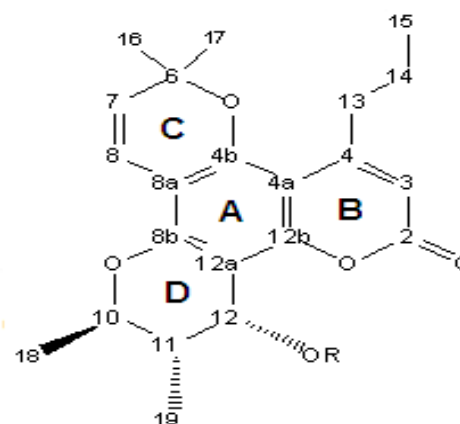


Espectro 32. Ampliación de RMN ¹H-¹³C –Experimento HMBC- del 12-Metoxi-(-)-Calanolido B (60-80 ppm).

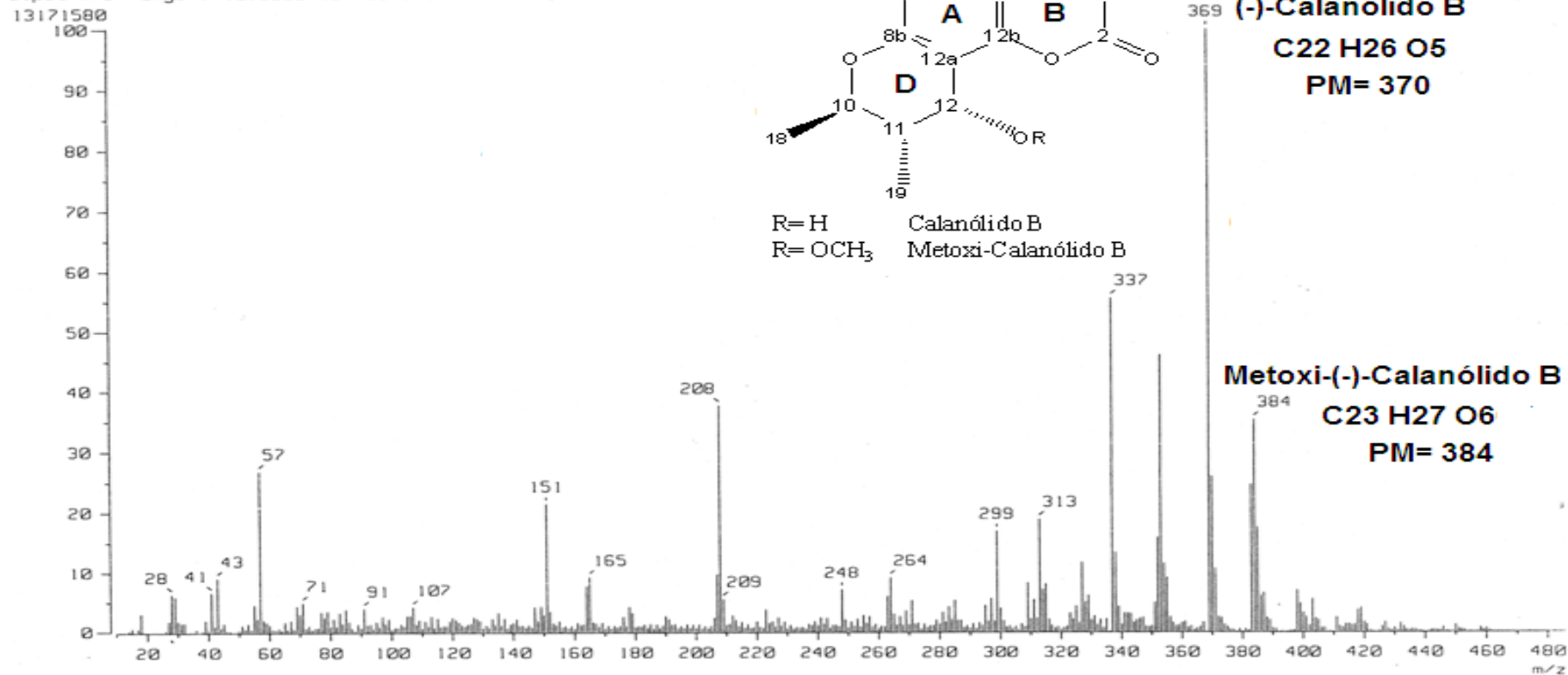


Espectro 30. Ampliación de RMN ¹H-¹³C –Experimento HMBC- del 12-Metoxi(-)-Calanolido B (0-40 ppm).

Mass Spectrum J
 Date : 06-May-2010 18:00
 Sample : 303 2EI F 5-B JeolFX505HR
 Operator : Javier-Perez
 Method : Direct
 Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 Time : 1.07 min Scan# : (24,33)
 Peak : m/z 369.0000 Int. : 1252.52
 Output m/z range : 10.0000 to 485.8754
 Cut Level : 0.00 %

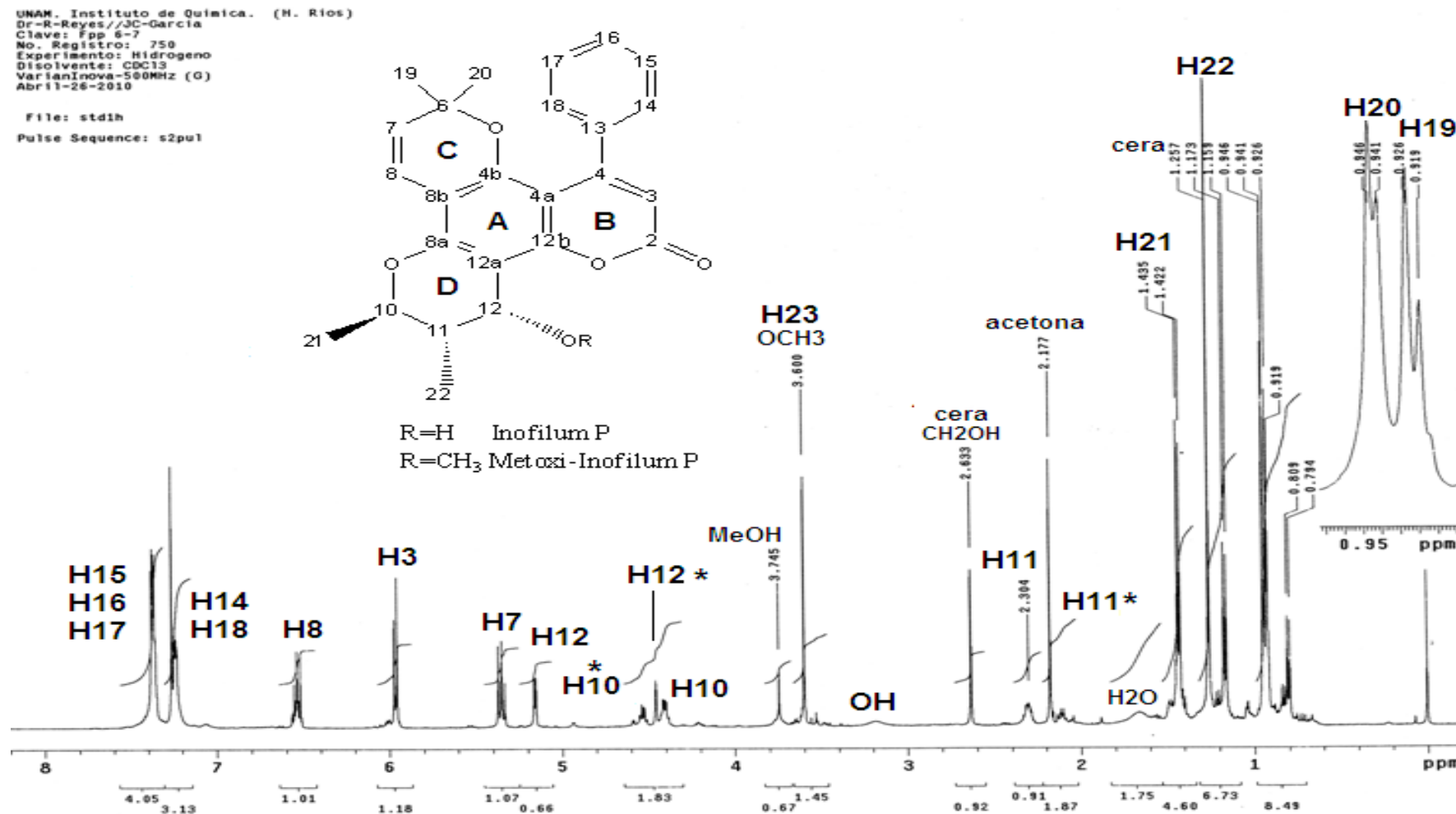


R= H Calanolido B
 R= OCH₃ Metoxi-Calanólido B

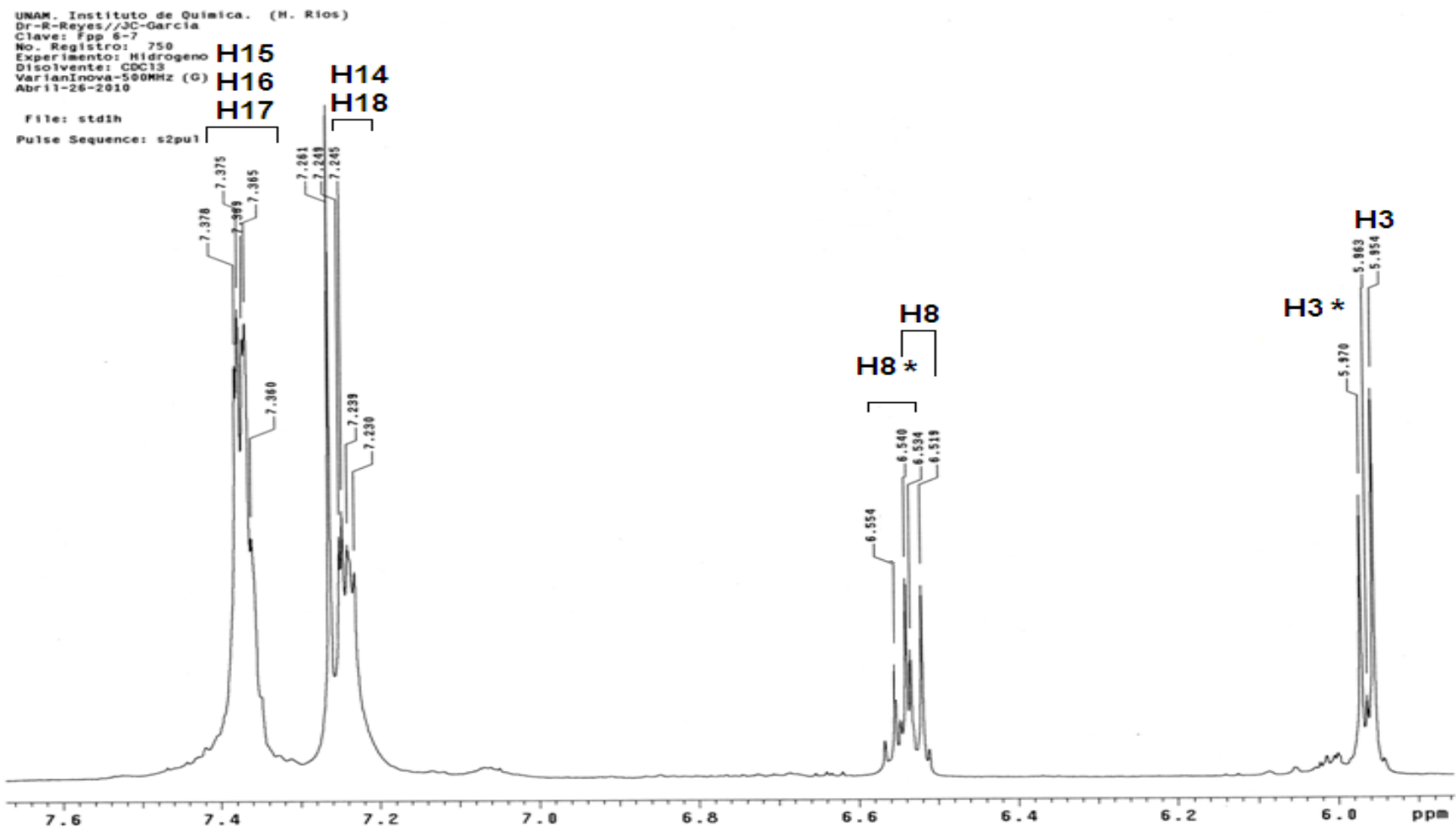


Espectro 33. Espectro de Masas del 12-Metoxi(-)-Calanolido B.

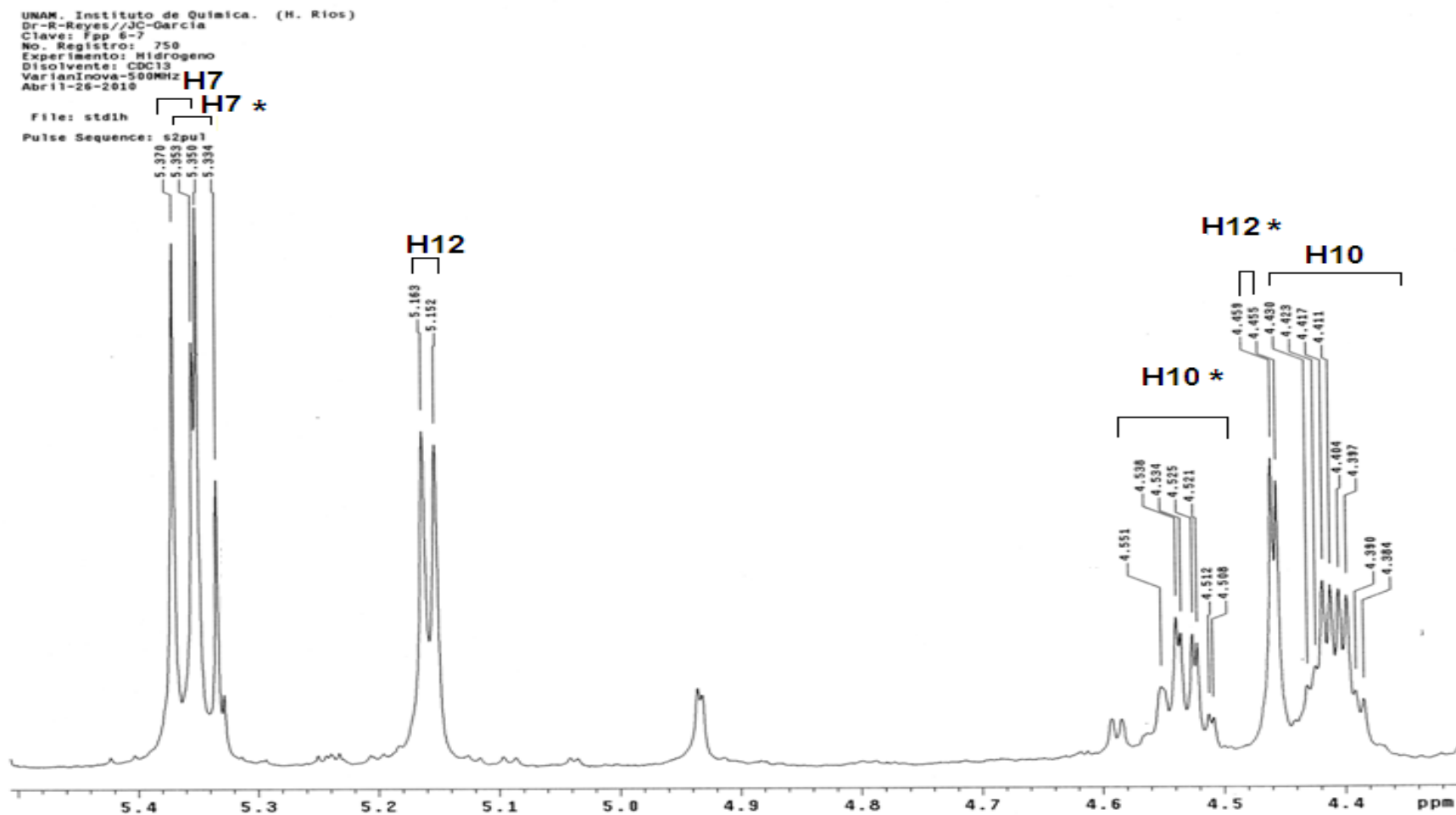
(+)-INOFILUM P
Y
12-METOXI-(+)-INOFILUM P



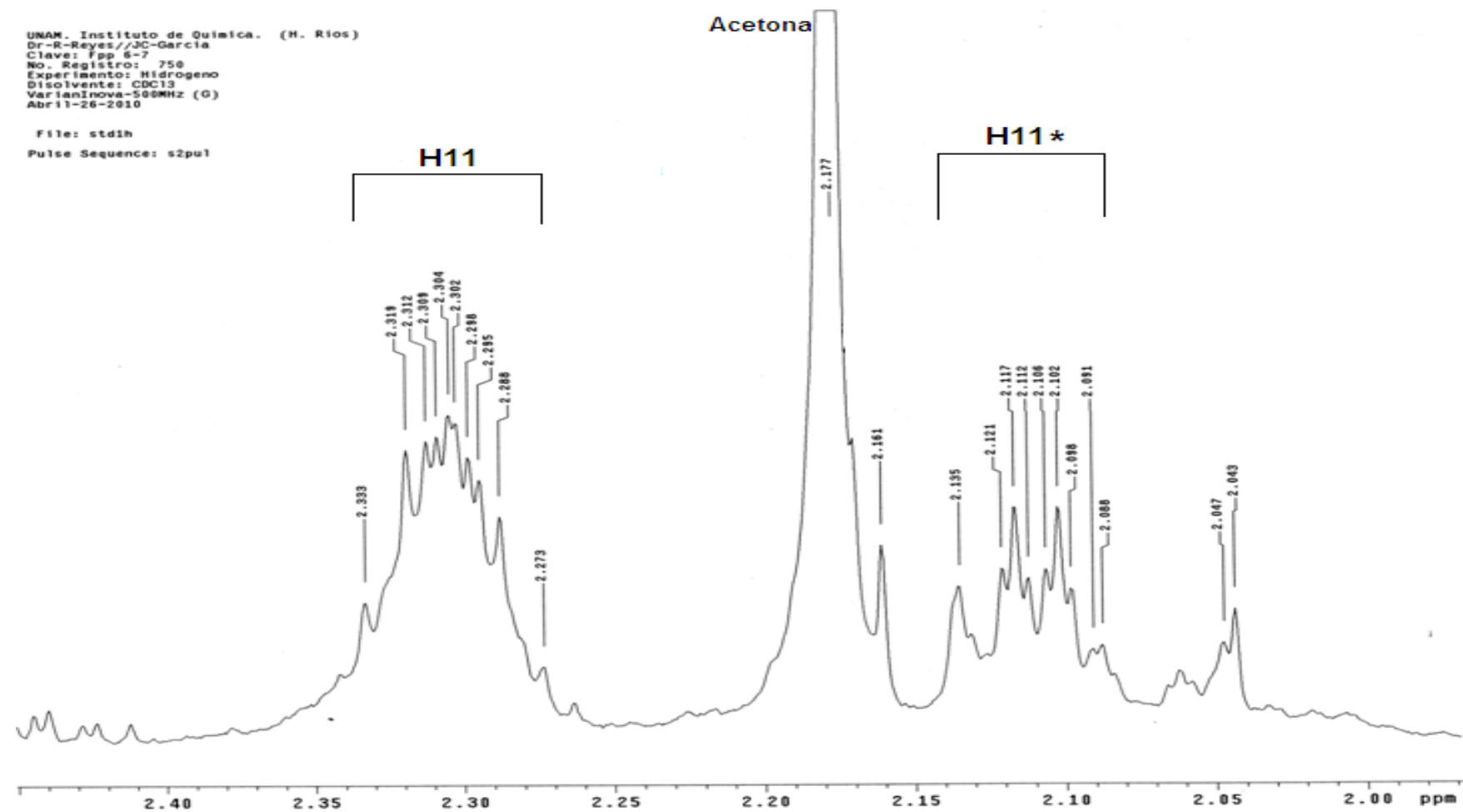
Espectro 34. Espectro de RMN ¹H del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P*.



