



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
RELAJANTE DE LOS METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE *Calophyllum*  
*brasiliense* SOBRE LA  
CONTRACTILIDAD DEL ÍLEON DE RATA

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

EDUARDO ANTONIO AGUILAR BAÑUELOS

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:  
DR. RICARDO REYES CHILPA

COMITÉ TUTOR:  
DRA. MARÍA GUADALUPE CAMPOS LARA  
DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2011



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/100/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

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 17 de enero de 2011 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **AGUILAR BAÑUELOS EDUARDO ANTONIO** con número de cuenta **91214238** con la tesis titulada "Evaluación de la actividad relajante de los metabolitos secundarios de *Calophyllum brasiliense* sobre la contractilidad del Ileon de rata.", realizada bajo la dirección del (la) **DR. RICARDO REYES CHILPA**:

Presidente: DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO  
Vocal: DR. ARTURO AGUILAR ROJAS  
Secretario: DR. RICARDO REYES CHILPA  
Suplente: DRA. MAIRA ESTRELLA HUERTA REYES  
Suplente: DRA. MARÍA GUADÁLUPE CAMPOS LARA

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

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de febrero de 2011

*M del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/grt\*



## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, no solo como institución educativa si no también a su personal que de una u otra manera colaboraron para la obtención de mi grado académico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por apoyarme económicamente en la realización de mis estudios durante el periodo del 1 de agosto de 2006 al 30 de julio de 2008 con el número de registro de becario 202627 y posteriormente a la beca PAPIIT del proyecto IN203810 “Estudios para el desarrollo de un fitofármaco antiviral (VIH-1) con base en el árbol tropical *Calophyllum brasiliense*”, durante mi reincorporación y culminación de mi tesis de posgrado.

A mí Comité Tutor conformado por el Dr. Ricardo Reyes Chilpa, la Dra. Maria Guadalupe Campos Lara y el Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero por todo el apoyo incondicional, conocimientos, tiempo e infraestructura para hacer posible el presente trabajo así como también su comprensión ante las situaciones adversas que he tenido que afrontar estos últimos años.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL:**

A Dios por darme la fuerza y el coraje para afrontar la adversidad a veces ocasionada por la maldad de las personas y a reconocer la bondad desinteresada de otras.

A los Doctores Maira Estrella Huerta Reyes y Arturo Aguilar Rojas por el honor de aceptar ser parte de mi jurado de tesis, creer en mí y ayudarme a concluir este logro personal.

A mis amigas y compañeras del Instituto de Ecología, Bióloga Mariel Ramírez Alfaro y Maestra en Ciencias Verónica Hernández Pérez por enseñarme que la congruencia e integridad se antepone a cualquier interés personal.

A mis amigos quienes en su momento fueron mis únicos compañeros de laboratorio. En la Facultad de Medicina, Departamento Farmacología, Laboratorio de fitofarmacología a los ahora Químicos Farmacobiólogos Juan Luis Escobar Ramírez y Leticia Flores Martínez y en el Instituto de Química, Departamento de productos naturales, laboratorio 2-5 al Biólogo. Jorge Iván Castillo Arellano. Gracias por compartir los buenos momentos tanto en lo profesional como en lo personal que enriquecieron e hicieron placenteras las largas jornadas de trabajo.

A la nueva sangre que nutre al laboratorio 2-5 que aunque ya no tuve el privilegio de trabajar con ellos es evidente su contagiada amistad y energía positiva.

A mi Familia que es la punta de lanza de mis logros profesionales y personales sobre todo en estos últimos años de tragedia.

A LA MEMORIA DE MÍ PADRE

Lic. Arturo Aguilar Ramírez

(1943-2009)