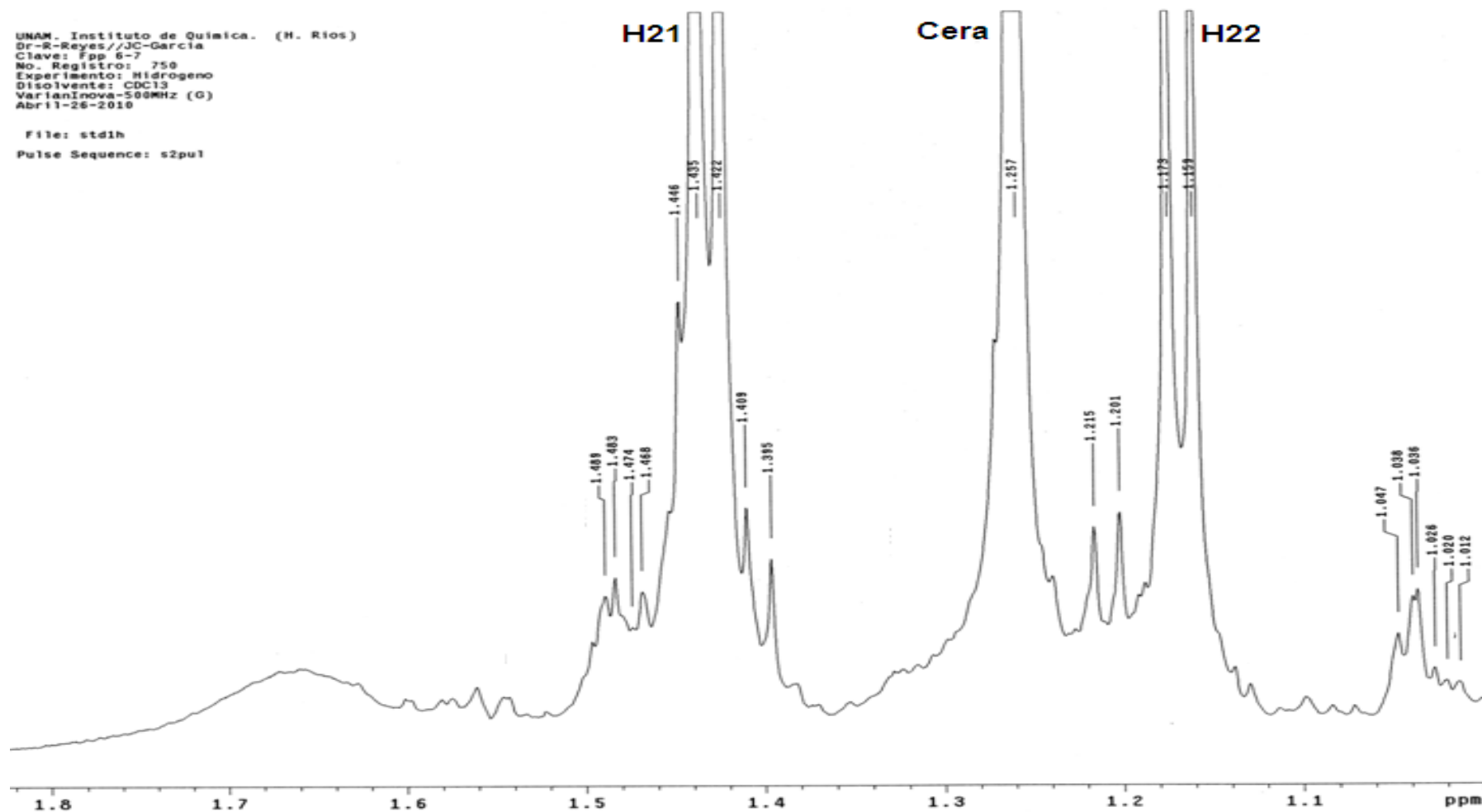
Espectro 32. Ampliación del espectro de RMN ¹H del (+)- Inofilum P y 12- Metoxi-(+)-Inofilum P* (6-8 ppm).



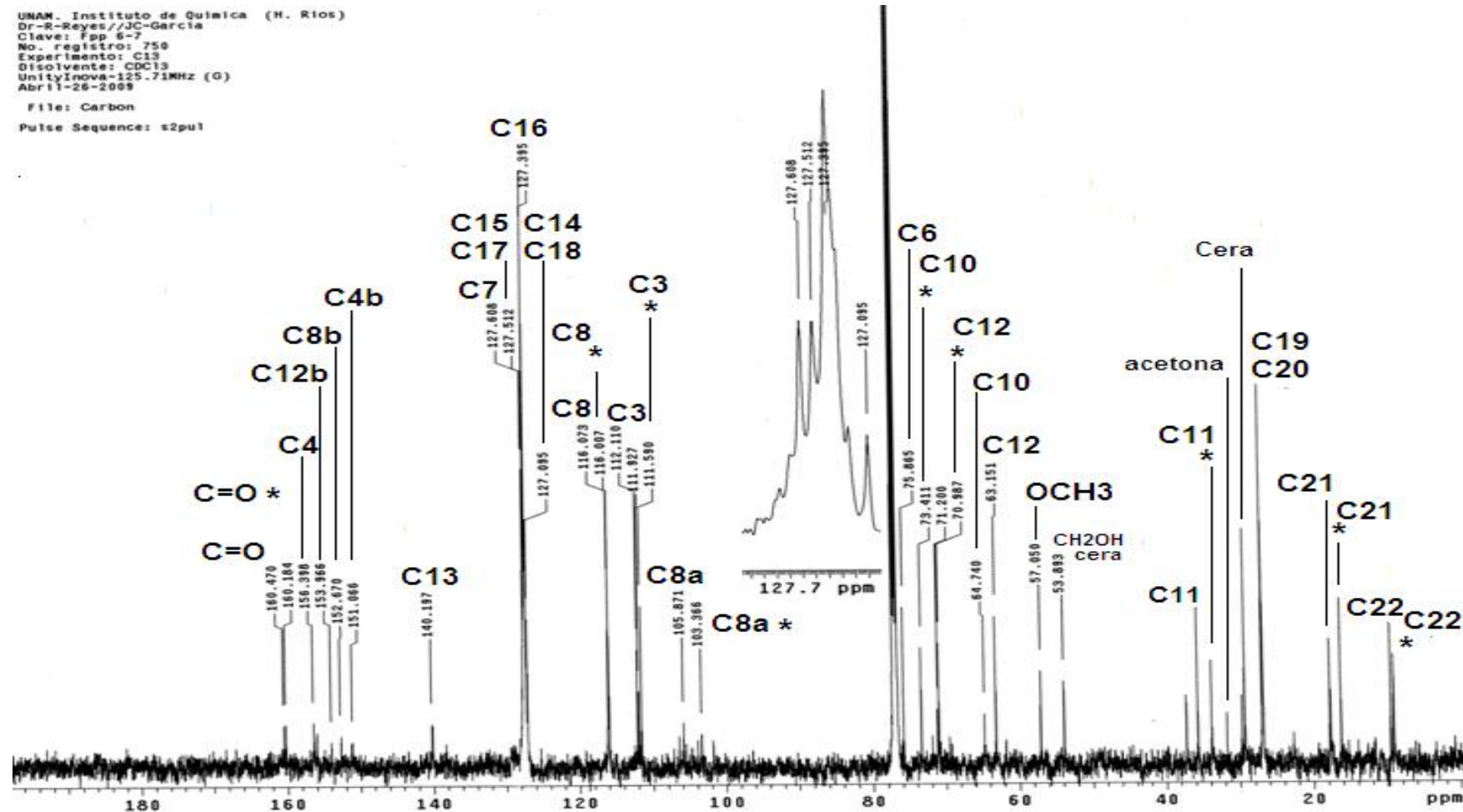
Espectro 33. Ampliación del espectro de RMN ¹H del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P* (4-6 ppm).



Espectro 34. Ampliación del espectro de RMN ^1H del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P* (2-4 ppm).



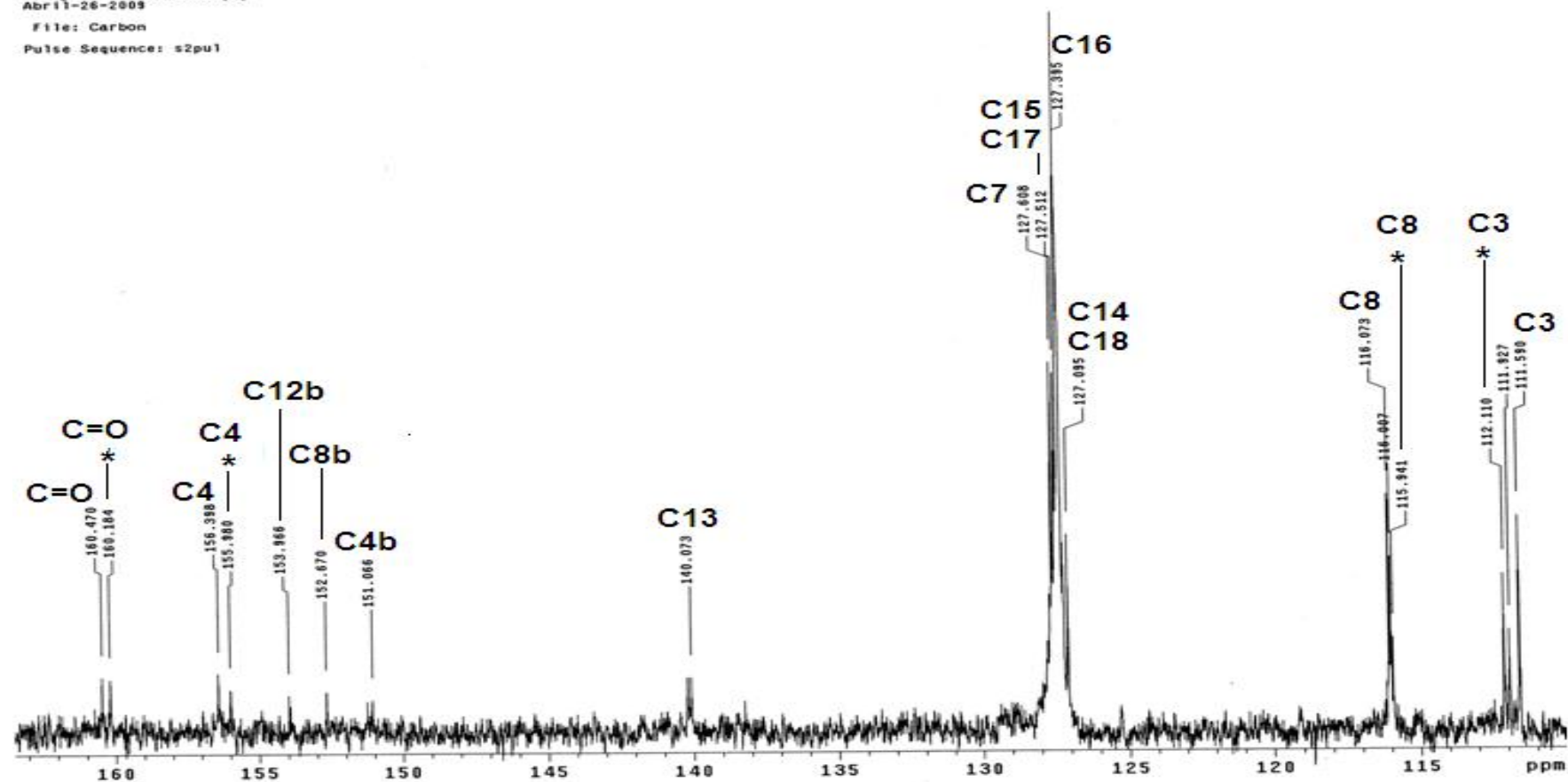
Espectro 35. Ampliación del espectro de RMN ^1H del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P (0-2 ppm).



Espectro 36. Espectro de RMN ^{13}C del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P*.

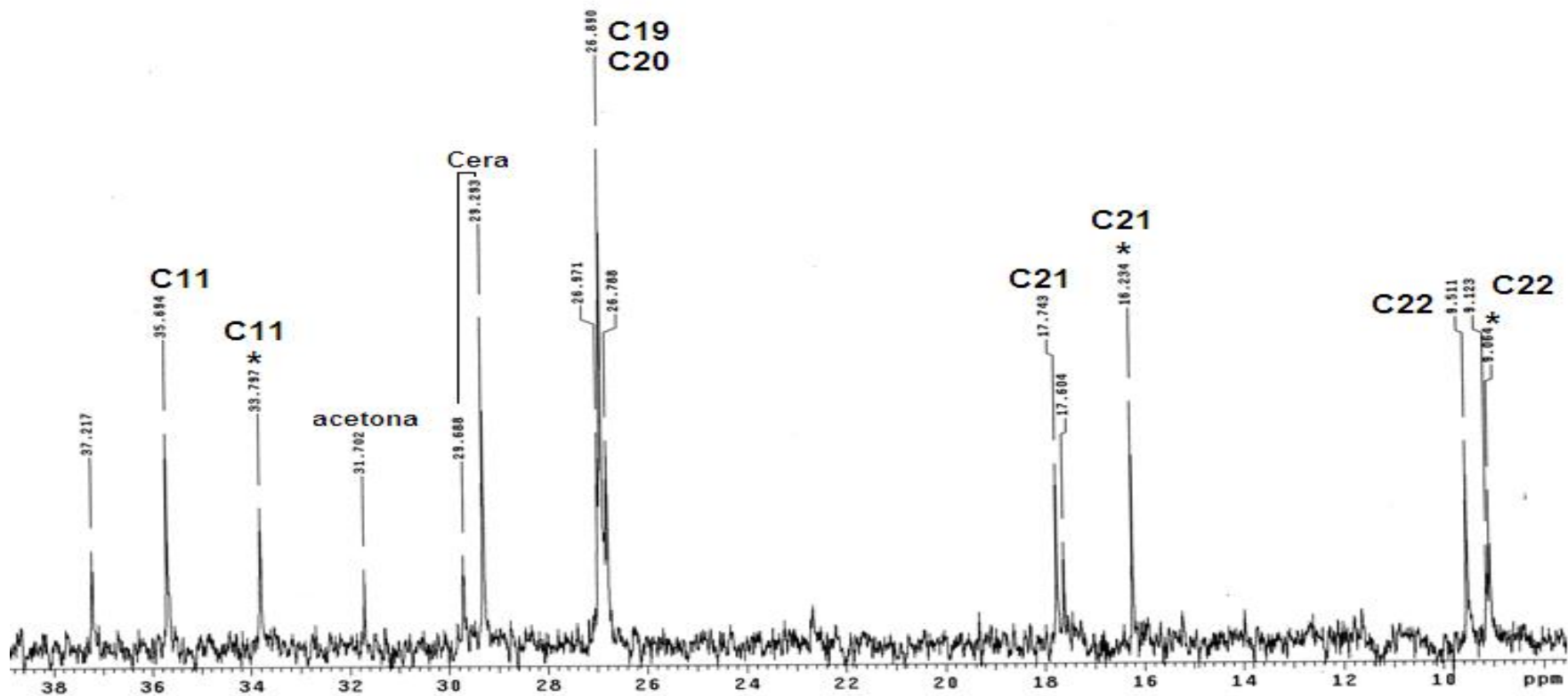
UNAM, Instituto de Química (H. Ríos)
 Dr-R-Reyes//JC-García
 Clave: fpp 6-7
 No. registro: 750
 Experimento: C13
 Disolvente: CDCl₃
 UnityInova-125.71MHz (G)
 Abril-26-2009

File: Carbon
 Pulse Sequence: s2pu1

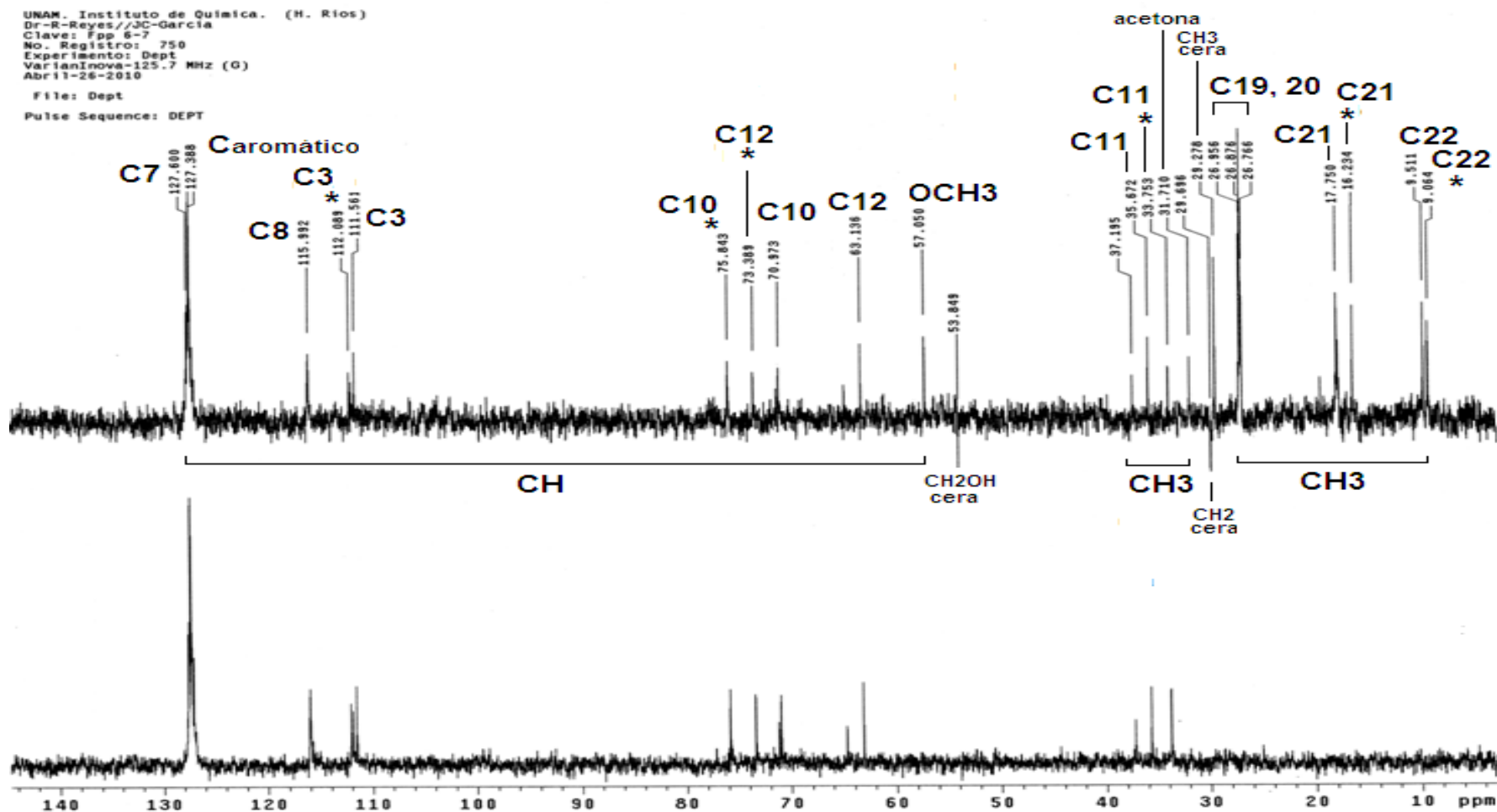


Espectro 37. Ampliación del espectro de RMN ¹³C del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P* (100-170 ppm).

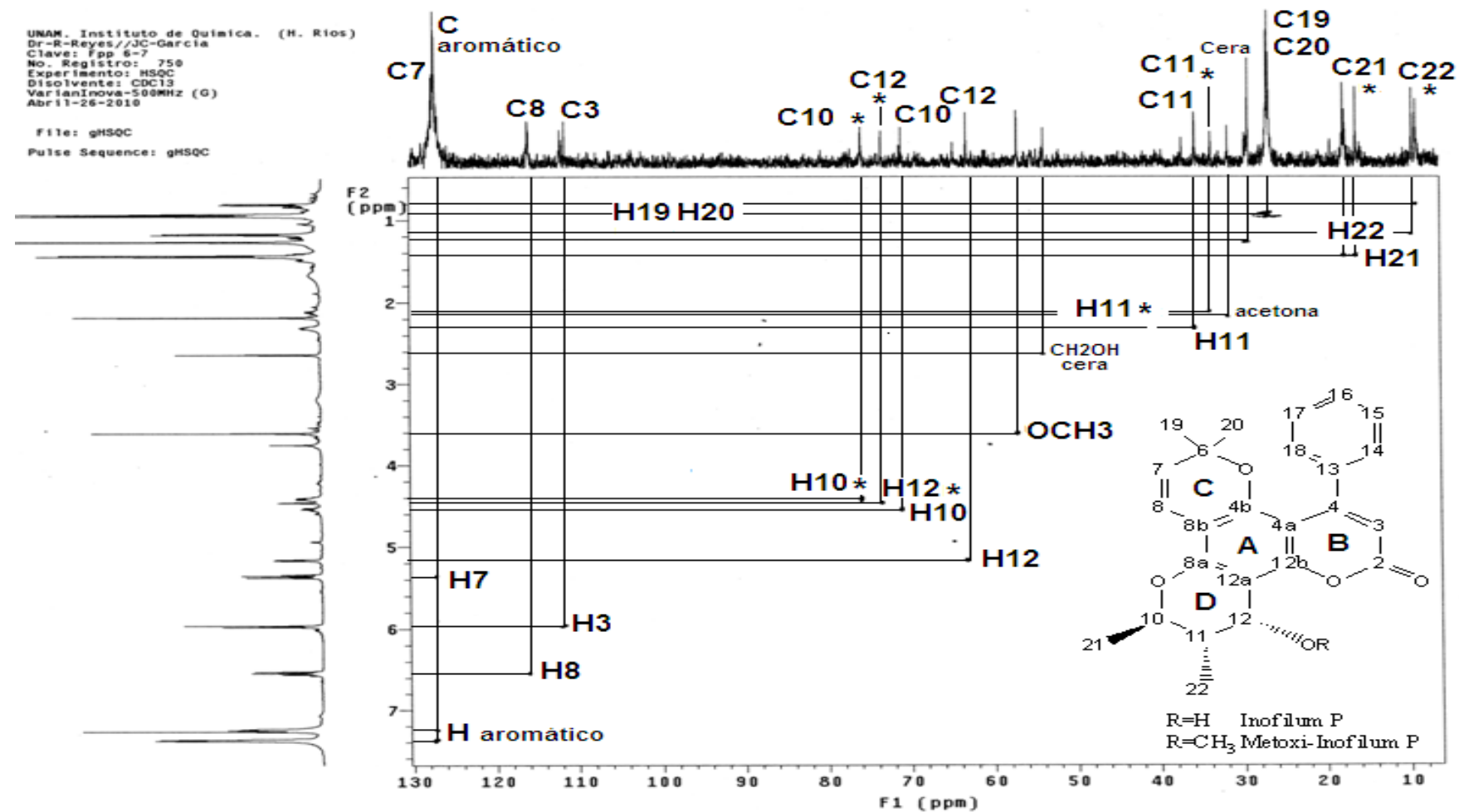
UNAM. Instituto de Química (M. K105)
 Dr.-R-Reyes//JC-García
 Clave: Fpp 6-7
 No. registro: 750
 Experimento: C13
 Disolvente: CDC13
 UnityInova-125.71MHz (G)
 Abril-26-2008
 File: Carbon
 Pulse Sequence: s2pu1



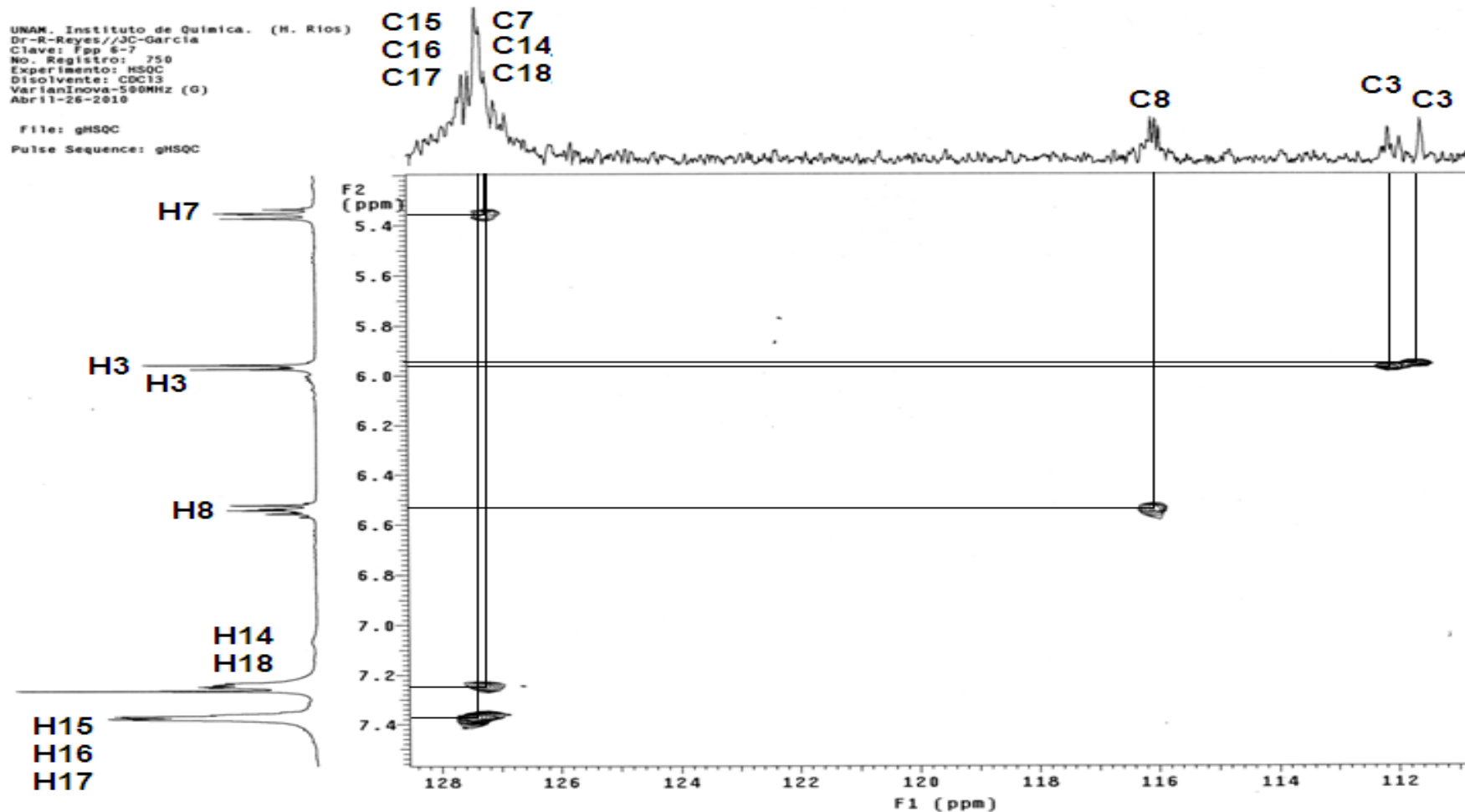
Espectro 38. Ampliación del espectro de RMN ¹³C del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P* (0-40 ppm).



Espectro 39. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C –Experimento DEPT- del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P*.



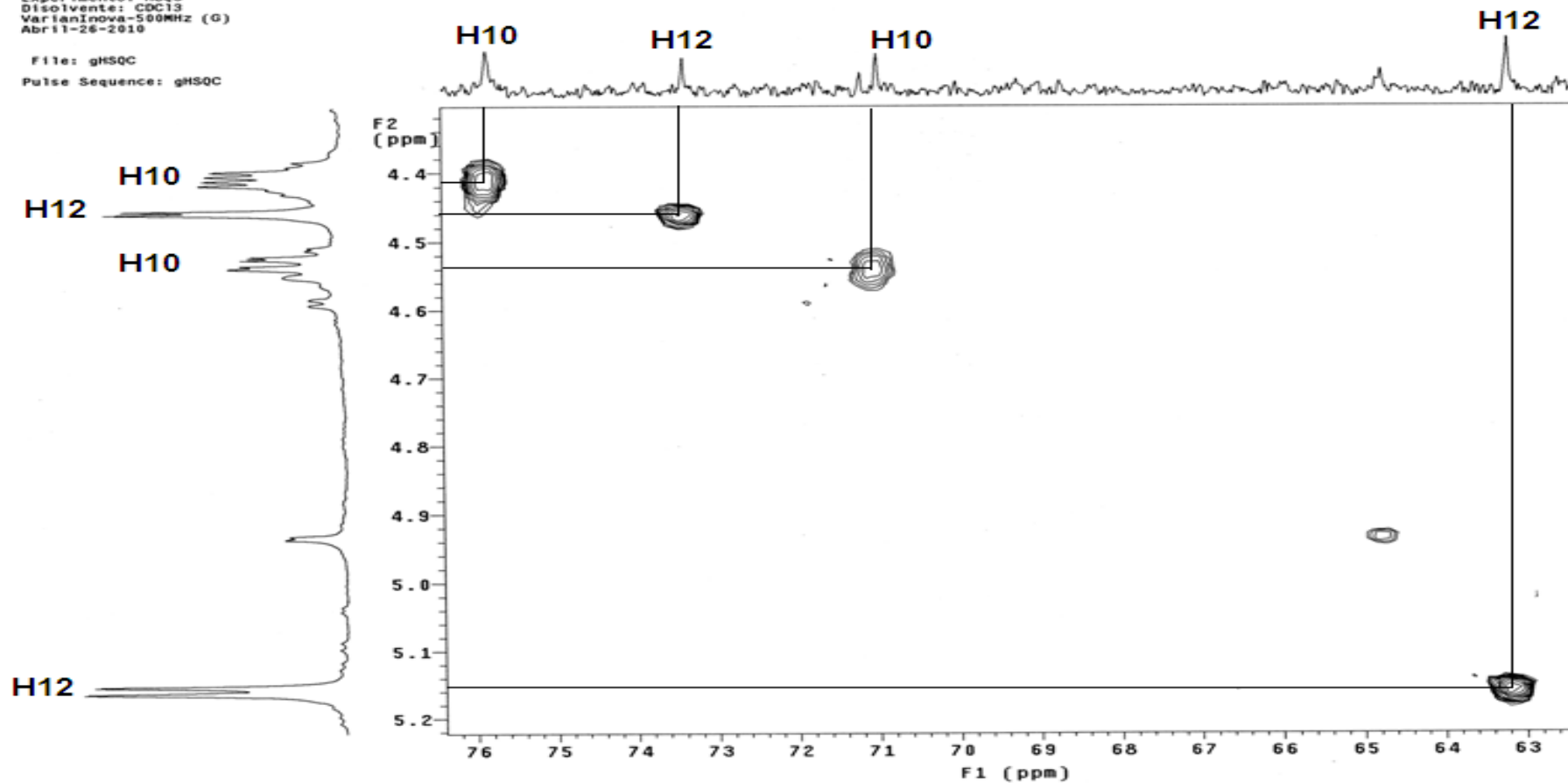
Espectro 40. Ampliación de RMN ¹H-¹³C –Experimento HSQC del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P*.



Espectro 41. Ampliación de RMN ¹H-¹³C –Experimento HSQC del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P (100-130 ppm).

UNAM. Instituto de Química. (H. Ríos)
 Dr-R-Reyes//JC-García
 Clave: Fpp 6-7
 No. Registro: 750
 Experimento: HSQC
 Disolvente: CDCl₃
 VarianInova-500MHz (G)
 Abril-26-2010

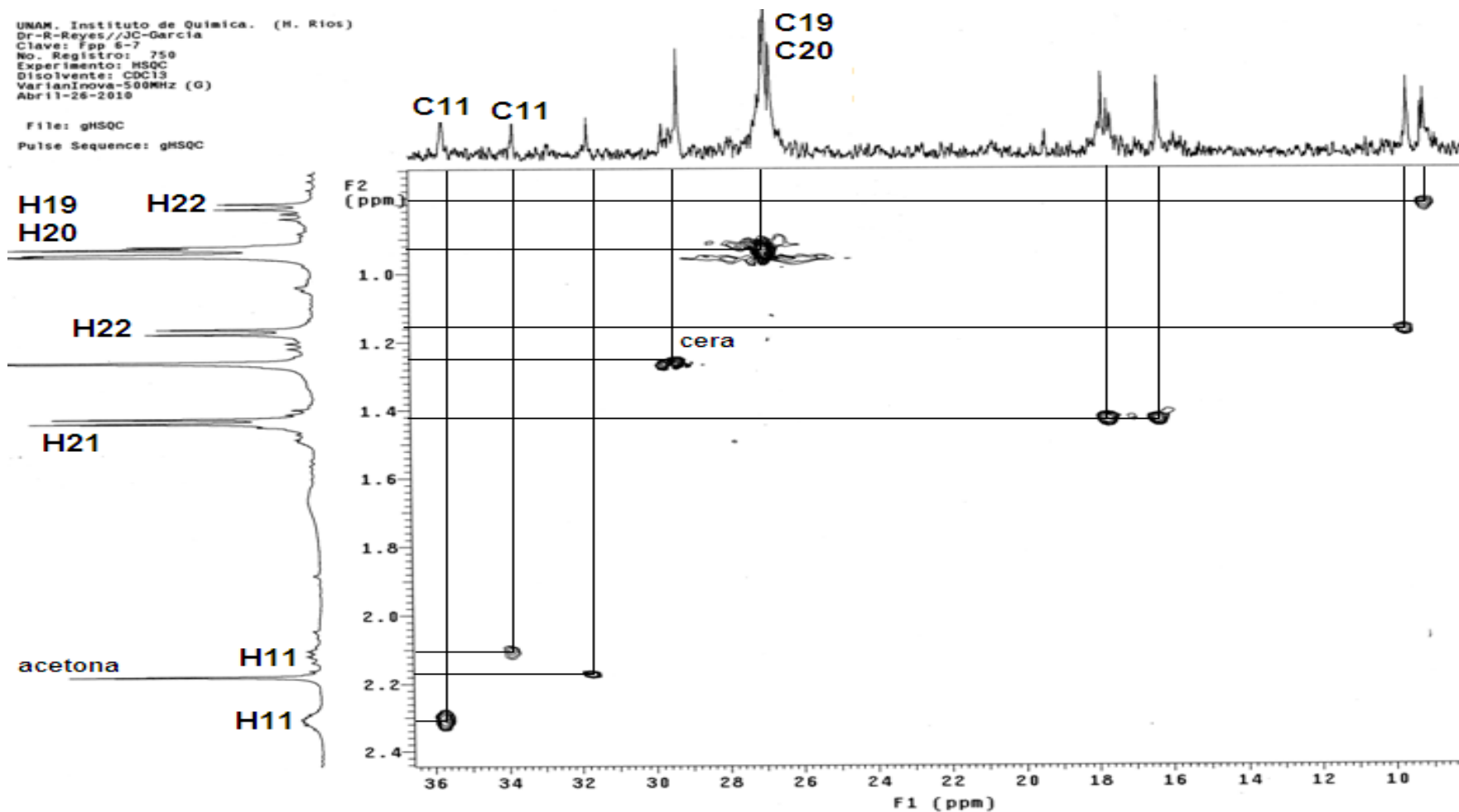
File: gHSQC
 Pulse Sequence: gHSQC



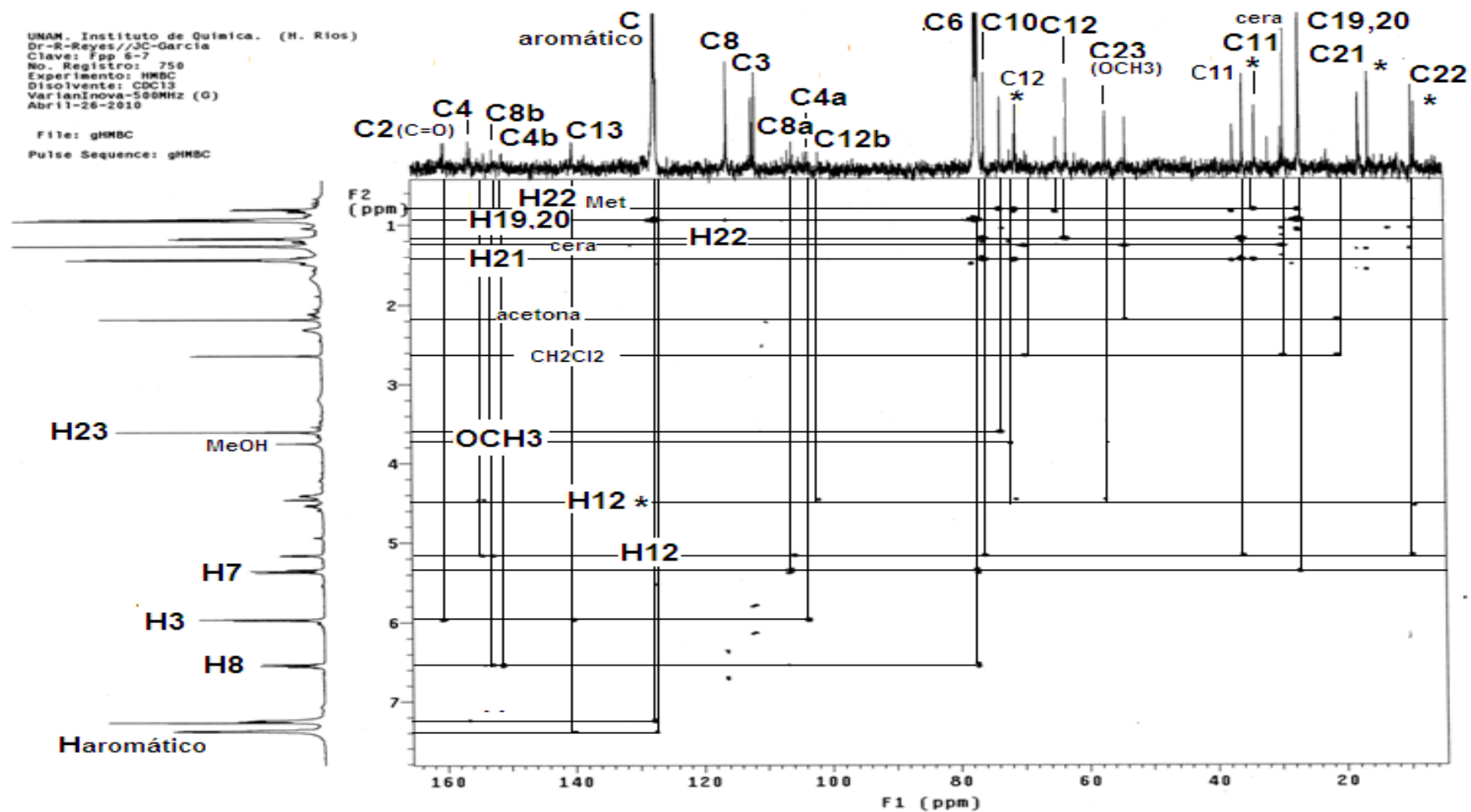
Espectro 42. Ampliación de RMN ¹H-¹³C –Experimento HSQC del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P (60-80 ppm).

UNAM, Instituto de Química. (M. Ríos)
 Dr-R-Reyes/JC-García
 Clave: Fpp 6-7
 No. Registro: 750
 Experimento: HSQC
 Disolvente: CDCl₃
 VarianInova-500MHz (G)
 Abril-26-2018

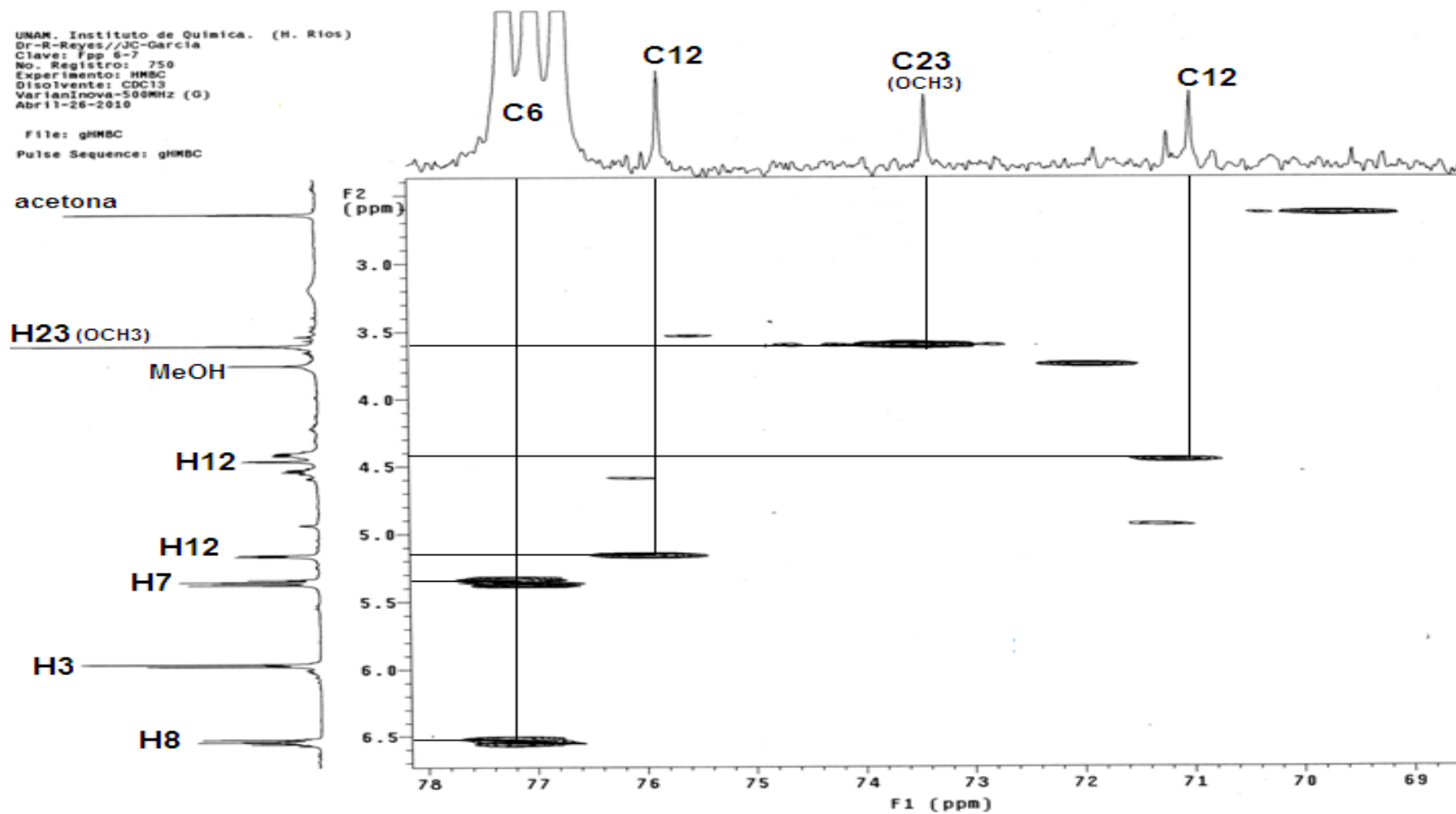
File: gHSQC
 Pulse Sequence: gHSQC



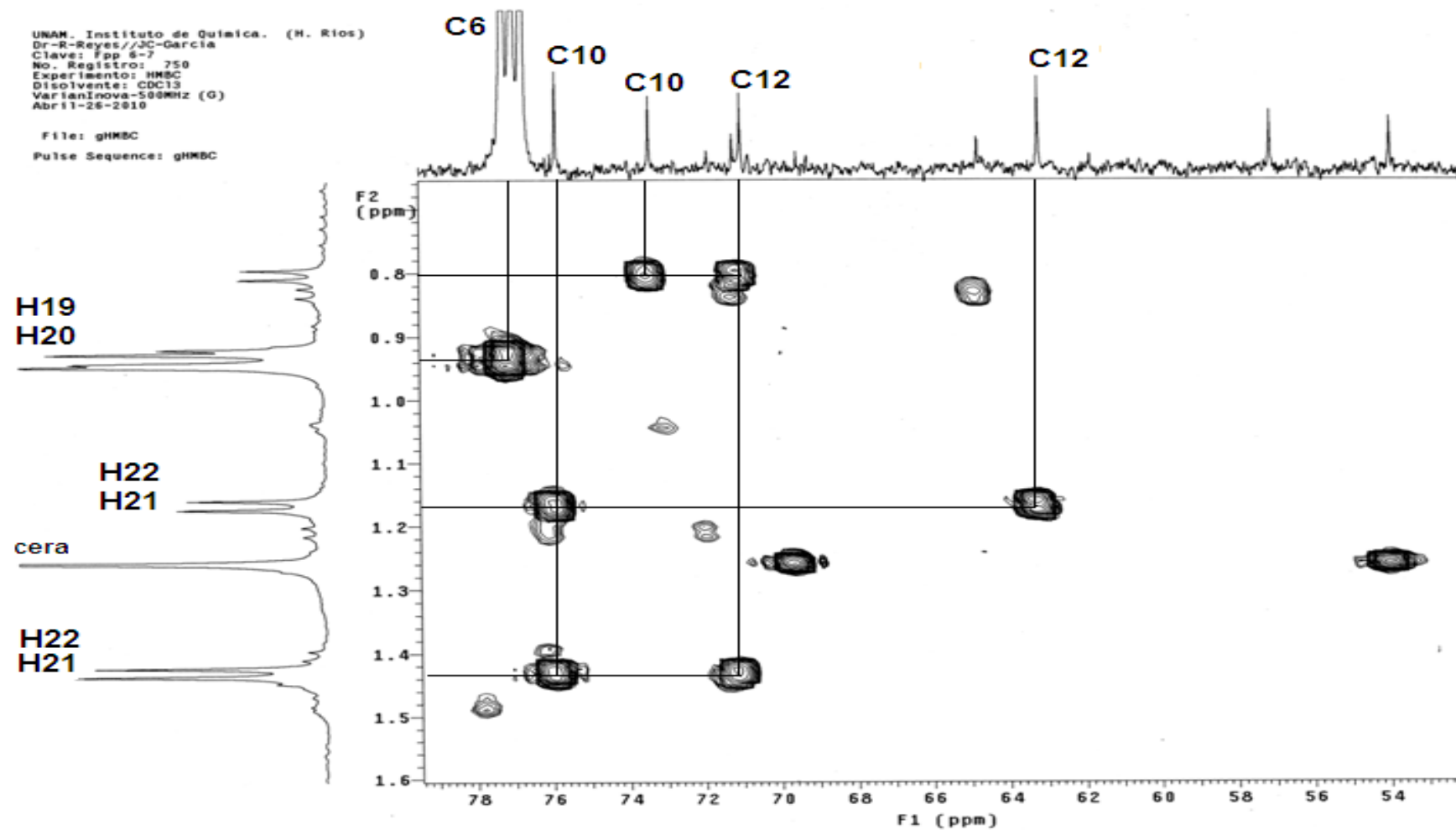
Espectro 43. Ampliación de RMN ¹H-¹³C –Experimento HSQC del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P (0-40 ppm).



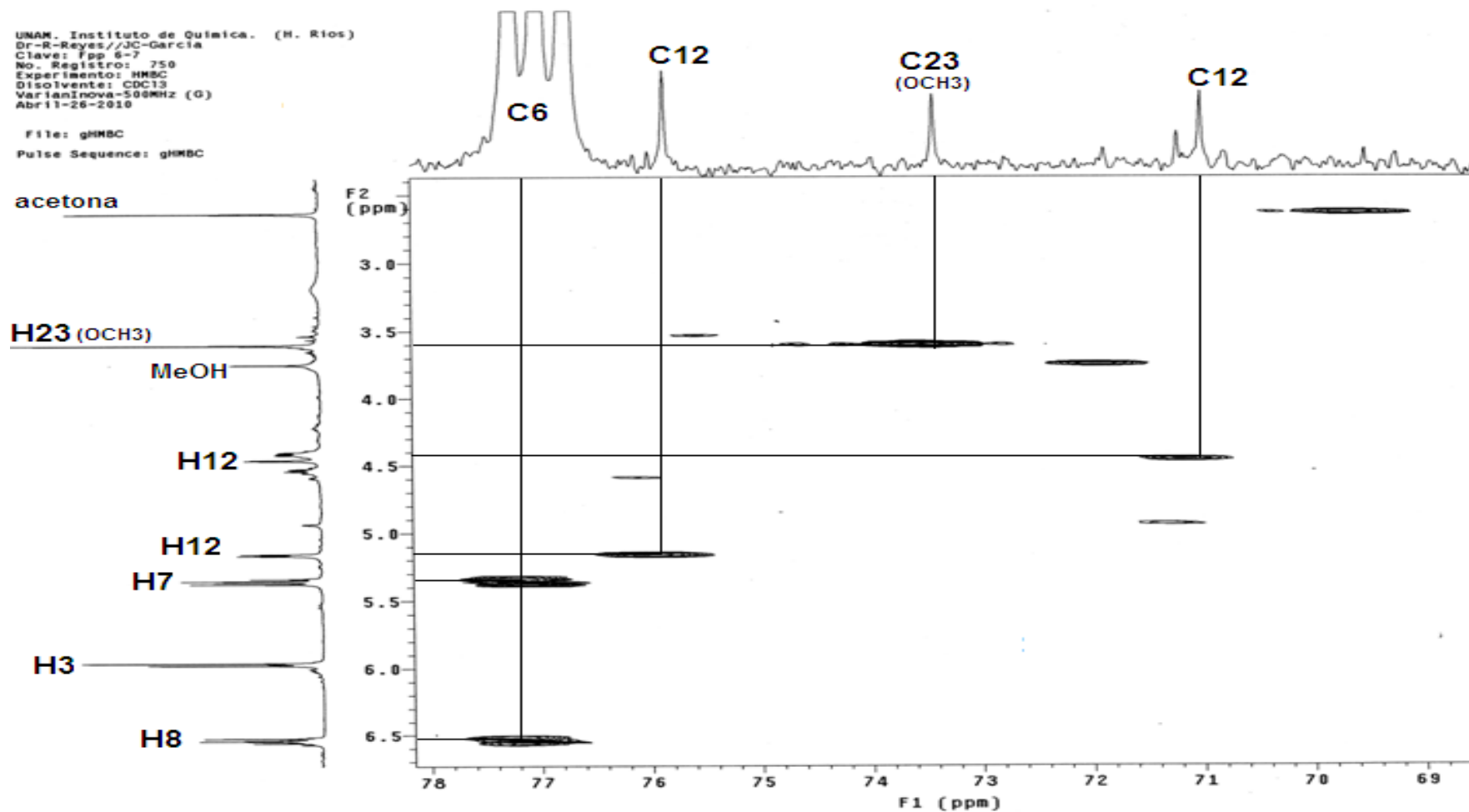
Espectro 44. Espectro de RMN ¹H-¹³C –Experimento HMBC- del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P*.



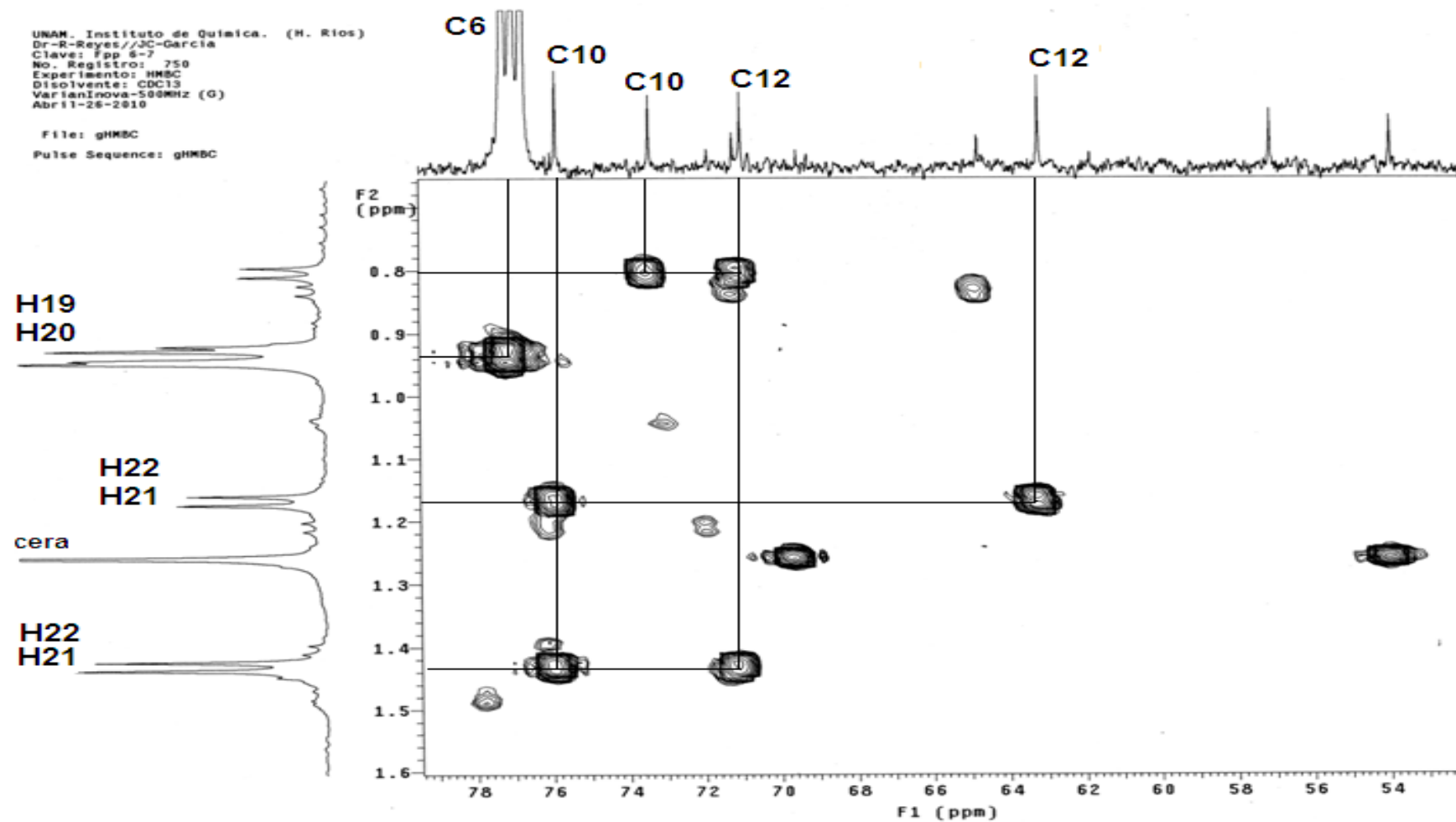
Espectro 45. Ampliación de RMN ¹H-¹³C –Experimento HMBC- del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P (60-80 ppm).



Espectro 46. Ampliación de RMN ^1H - ^{13}C –Experimento HMBC- del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P (50-80 ppm).

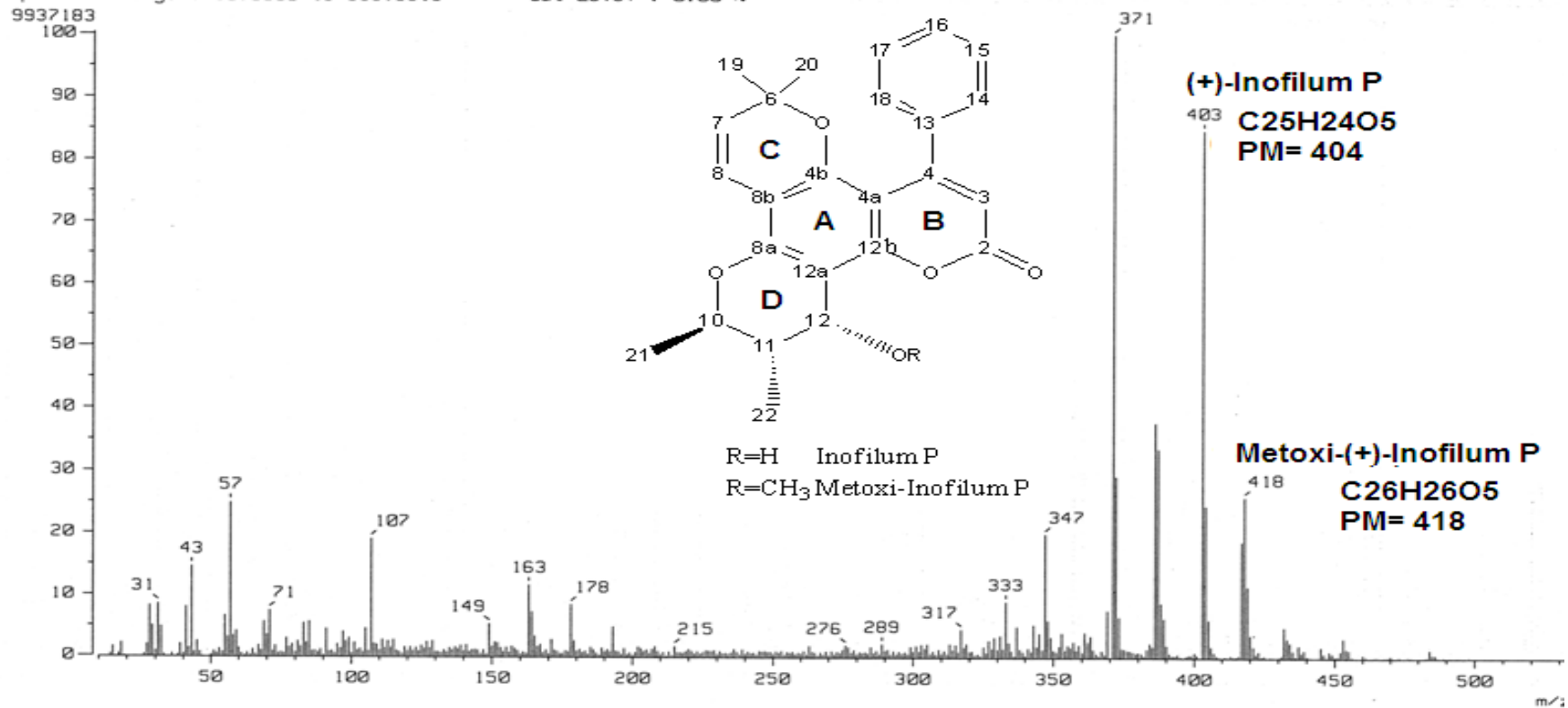


Espectro 47. Ampliación de RMN ¹H-¹³C –Experimento HMBC- del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P (60-80 ppm).



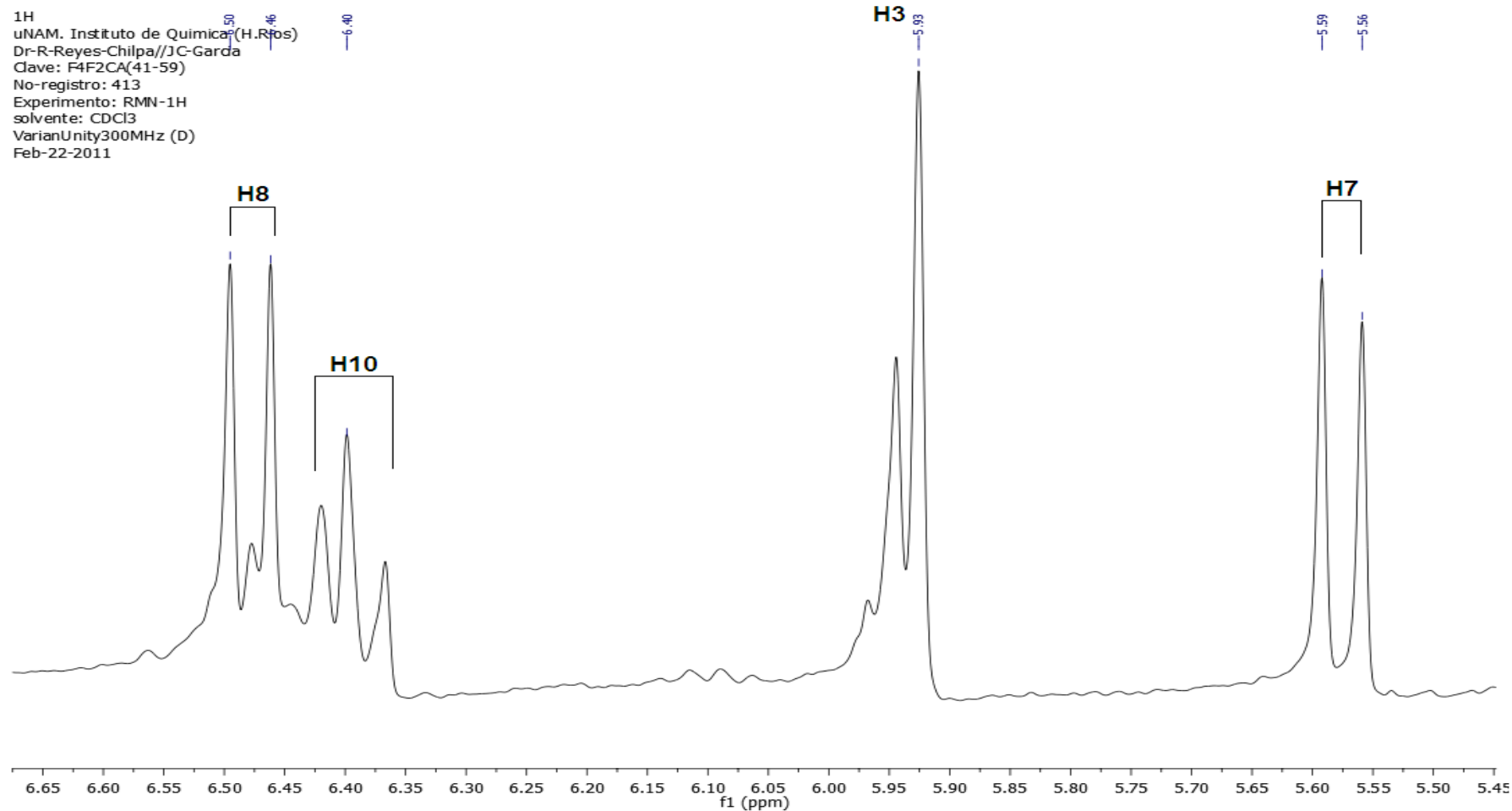
Espectro 48. Ampliación de RMN ^1H - ^{13}C –Experimento HMBC- del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P (50-80 ppm).

Mass Spectrum]
 ata : Dr-Reyes-Ricardo-029 Date : 06-May-2010 18:05
 ample: 3042EI pp 6-7 JeolFX505HR
 ote : Javier-Perez
 nlet : Direct Ion Mode : EI+
 pectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 T : 0.79 min Scan# : (17,26)
 P : m/z 371.0000 Int. : 944.95
 utput m/z range : 10.0000 to 533.9318 Cut Level : 0.00 %

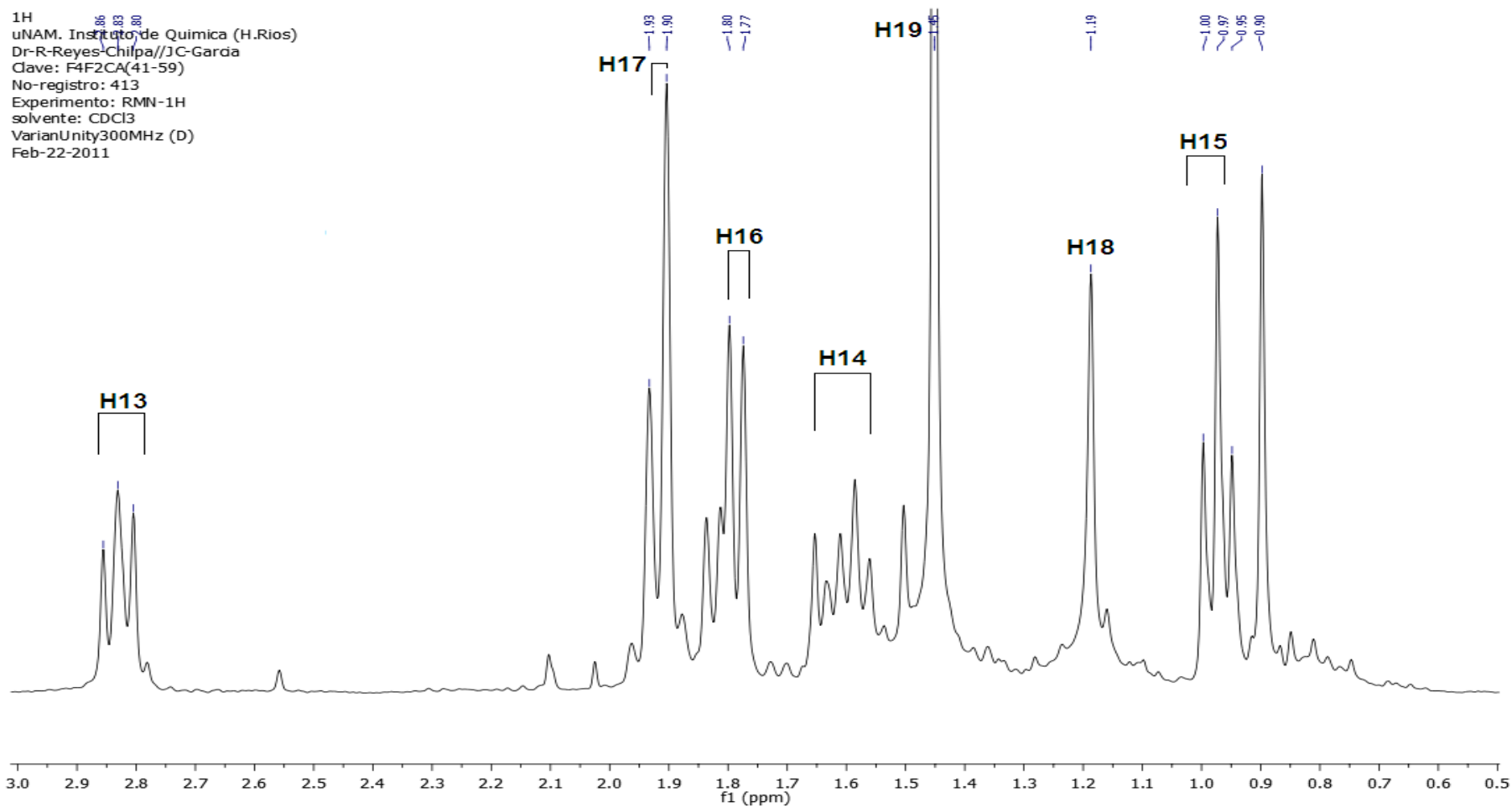


Espectro 49. Espectro de Masas del (+)- Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P

GUT-70

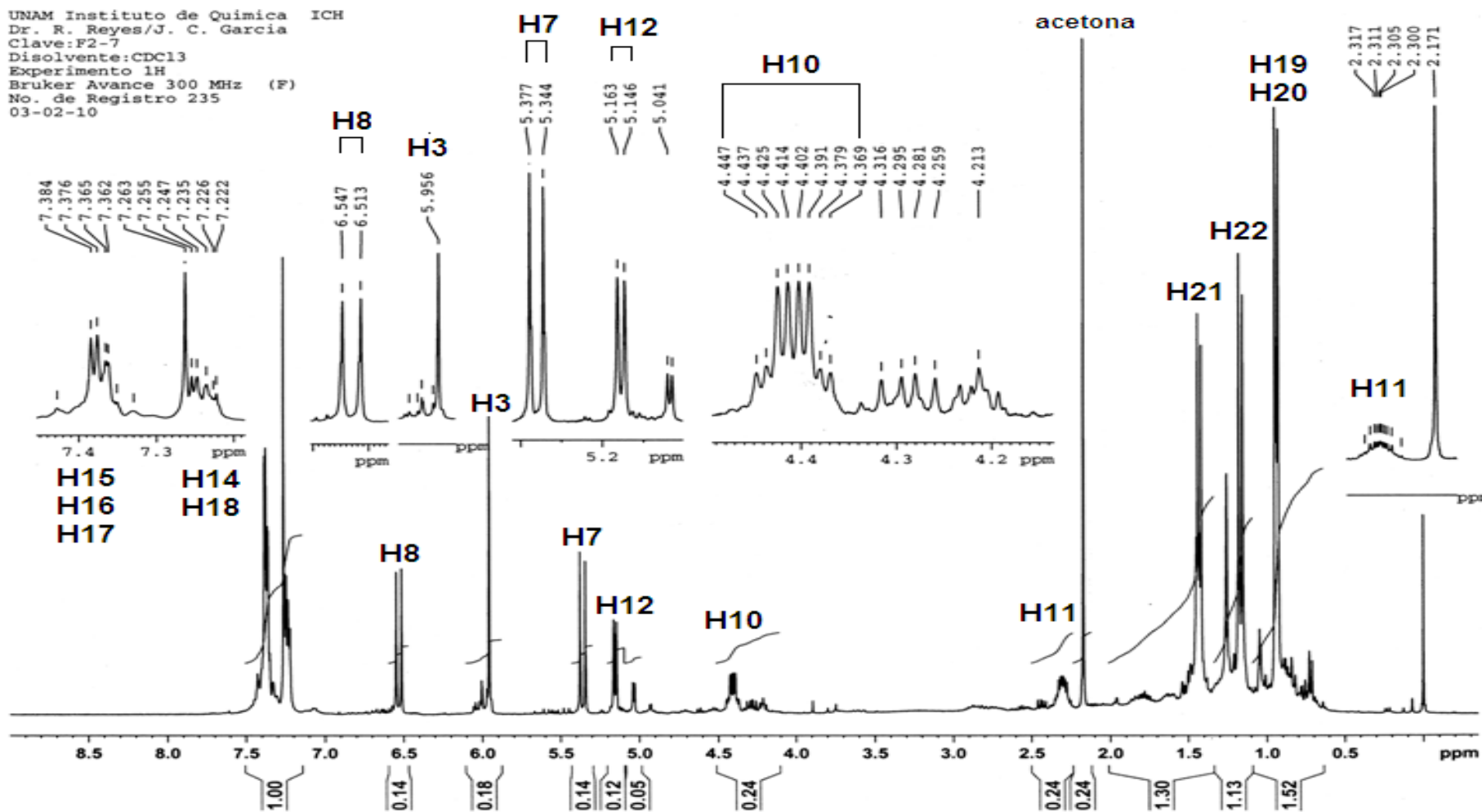


Espectro 51. Ampliación del espectro de RMN ¹H de GUT-70.

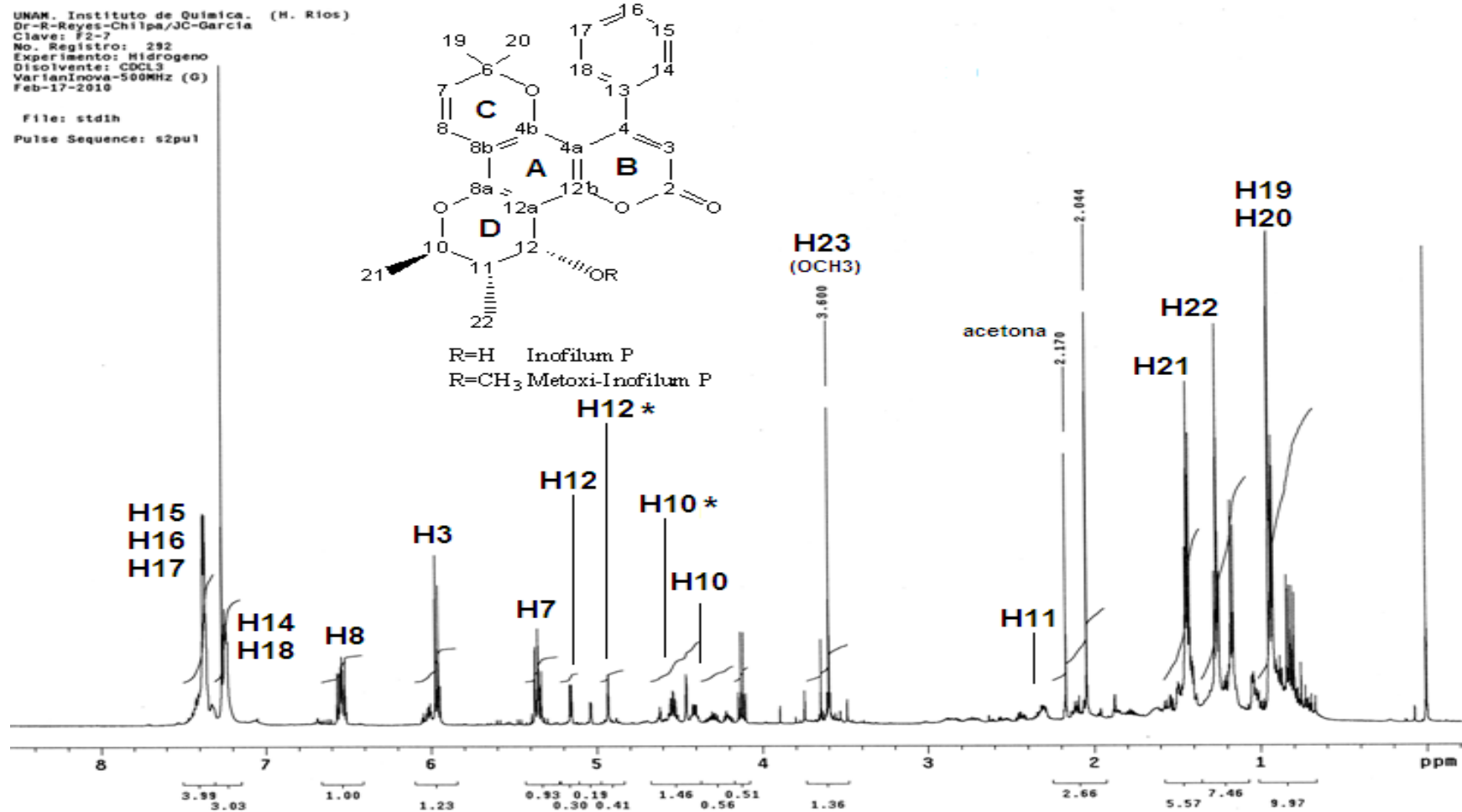


Espectro 52. Ampliación del espectro de RMN ¹H de GUT-70.

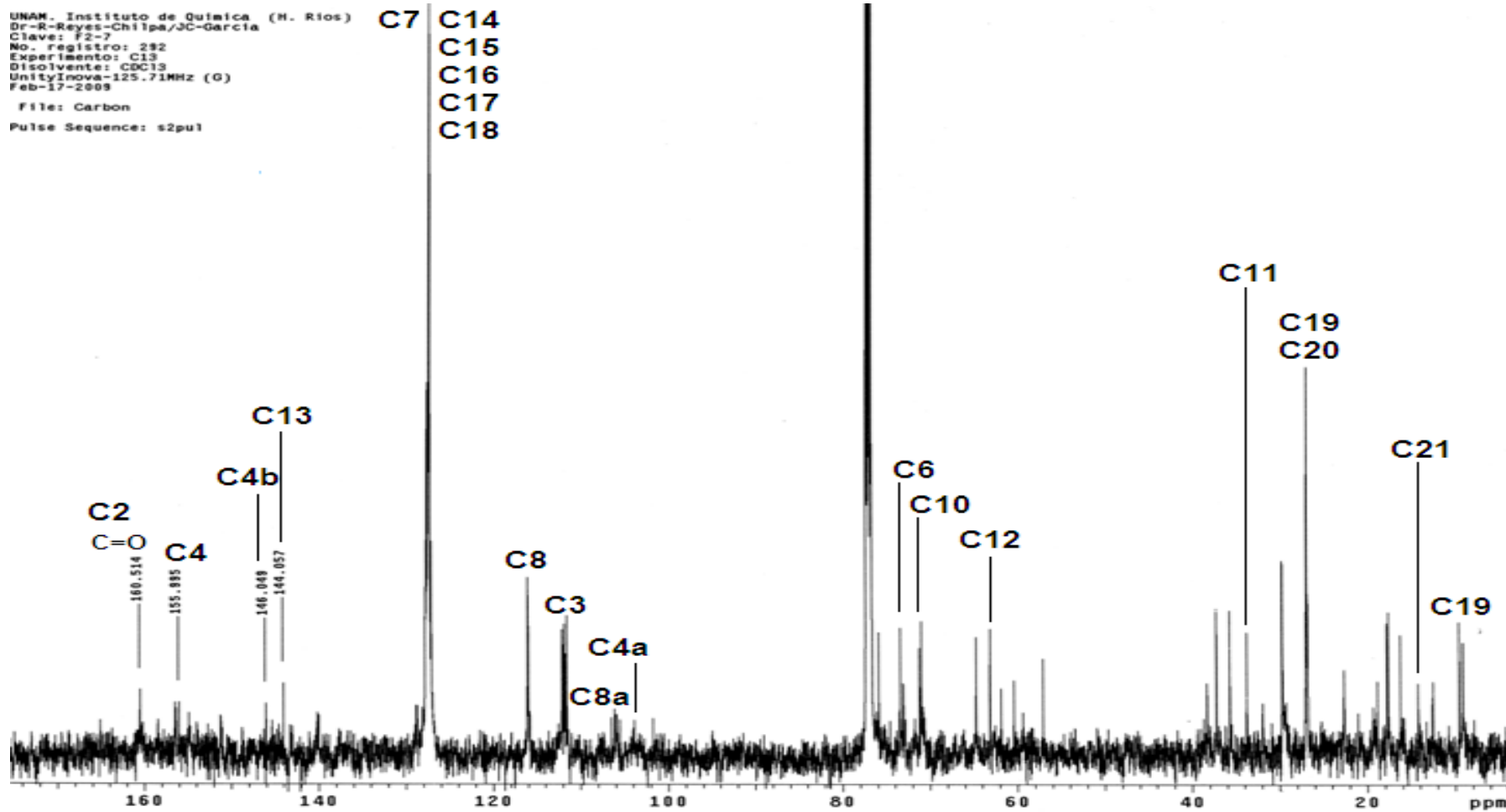
SUB-FRACCION SF2-7



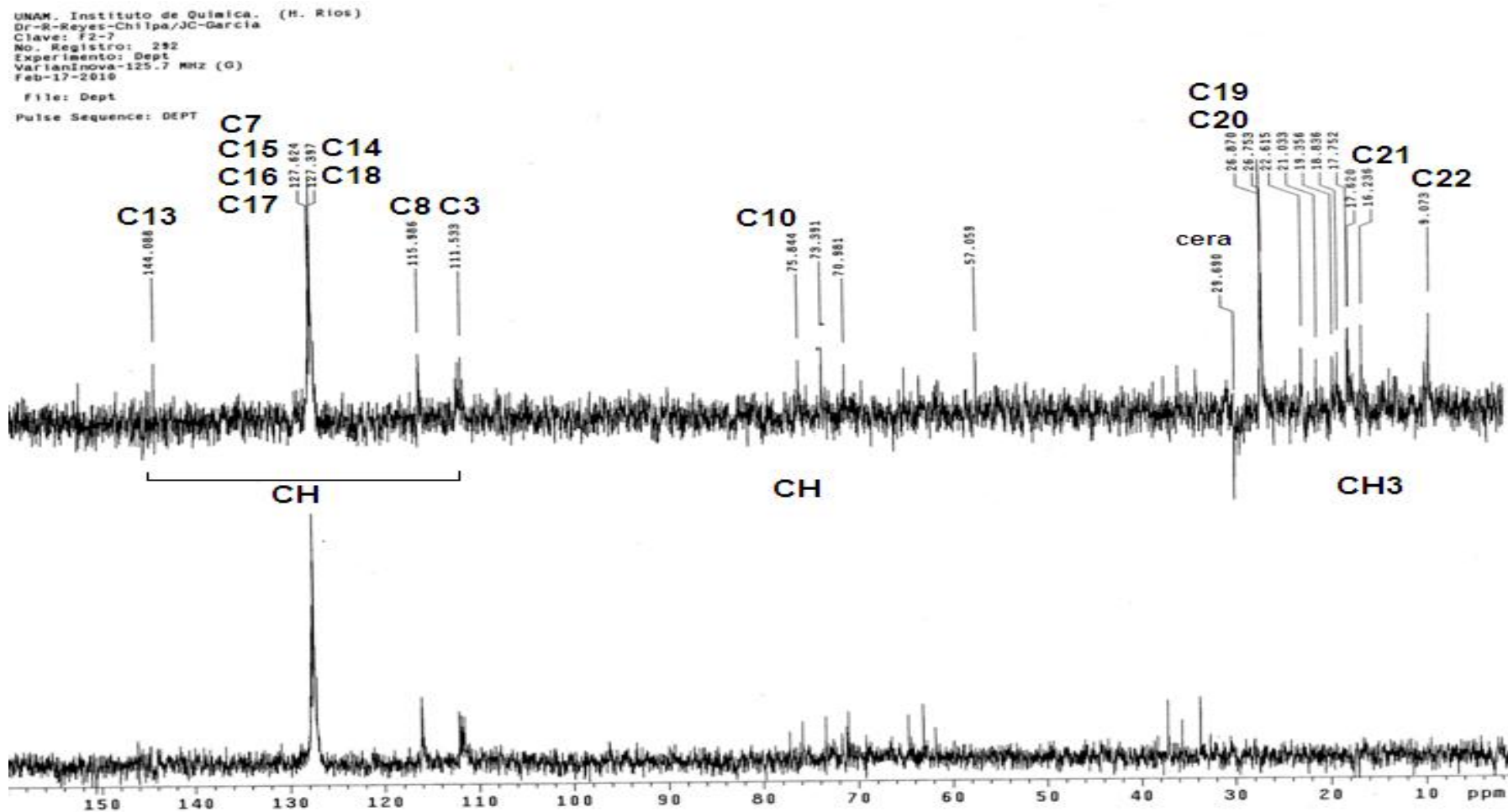
Espectro 53. Espectro RMN ^1H (300 MHz) de ((+)-Inofilum P.



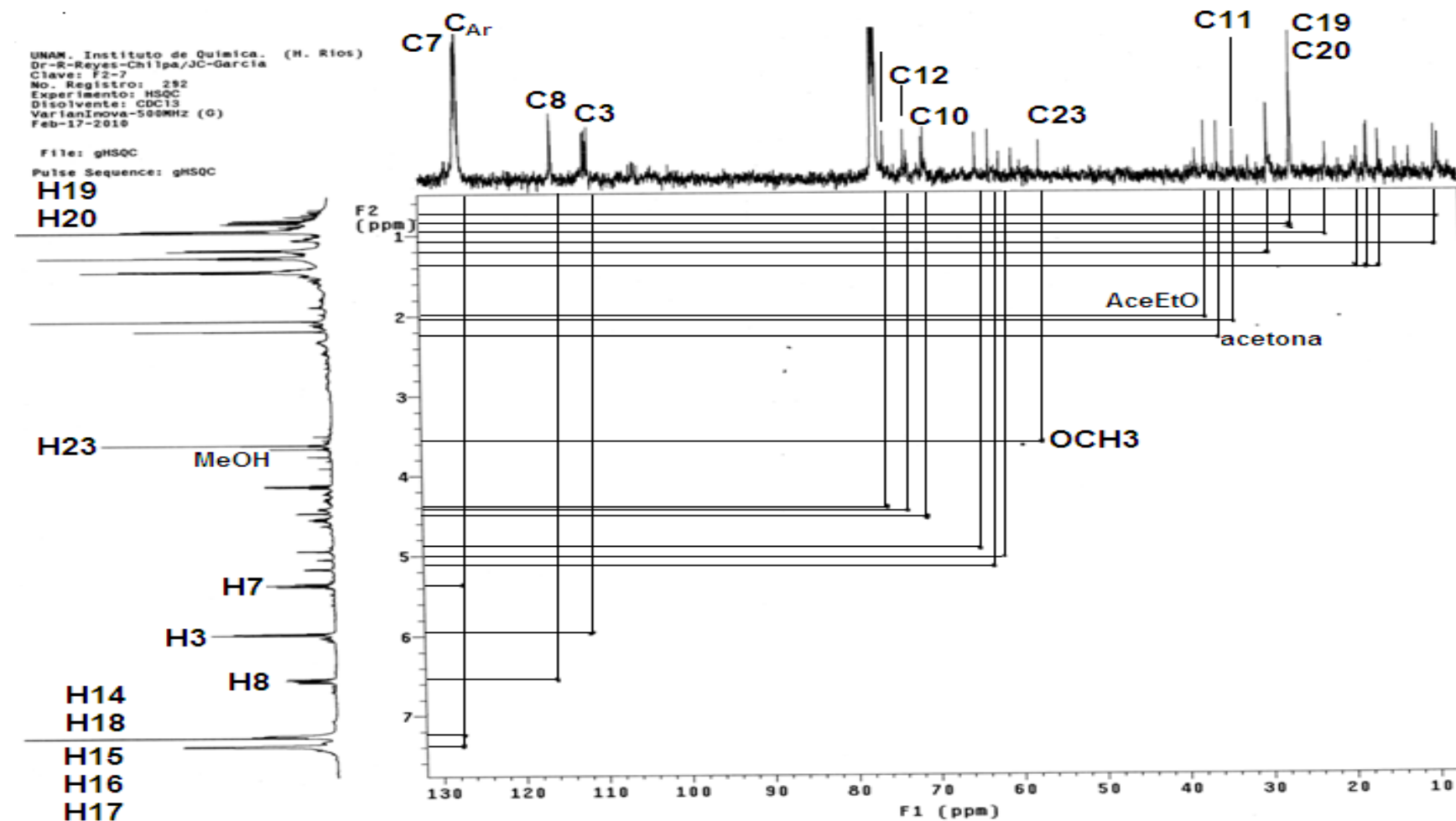
Espectro 54. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) de ((+)-Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P*.



Espectro 55. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz) de (+)-Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P.



Espectro 56. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz) de ((+)-Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P.



Espectro 57. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz) –Experimento HSQC- de ((+)-Inofilum P y 12-Metoxi-(+)-Inofilum P.

Author's personal copy

Fitoterapia 82 (2011) 1027–1034



Contents lists available at ScienceDirect

Fitoterapia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fitote

Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, Mexico

García-Zebadúa Julio César^{a,b}, Magos-Guerrero Gil Alfonso^c, Mumbrú-Massip Marius^d, Estrada-Muñoz Elizabeth^e, Contreras-Barríos Miguel Ángel^f, Huerta-Reyes Maira^g, Campos-Lara María Guadalupe^g, Jiménez-Estrada Manuel^a, Reyes-Chilpa Ricardo^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México

^b Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México

^c Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México

^d Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^e Sección Externa de Toxicología, CINVESTAV-IPN, DF, México

^f Hospital de la Mujer, Secretaría de Salud, D.F., México

^g Instituto Mexicano del Seguro Social, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2011

Accepted 10 June 2011

Available online 24 June 2011

Keywords:

Calophyllum brasiliense

Calanolides

HIV-1 RT

Toxicity

ABSTRACT

Calophyllum species are sources of calanolides, which inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (HIV-1 RT). The hexane extract of the leaves from *C. brasiliense* collected in Soconusco, State of Chiapas, Mexico, analyzed by HPLC showed to contain apetalic acid, calanolides B, and C. It showed potent anti-HIV-1 RT inhibition ($IC_{50} = 20.2 \mu\text{g/ml}$), but was not toxic in mice ($LD_{50} = 1.99 \text{ g/kg}$). The histological study of the mice treated at the highest dose revealed no alteration on hepatocytes, and an increase in the number of spleen megakaryocytes. These results suggest this extract is suitable to continue studies for developing a phytodrug against HIV-1.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Calophyllum* (Clusiaceae) comprises ca. 180 tree species with pantropical distribution [1]. Dipyran-tetracyclic coumarins active against immuno-deficiency human virus type 1 (HIV-1) have been isolated from several *Calophyllum* species [2–7]. The most outstanding coumarin is (+)-calanolide A, which has been shown to display potent and specific inhibition of reverse transcriptase (HIV-1 RT) activity *in vitro*, and in clinical tests [8], and low cytotoxicity on uninfected lymphocytes *in vitro* [2]. This compound has been synthesized, and is currently in pharmacological research phases I/II [9]. In the American continent, *Calophyllum* genus is represented by

8 species [1]; among them, *Calophyllum brasiliense* has the widest distribution from Argentine to Mexico [10]. In Mexico, *C. brasiliense* is the only species of this genus; however, we have found that this species is not chemically homogeneous, and at least two populations can be found which are different in leaf chemistry (chemotypes). The hexane extract of the first chemotype (CTP1) contains mammea type coumarins [11]; while the second type (CTP2) produces mainly chromanones, such as apetalic acid, and dipyranocoumarins, such as calanolides (Fig. 1); only the second chemotype is active against HIV-1, and inhibits HIV-1 RT *in vitro* [6]. We have recently detected by thin layer chromatography analysis that the leaf hexane extracts of *C. brasiliense* from two regions of the State of Chiapas (Mexico) may have a different chemical composition, but related with chemotype 2. Chemodiversity in other species of *Calophyllum* [5], such as *C. inophyllum* from Polynesia Islands [12], as well as, *Calophyllum* species from Sri Lanka [13], has also been reported.

* Corresponding author at: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510, D.F., México. Tel.: +52 5556224430; fax: +52 56162217. E-mail address: chilpa@servidor.unam.mx (R. Reyes-Chilpa).

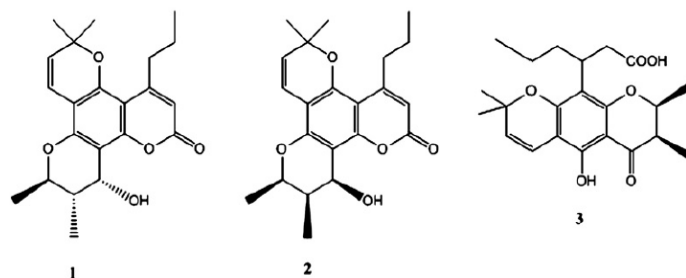


Fig. 1. Structures of (–)-calanolide B (1), (+)-calanolide C (2) and apetalic acid (3).

Research and development of phytodrugs generally involve a shorter and relatively inexpensive development cycle [14] as compared with those of synthetic drugs, which, in addition, usually are limited by producing many side-effects. Chemical, pharmacological, and toxicological profiles of crude drugs and extracts are extremely important when developing phytomedicines. Since *C. brasiliense* leaf extracts might be a likely source of antiviral phytodrugs [15], we decided to evaluate the properties of samples collected from two different regions of the State of Chiapas, Mexico, and compared them with the previous known chemotypes 1 and 2. The organic extracts were tested for their HIV-1 RT inhibition *in vitro*. The most active extracts were also characterized by their HPLC profile, and evaluated for their cytotoxicity on human lymphocytes *in vitro*, and toxicity in mice. *Post-mortem* morphological and histopathological studies of mice treated with the highest HIV-1 RT inhibition dose as well as the lowest toxic dose of active extracts were also carried out.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and preparation of extracts

Calophyllum brasiliense leaves were collected at Selva Region, November (2008), and at Soconusco Region, October (2008), both in the State of Chiapas, Mexico. Vouchers were deposited at the National University of Mexico Herbarium (MEXU) and at the IMSS Medicinal Herbarium (IMSSM) with numbers 1246548 and 15523, respectively. Leaves were dried at room temperature and then powdered (700 g). The extracts were prepared by maceration with hexane, acetone and methanol. Extraction with each solvent lasted 72 h, filtered, and extracted again with new solvent until exhaustion (10 times for hexane and acetone, and 6 for methanol). The organic extracts prepared with each solvent were pooled and concentrated 'in vacuo' in a rotary evaporator and residual solvent was evaporated to dryness at room temperature. The yields of the extracts were 3% (hexane), 7% (acetone), and 8% (methanol).

Part of the Soconusco methanol extract was treated in order to remove tannins [16]. Polyamide (50 g) was soaked in water overnight, and packed in a glass column, adding on top the extract sample (500 mg). Elution started with water, followed by 50% methanol, and finally, absolute methanol. The eluates were collected, combined and evaporated to dryness. Samples of extracts of *C. brasiliense* chemotypes 1 [11] and 2 [6] previously obtained were used for comparison.

2.2. HPLC analysis of hexane extracts from *C. brasiliense*

The hexane extracts were analyzed by HPLC (Waters 700) to quantify (–)-calanolide B (1), (+)-calanolide C (2), and apetalic acid (3) (Fig. 1), using a C-18 Silica Gel column (250×4 mm, 5 μm, Kromasil 100) with an UV-DAD detector (2487 DWAD, Waters Co.) at 284 nm. The eluent was acetonitrile-water (6/4, v/v) using an isocratic flow (1 ml min⁻¹) during 40 min. Identification of the compounds in the extracts was carried out by comparison with the retention times (RT) of pure compounds previously isolated [7]. Each compound was injected in triplicate at different concentrations (10, 25, 50 and 100 ppm) to establish the relationship between concentration and absorbance. The values of the linear regression equations were: $y = 46,697.95x - 12,223.52$, $r^2 = 0.99$, $p < 0.05$, RT 32.89 (1), $y = 61,728x - 680,388$, $r^2 = 0.97$, $p < 0.05$ (2), RT 34.82, and $y = 40,059.51x - 10,287.89$, $r^2 = 0.99$, $p < 0.05$, RT 26.18 (3). Each extract was dissolved in acetonitrile (0.75 mg/ml) and injected for quantification; content of each compound is expressed as mg/kg dry leaf.

2.3. Biological assays

HIV-1 RT inhibition of the extracts was screened, and IC₅₀ values were calculated. Their cytotoxicity was examined on human lymphocyte cells (MT2), and CC₅₀ values were calculated. Toxicity on mice was determined as LD₅₀ for the most active extracts. Morpho-histopathological analysis of the treated mice and controls was performed.

2.3.1. HIV-1 RT inhibition

The extracts were evaluated by a non-radioactive immunocolorimetric assay (Lenti RT Activity Assay, Cavid Tech) in a microtiter plate reader (ELx 808, BIO-TEK Instruments) at 405 nm. The assay was performed according to the protocol provided by the manufacturer. Each extract was dissolved in DMSO with a maximum and innocuous concentration of 0.5%. All extracts were first tested at 50 μg/ml. Reported values are means of 5 replicates. IC₅₀ values were calculated only for extracts that inhibited ≥50%. These extracts were tested at seven concentrations (3.125 to 200 μg/ml) with increments of 0.3 logarithm. Reported values are means of 3 replicates. The concentration–response relationship was established by linear regression equations. In the case of Soconusco extracts equation values were: $y = 1.36x + 2.99$, $r^2 = 0.925$, $p < 0.05$ (hexane), and $y = 1.4x + 2.92$, $r^2 = 0.952$, $p < 0.05$ (acetone). For Selva hexane extract values were $y = 0.511x + 4.14$, $r^2 = 0.990$, $p < 0.05$. Nevirapine, a non-nucleoside reverse

transcriptase inhibitor (NNRTI) was used as a positive control (0.001 μM to 1 mM) with increments of 1 logarithm. Differences for anti HIV-1 RT extract activity were analyzed by Kruskal–Wallis for independent samples, $\alpha = 0.05$.

2.3.2. Cytotoxicity on human lymphocytes

The extracts were evaluated using the method previously described by Mossman [17]. Human MT2 lymphocytes were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.25 mg/ml streptomycin and 100 mg/ml penicillin G, in the presence of the extract. Culture was maintained at 37 °C under 5% CO₂ humidified atmosphere. Each extract was dissolved in DMSO with a maximum concentration of 0.5%. Twenty ml/well of MTT solution (5 mg/ml in PBS) were added four hours before the end of the incubation period. After 48 h of incubation, cellular death was determined with a microplate reader (ELx 808, BIO-TEK Instruments) at 492/630 nm. The cytotoxicity test was based on the values obtained in the untreated control, which was considered as 100% cell viability. Only those extracts that significantly inhibited RT activity were followed by CC₅₀ values determination and tested at seven concentrations (3.125 to 200 $\mu\text{g/ml}$) with increments of 0.3 logarithm. Reported values are means of 3 replicates. The concentration–response relationship was established by linear regression equations. In the case of Soconusco extracts equation values were: $y = -2.27x + 8.43$, $r^2 = 0.973$, $p < 0.05$ (hexane), and $y = -1.99x + 8.64$, $r^2 = 0.998$, $p < 0.05$ (acetone). For Selva hexane extract values were $y = -2.13x + 8.35$, $r^2 = 0.995$, $p < 0.05$.

2.3.3. Acute toxicity test on mice

Only the Soconusco hexane and acetone extracts, and the Selva hexane extract, which showed HIV-1 RT activity, were examined for acute toxicity *in vivo*. Male mice (*Mus musculus*) strain CD1 (Charles River), body weight 26 ± 4 g, were provided by the School of Medicine of the National University of Mexico (UNAM). The animals were kept under standard conditions in ventilated boxes (12 h light/dark and 27 ± 2 °C) and fed with RatChow™. The protocol was adjusted to the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publication No. 80-23; revised 1978) [18]. The median lethal dose (LD₅₀) was determined over a period of one week, and was calculated by linear regression following Litchfield–Wilcoxon method for 95% confidence limits. The extracts were administered via intraperitoneal (i.p.) using corn oil as vehicle (Mazola®). The Soconusco hexane and acetone extract doses were 0.562–5.62 g/kg with increments of 1/4 logarithm and the Selva hexane extract doses were 0.316–1 g/kg with increments of 1/6 logarithm. The control mice group was treated with 0.9% saline solution (SS). The linear regression equations for the dose–response relationship were: $y = 3.36x - 2.74$, $r^2 = 0.973$, $p < 0.05$ and $y = 2.72x - 1.14$, $r^2 = 0.878$, $p < 0.05$, for hexane and acetone extracts of the Soconusco collection respectively, and $y = 5.14x - 4.56$, $r^2 = 0.954$, $p < 0.05$ for hexane extract of the Selva collection.

2.3.4. Neuropharmacological profile

The neurobehavioral effect of extracts on control and treated mice was analyzed with Irwin's test [19] which

evaluates coordination, exploratory, and motor activities. The test comprised an initial phase of observation without handling the animal, and a late stage of handling (1 h before and 1 h, 3 h and 5 h after extract administration) during which the behavioral change of each animal was studied.

2.3.5. Morphological and histopathological study

Since the Soconusco hexane extract showed the lowest IC₅₀, and the highest LD₅₀, necropsy of the dead mice was carried out after administration of the highest dose (5.62 g/kg). Mice were euthanized according to the International Standards previously quoted. All visible organs were macroscopically examined. Brain, heart, liver, spleen, lungs, kidneys, and testes were weighed (absolute organ weight). The ratio organ weight to body weight (relative organ weight) was calculated on the basis of body weight at the day of necropsy. The weight of the paired organs (testes, kidneys, lungs) was measured separately, and the bilateral weight was also calculated. Fresh organ weight after necropsy was analyzed by Student's test for independent samples, $\alpha = 0.05$. Liver, spleen, and lungs were fixed in 10% neutral buffered formalin. After usual processes of dehydration, clearing and infiltration, the organs were embedded in paraffin wax and sectioned into 5–7 μm slices through Microm HM335E Microtome. The tissues were stained with hematoxylin and eosin. The slides were examined and photographed microscopically through ZEISS Microscopy Axiostar plus HBO50/AC Model using achromatic plane objective (40 \times and 100 \times) coupled CANON Power Shoot G6 (7.1 Mp) camera.

2.3.6. Statistical analysis

All data were processed by using MiniTab™ version 15 Software.

3. Results and discussion

3.1. HPLC analysis of hexane extracts from *C. brasiliense*

The hexane extracts of the leaves of *C. brasiliense* collected at Soconusco and Selva regions of the State of Chiapas, Mexico, as well as, those from Chemotypes 2 and 1 showed a characteristic HPLC profile each (Fig. 2). The first three extracts contained different amounts of calanolides and apetalic acid, whereas the CTP1 only showed traces of apetalic acid, but not calanolides. The most abundant compound was apetalic acid, especially in the CTP2, followed by Soconusco, Selva, and CTP1 extracts. (–)-Calanolide B at the highest concentration was found in CTP2, followed by Soconusco, but was missing in CTP1 and the Selva extract. (+)-Calanolide C at the highest concentration was found in the Soconusco extract, followed by the Selva extract, but undetectable in, CTP1 and CTP2 (Table 1).

The (–)-calanolide B [2], and (+)-calanolide C [7] have been identified as HIV-1 specific RT inhibitors, while apetalic acid is inactive on HIV-1 RT. Currently (–)-calanolide B (= costatolide) is under preclinical studies [20], and might be an alternative to (+)-calanolide A, which is found in low concentrations in *Calophyllum* species. For instance, (–)-calanolide B was obtained in an overall yield of 10.6% from the latex of *C. teysmannii* [21]. (–)-Calanolide B has been obtained in yields

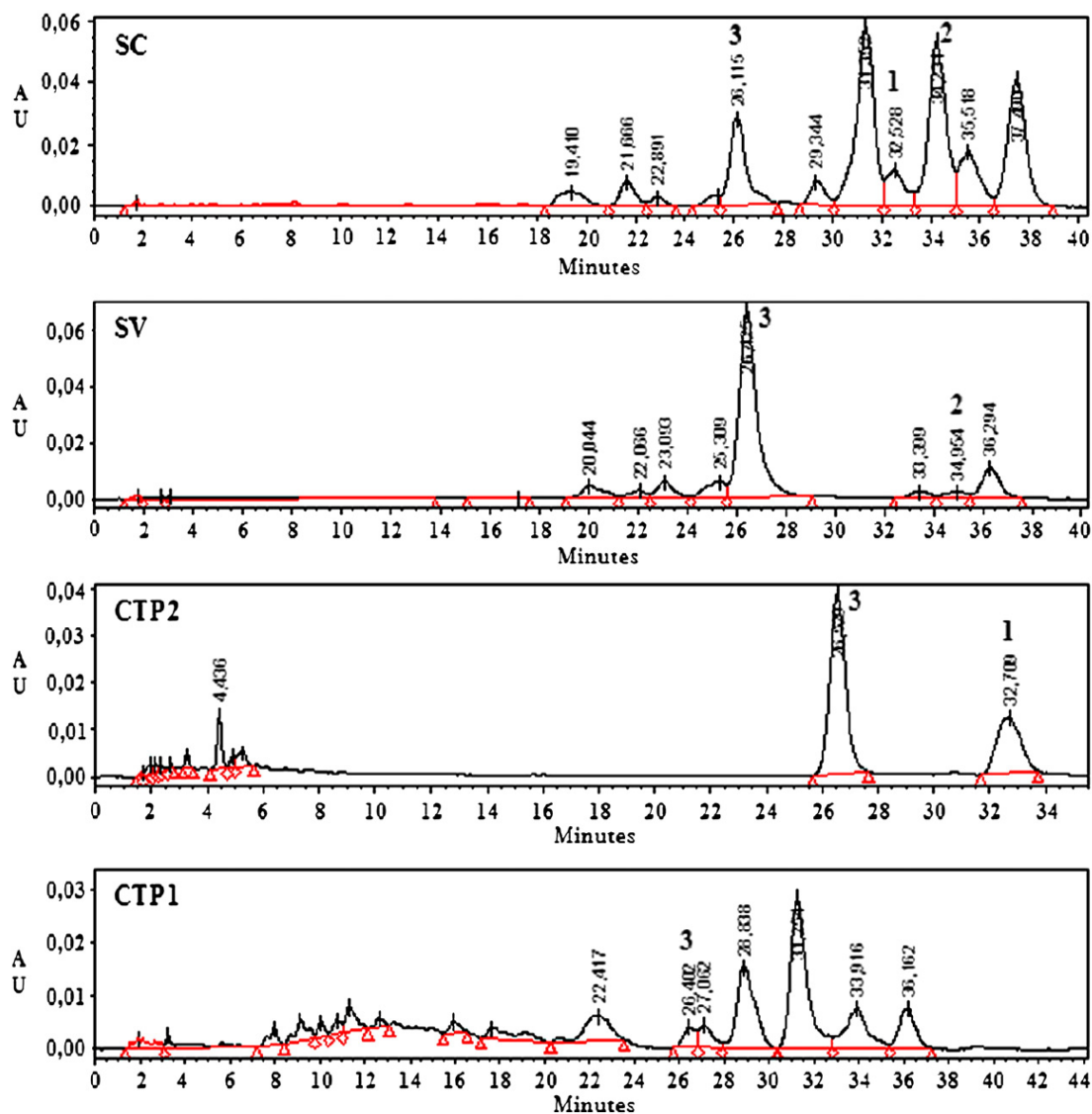


Fig. 2. Chromatograms of *Calophyllum brasiliense* hexane extracts. Soconusco (SC), Selva (SV), CTP2, and CTP1 collection. 1. (–)-Calanolide B, 2. (+)-Calanolide C, 3. Apetalic acid.

three times higher than that of (+)-calanolide A in *C. brasiliense* leaves [7]. The production of (–)-calanolide B *in vitro* callus of *C. brasiliense* leaf culture has been reported 3-fold higher than that from the greenhouse, and wild plant leaves [22]. In addition to known compounds, calanolides B and C, and apetalic acid,

Table 1
Content of calanolides and apetalic acid from the hexane extracts of the leaves from four collects (CTP1, CTP2, Selva and Soconusco) of *Calophyllum brasiliense*.

Compound mg/kg dry leaves	CTP1	CTP2	SELVA	SOCONUSCO
(–)-Calanolide B (1)	N.D.	681.85	N.D.	509.2
(+)-Calanolide C (2)	N.D.	N.D.	149.71	2115.81
Apetalic acid (3)	205.08	1681.85	942.31	1301.08

N.D. not detected.

the Soconusco sample contained two major unidentified peaks with retention times of 31.35 min and 37.49 min, respectively. The Selva sample contained calanolide C, and apetalic acid, and one unidentified peak with a retention time of 36.29 min. The identity of the unknown compounds is currently under investigation. It is known that besides calanolides, *Calophyllum* species may contain other important coumarins with potent HIV-1 RT inhibitions such as: (+)-inophyllum B and P, soulattrolide, (+)-cordatolide A and (–)-cordatolide B [3,4].

Calophyllum brasiliense is a widely distributed species in the American continent, from Brazil to Mexico [1], and is therefore chemically diverse. Previous results from our research team, has shown that *C. brasiliense* growing in Mexico contains only prenylated xanthenes [23]. The leaves synthesize mainly chromanones, such as apetalic and isopetalic

acid and calongic acid, and tetracyclic dipyrano-coumarins: (+)-calanolide A, (–)-calanolide B or costatolide, (+)-calanolide C, and soulatrolide [6,7]. However other specimens in Mexico synthesize mainly mammea-type coumarins in the leaves, such as mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/OA, C/OB, B/BA cycle F, B/BB cycle F and isomammeigin [11]. Regarding trees growing in Brazil, other research groups have found similar compounds. The heartwood contains simple and prenylated xanthenes [24]. The leaves synthesize (–)-mammea A/BB [25]. The stem bark contains different coumarins, such as: inophyllums A, C, D, E, calanolides A, C; brasimarins A, B, C, calanone, mammea B/BB, calocoumarin A and the denominated trivially like GUT-70 [26]. However, until now only the content of (–)-mammea A/BB coumarin has been quantified by HPLC in extracts from the leaves, stems and fruits from Brazil [25].

3.2. HIV-1 RT inhibition

The hexane extracts of *C. brasiliense* leaves collected in Soconusco, and Selva, as well as CTP1 and CTP2 tested at 50 µg/ml were able to inhibit HIV-1 RT. The Soconusco extract showed the highest inhibition (54%) while CTP1 was completely inactive at the same concentration (Fig. 3A). These differences were statistically significant. The acetone and methanol extracts of Soconusco also inhibited HIV-1 RT (Fig. 3B). Positive control, nevirapine, inhibited 95% HIV-1 RT at the same concentration. The HIV-1 RT IC₅₀ was calculated for the hexane and acetone extracts of Soconusco as 30.2 µg/ml and 30.9 µg/ml, respectively. These values are similar to that previously reported for CTP2 hexane extract (IC₅₀ = 29.6 µg/ml) [7]. The Selva hexane extract resulted less potent (IC₅₀ = 47.9 µg/ml) as compared with the above mentioned extracts (Fig. 4A). Nevirapine had an IC₅₀ = 0.1 µM (26.6 ng/ml). Regarding HIV-1 RT inhibitory properties of plant extracts, some authors have pointed out that an IC₅₀ ≤ 50 µg/ml may be considered potent [16,27]. Therefore, Soconusco (hexane, acetone) and, Selva (hexane) extracts can be included in this category. Although the Soconusco methanol extract also inhibited HIV-1 RT, its activity was sharply reduced after tannins were removed (Fig. 3B). A similar reduction in HIV-1 RT inhibition of the acetone extract was observed after tannin removal (from 47.4% to 24.6%) using the same method. It is known that polar extracts, specially those of methanol, may contain tannins and other polyphenol-like compounds able to inhibit HIV-1 RT [16], DNA topoisomerases I and II [28], and the binding of HIV-1 gp120/CD4 T-cell receptor [29]. Since tannins show high affinity for proteins and affect biochemical reactions, they are generally considered as unselective inhibitors [30].

3.3. In vitro and in vivo toxicities

The hexane and acetone extracts from the Soconusco leaves showed cytotoxicity against human lymphocytes *in vitro* (CC₅₀ = 32.36 and 66.01 µg/ml, respectively), while the hexane extract of the Selva showed a CC₅₀ = 38.02 µg/ml (Fig. 4B). A low cytotoxic profile has been proposed for a CC₅₀ > 200 µg/ml on MT2 cells [27]. In consequence, based on the previous parameters, these extracts are potentially toxic *in vitro*. However, the *in vivo* lethal dose of both Soconusco extracts was “slightly toxic” i.p., to mice according to Hodge &

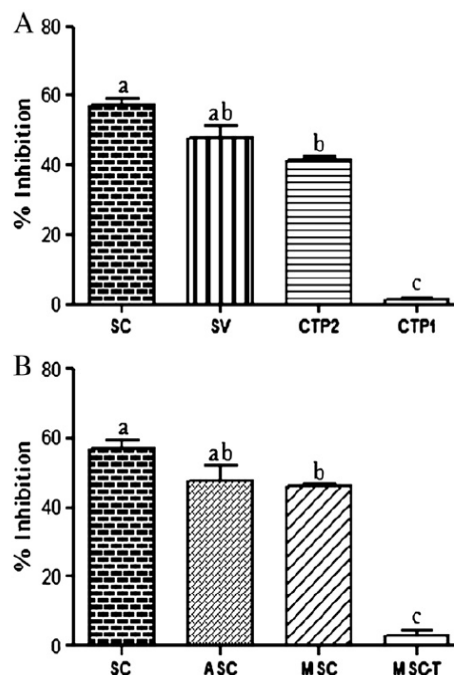


Fig. 3. Anti-HIV-1 RT activity of organic extracts from *Calophyllum brasiliense* leaves. (A): Hexane extracts of Soconusco (SC), Selva (SV), CTP2 and CTP1 samples. (B): Extracts of Soconusco collect: Hexane (SC), acetone (ASC), methanol (MSC) and methanol without tannins (MSC-T). Values are mean ± S.E.M. Letters mean statistically significant differences ($p < 0.05$).

Sterner [31], hexane (LD₅₀ = 1.995 g/kg, lower limit 1.296 g/kg and upper limit 3.073 g/kg), and acetone extracts (LD₅₀ = 1.809 g/kg, lower limit 1.045 g/kg and upper limit 3.129 g/kg). The Selva hexane extract was “moderately toxic” (LD₅₀ = 0.725 g/kg, lower limit 0.545 g/kg and upper limit 0.963 g/kg) (Fig. 4C) [31]. During *in vivo* toxicity assays, it was observed that i.p. administration of extracts at the highest dose caused a decrease in spontaneous motor activity of the treated mice. Exploratory conduct was also significantly reduced and caused failure of motor coordination (data not shown).

Differences in toxicity of the Soconusco extract *in vitro* and *in vivo* could be due to metabolism of its chemical constituents, especially apetalic acid. This compound has been reported as cytotoxic to human cervical epitheloid and oral epidermoid carcinoma cells with a CC₅₀ < 20 µg/ml, [32], and could also be toxic for human lymphocyte cells. In addition, chroman-4-one acids, such as calongic and isocalongic acids, have been reported to sharply reduce *in vitro* respiration of mitochondria from *Pisum sativum* [33]. It is likely that apetalic acid, which has a chroman-4-one skeleton, may also inhibit mitochondrial respiration *in vitro*; however this compound could be metabolized *in vivo*, since no microscopic injuries were observed in liver and spleen.

3.4. Morphology and histopathology

As part of the safety preclinical studies, the effect of the Soconusco hexane extract was studied on organs of the dead mice treated with the highest dose (5.62 g/kg i.p.). No

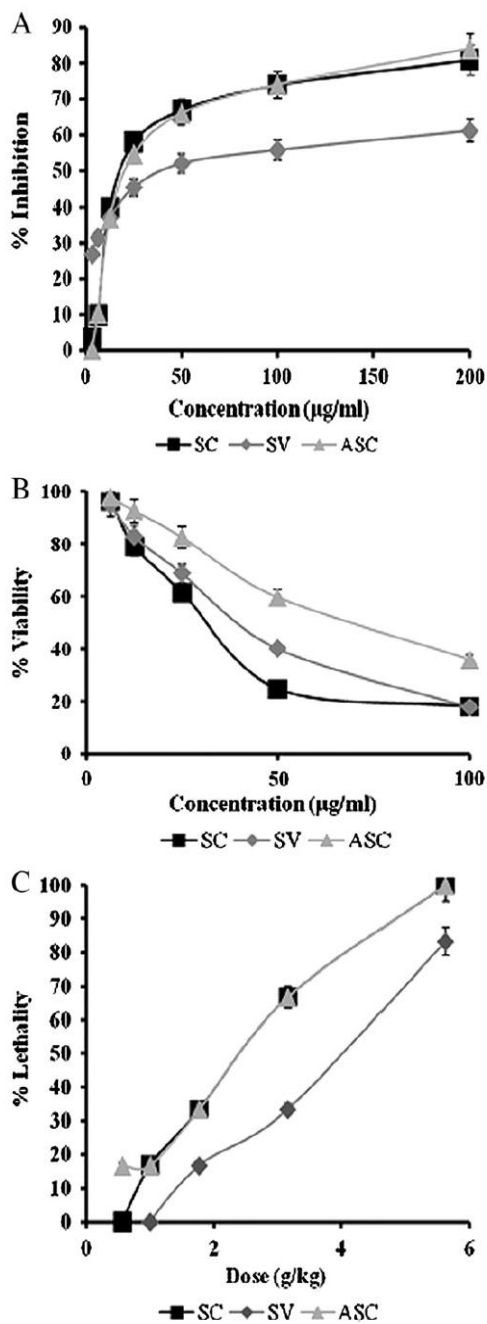


Fig. 4. Concentration–response curves of organic extracts from *Calophyllum brasiliense* leaves. (A) Inhibition rates on HIV-1 RT (IC50), n=3. (B) Cell viability of lymphocytes MT2 (CC50) n=3. (C) Toxicity in mice strain CD1 (LD50), n=6. Hexane (SC), and acetone extract (ASC) Soconusco collect, and hexane extract (SV) Selva collect. Each point represents mean ± S.E.M.

differences on body and organs weight were observed; the only noticeable alteration in the organ morphology was the lungs' petechiae when compared with the control group. The histopathological study of the liver revealed that the structure is preserved with an increase in the number of

endothelial and Kupffer cells, the blood vessels were dilated but erythrocytes were not abundant; regenerative processes were also observed, characterized by an increased number of binuclear hepatocytes (Fig. 5A and B). No injuries on spleen tissue were observed, but an increase in the number of megakaryocytes (Fig. 6A and B), some of them as syncytium or in the process of karyokinesis (Fig. 6C and D). These features suggest that the Soconusco extract may have immunostimulatory effect. In this regard, it has been reported that the methanol extract of *C. brasiliense* roots induced spleen cell growth of mice *in vitro*, either in the absence or presence of phytohemagglutinin [34]. The petechiae observed during macroscopical organ observation, and the congestion of lung blood vessels revealed by the histological analysis, suggested that treated mice suffered *pre-mortem* respiratory distress, and are also indicated by the fragility and rupture of alveoli (Fig. 7B), and that this was the main cause of death. The above suggests that this extract may have vasodilatory effects, and might have also antihypertensive properties. Control mice also suffered alveoli rupture, but this can be attributing to death by cervical dislocation (Fig. 7A).

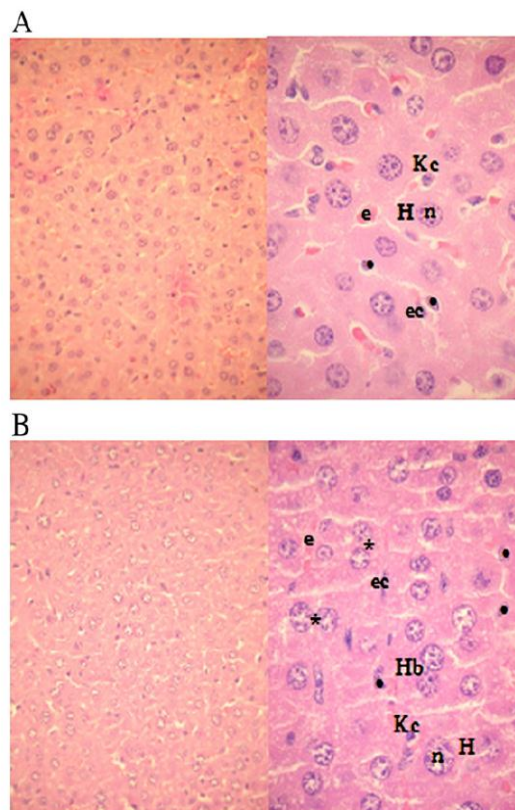


Fig. 5. Photomicrographs of mouse liver. (A) Control. (B) After treatment with 5.62 g/kg i.p. of Soconusco hexane extract of the leaves (x40 and x100). Note that architecture is preserved, but blood vessels are dilated. Hepatocyte (H), binucleated hepatocyte (Hb, *), nucleus (n), blood vessel (v), erythrocytes (e), endothelial cells (ec), Kupffer cells (Kc, *).

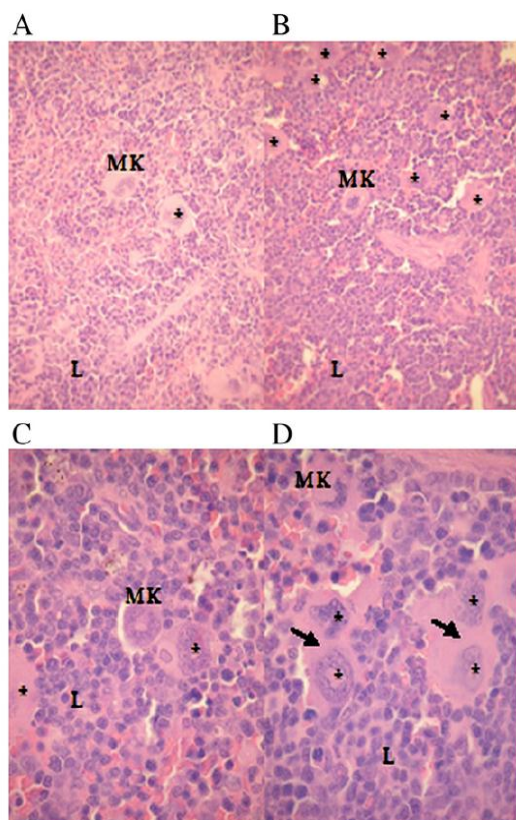


Fig. 6. Photomicrographs of mouse spleen. (A) Control. (B) After treatment with 5.62 g/kg i.p. of Soconusco hexane extract of the leaves ($\times 40$). Note that the number of megakaryocyte (MK, *) is increased. (C and D) Zoom of B showing megakaryocytes with mitotic figures ($\times 100$). Lymphoid tissue (L).

4. Conclusion

The leaf hexane extracts of *C. brasiliense* collected at Soconusco and Selva, Chiapas, Mexico showed qualitative and quantitative changes in their chemical composition by HPLC

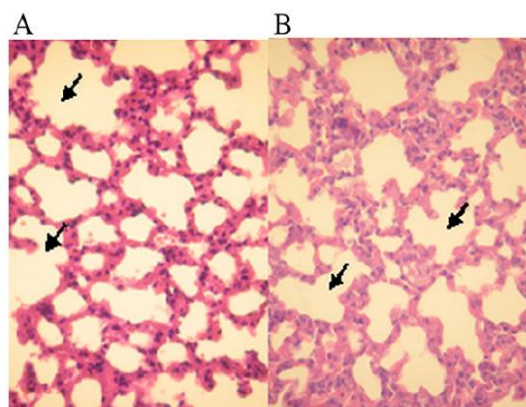


Fig. 7. Photomicrographs of mouse lung. (A) Control. (B) After treatment with 5.62 g/kg i.p. of Soconusco hexane extract of the leaves ($\times 40$ and $\times 100$). Note that the blood vessels are congested and show alveoli rupture (arrow). Erythrocytes (e).

as compared with the previously described chemotypes 1, 2. The Soconusco extract showed the highest HIV-1 RT inhibition. The dipyrano-coumarins (–)-calanolide B and (+)-calanolide C are responsible for anti HIV-1 RT properties; however other unidentified compounds may also be contributing. This extract was slightly toxic to mice, and no injuries were observed in liver and spleen tissue. These findings suggest that research aimed to develop an anti-HIV-1 phytodrug based on this extract is suitable.

Acknowledgments

This research was supported by grant IN203810 from DGAPA-UNAM. Julio Cesar Garcia Zebadua is grateful with Posgrado en Ciencias Biológicas-UNAM and CONACyT for providing a scholarship. Authors are grateful to Abigail Aguilar and Esteban Martinez for collect and identification of some botanical specimens; with Antonio Nieto and Teresa Rodriguez Apan for facilities to perform the biological assays, and Arturo Navarro for HPLC facilities.

References

- [1] Stevens PF. A revision of the old world species of *Calophyllum* (Guttiferae). *J Arnold Arbor* 1980;61:117–71.
- [2] Kashman Y, Gustafson KR, Fuller RW, Cardellina 2nd JH, McMahon JB, Currens MJ, et al. The calanolides, a novel HIV inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *J Med Chem* 1992;35:2735–43.
- [3] Patil AD, Freyer AJ, Eggleston DS, Haltiwanger RC, Bean MF, Taylor PB, et al. The Inophyllums, novel Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian Tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *J Med Chem* 1993;36:4131–8.
- [4] Dharmaratne HRW, Wanigasekera WMA, Mata-Greenwood E, Pezzuto JM. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase activity by cordatolides isolated from *Calophyllum cordatooblongum*. *Planta Med* 1998;64:460–1.
- [5] McKee TC, Covington CD, Fuller RW, Bokesh HR, Young S, Cardellina JH, et al. Pyranocoumarins from tropical species of the genus *Calophyllum*: a chemotaxonomic study of extracts in the National Cancer Institute collection. *J Nat Prod* 1998;61:1252–6.
- [6] Huerta-Reyes M, Basualdo MC, Lozada L, Jiménez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R. HIV-1 inhibition by extracts of *Clusiaceae* species from Mexico. *Biol Pharm Bull* 2004;27:916–20.
- [7] Huerta-Reyes M, Basualdo MC, Abe F, Jiménez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R. HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biol Pharm Bull* 2004;27:1471–5.
- [8] Eiznhamer DA, Creagh T, Ruckle JL, Tolbert DT, Giltner J, Dutta B, et al. Safety and pharmacokinetic profile of multiple escalating doses of (+)-calanolide A, a naturally occurring nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy HIV-negative volunteers. *HIV Clin Trials* 2002;3:435–50.
- [9] Buttler MS. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep* 2005;22:162–95.
- [10] Rodríguez ME, Cardozo AE, Krauczuk ER, Fontana JL, Iriarte D. *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae): Nuevo registro para la flora de la Argentina. *Bol Soc Argent Bot* 2009;44:361–6.
- [11] Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Ramírez-Apan T, Amekraz B, Aumelas A, Jankowsky C, et al. Cytotoxic effects of mammae type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sci* 2004;75:1635–47.
- [12] Laure F, Raharivelomanana P, Butaud JF, Bianchini JP, Gaydou EM. Screening of anti-HIV-1 inophyllums by HPLC-DAD of *Calophyllum inophyllum* leaf extracts from French Polynesia Islands. *Analyt Chim Acta* 2008;624:147–53.
- [13] Bandara BMR, Ranjith H, Dharmaratne W, Sotheeswaran S, Balasubramaniam S. Two chemically distinct groups of *Calophyllum* species from Sri Lanka. *Phytochem* 1986;25:425–8.
- [14] Josephs JS, Fleishman JA, Gaist P, Gebro KA. Use of complementary and alternative medicines among a multistate, multisite cohort of people living with HIV/AIDS. *HIV Med* 2007;8:300–5.
- [15] Reyes-Chilpa R, Huerta-Reyes M. Compuestos naturales de plantas de la familia *Clusiaceae*: Inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. *Interciencia* 2009;34:1–8.

- [16] Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *J Nat Prod* 1991;54:143–54.
- [17] Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- [18] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 80-23, revised 1978 reprinted 1980. Office of Science and Health Reports, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, 1980.
- [19] Moscardo E, Maurin A, Dorigatti R, Champeroux P, Richard S. An optimised methodology for the neurobehavioural assessment in rodents. *J Pharm Toxicol Methods* 2007;56:239–55.
- [20] Singh DT, Kumar BC, Patidar A, Kumar P, Kumar P, Lal C. Anti-HIV agents: a step towards future. *Int J Pharm Sci Rev and Res* 2010;3:10–8.
- [21] Lin YM, Anderson HM, Jenta TR, Williams MJ, Flavin MT, Xu ZQ. An efficient and scalable method for the isolation of costatolide, a naturally-occurring anti-HIV agent, from the latex of *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. *Pharm Biol* 1999;37:71–6.
- [22] Bernabé-António A, Estrada-Zúñiga ME, Buendía-González L, Reyes-Chilpa R, Chávez-Ávila VM, Cruz-Sosa F. Production of anti-HIV-1 calanolides in callus culture of *Calophyllum brasiliense* (Cambes). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2010;103:33–40.
- [23] Reyes-Chilpa R, Jimenez-Estrada M, Estrada-Muñiz E. Antifungal xanthonones from *Calophyllum brasiliense* Heartwood. *J Chem Ecol* 1997;23:1901–11.
- [24] Pereira MO, Gottlieb OR, Magalhaes MT. Novas Xantonas do *Calophyllum brasiliense*. *An Acad Bras Cienc* 1967;38:425–7.
- [25] Brenzan MA, Nakamura CV, Filho BPD, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Mitsui ML, et al. Quantitative and qualitative analysis of (–)-mammea A/BB coumarin in extracts of *Calophyllum brasiliense* Cambes (Clusiaceae) by HPLC. *J Liq Chrom Rel Tech* 2010;33:283–95.
- [26] Ito C, Itoigawa M, Mishina Y, Filho VC, Enjo F, Tokuda H, et al. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. *J Nat Prod* 2003;66:368–71.
- [27] Min BS, Kim YH, Tomiyama M, Nakamura N, Miyashiro H, Otake T, et al. Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities. *Phytother Res* 2001;15:481–6.
- [28] Kashiwada Y, Nonaka G, Nishioka I, Lee KJ, Bori I, Fukushima Y, et al. Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II *in vitro*. *J Pharm Sci* 1993;82:487–92.
- [29] Collins RA, Ng TB, Fong WP, Wan CC, Yeung HW. A comparison of human immunodeficiency virus type 1 inhibition by partially purified aqueous extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci* 1997;60:345–51.
- [30] Au TK, Lam TL, Ng TB, Fong WP, Wan DCC. A comparison of HIV-1 integrase inhibition by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbal. *Life Sci* 2001;68:1687–94.
- [31] Hodge HC, Sterner JH. Determination of substances acute toxicity by LD₅₀. *Am Ind Hyg Assoc* 1943;10:93.
- [32] Yan-Ching S, Li-Tang W, Ashraf Taha K, Yao-Haur K. Chromanones and dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*. *Chem Pharm Bull* 2004;52:4002–5.
- [33] Hay AE, Guilet D, Morel C, Larcher G, Macherel D, Le Ray AM, et al. Antifungal chromans inhibiting the mitochondrial respiratory chain of pea seeds and new xanthonones from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Med* 2003;69:1130–5.
- [34] Zdonai RH, Coelho F, Ferreira J, Bittencourt Mendes AK, Weber Biavatti M, Niero R, et al. Evaluation of the proliferative activity of methanol extracts from six medicinal plants in murine spleen cells. *Braz J Pharm Sci* 2010;46:323–33.