## ÍNDICE

	Página
<b>1 Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Antecedentes .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 <i>El músculo liso como modelo farmacológico</i> .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Vías de señalización asociadas a la contracción de la musculatura lisa .....	4
<b>2.2 <i>Las dolencias gastrointestinales</i>.....</b>	<b>6</b>
2.2.1 Epidemiología de las dolencias gastrointestinales .....	6
2.2.2 Las plantas en el tratamiento de las dolencias gastrointestinales .....	7
<b>2.3 <i>Calophyllum brasiliense Cambess.</i>.....</b>	<b>8</b>
2.3.1 Etnobotánica .....	8
2.3.2 Fitoquímica y farmacología .....	8
<b>3 Planteamiento del problema .....</b>	<b>12</b>
<b>4 Hipótesis .....</b>	<b>12</b>
<b>5 Objetivos .....</b>	<b>12</b>
<b>5.1 <i>Objetivo general</i>.....</b>	<b>12</b>
5.1.1 Objetivos particulares .....	12
<b>6 Materiales y métodos .....</b>	<b>13</b>
<b>6.1 <i>Preparación de los extractos y compuestos de C. brasiliense</i> .....</b>	<b>13</b>
6.1.1 Material vegetal.....	13
6.1.2 Extractos .....	13
6.1.3 Compuestos .....	14
<b>6.2 <i>Evaluación de la actividad farmacológica</i> .....</b>	<b>15</b>
6.2.1 Animales .....	15
6.2.2 Preparación del modelo experimental .....	15

6.2.3 Análisis estadístico.....	16
<b>7 Resultados .....</b>	<b>17</b>
7.1 Rendimiento de los extractos metanólicos de <i>C. brasiliense</i> .....	17
7.2 Actividad antiespasmódica de los extractos .....	19
7.3 Actividad antiespasmódica de las fracciones .....	23
7.4 Actividad antiespasmódica de los compuestos.....	27
<b>8 Discusión .....</b>	<b>31</b>
<b>9 Conclusión .....</b>	<b>35</b>
<b>10 Bibliografía .....</b>	<b>36</b>
<b>I. Apéndice compuestos .....</b>	<b>43</b>



## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
<b>Cuadro 1. Compuestos presentes en los extractos metanólicos y fracciones resultantes de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de <i>C. brasiliense</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>Cuadro 2. Efecto de los extractos metanólicos de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de <i>C. brasiliense</i> en la contracción inducida al íleon aislado de rata por acetilcolina.....</b>	<b>22</b>
<b>Cuadro 3. Efecto de los compuestos aislados de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de <i>C. brasiliense</i> con actividad espasmolítica en la contracción inducida al íleon aislado de rata por acetilcolina.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 1. Mecanismo de señalización durante la contracción fásica inducida por acetilcolina (Ach) en célula de íleon (M<sub>3</sub>, receptor muscarínico; G, proteína G; IP<sub>3</sub>, inositol-1,4,5 trifosfato; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína cinasa C; Ca<sup>2+</sup>, calcio y ACE acetilcolinesterasa).....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 2. Cumarinas del tipo de las mammeas aisladas de las hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i> (Quimiotipo 1).....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 3. Dipiranocumarinas (1 – 4) y cromanonas (5 y 6) aisladas de las hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i> (Quimiotipo 2).....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 4. Compuestos comunes presentes en las hojas de ambos quimiotipos de <i>Calophyllum brasiliense</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 5. Diagrama de la elaboración de los extractos y fracciones de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de <i>Calophyllum brasiliense</i>.....</b>	<b>17</b>

<b>Figura 6. Perfil cromatográfico en cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos y compuestos aislados de las hojas de los quimiotipo 1 y 2 de <i>Calophyllum brasiliense</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 7. Curvas acumulativas dosis-respuesta de acetilcolina ± S.E.M. en ausencia (control) y presencia de disolvente Krebs-Henseleit modificado-acetona (99:1) sobre el íleon aislado de rata.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 8. Curvas acumulativas dosis-repuesta de acetilcolina ± S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia del extracto metanólico de <i>C. brasiliense</i> quimiotipo 1 (CbM1) y 2 (CbM2) sobre el íleon aislado de rata.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 9. Efecto relajante a diferentes dosis de los extractos metanólicos del quimiotipo 1 (CbM1) y 2 (CbM2) de <i>C. brasiliense</i> durante la contracción inducida por acetilcolina ± S.E.M. (<math>1 \times 10^{-4}</math> M) al íleon aislado de rata.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 10. Curvas acumulativas dosis-repuesta de acetilcolina ± S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia a 310 µg/ml de las fracciones soluble (CbM1Shx) e insoluble en hexano (CbM1Ihx) del extracto metanólico de <i>C. brasiliense</i> quimiotipo 1 (CbM1) sobre el íleon aislado de rata.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 11. Curvas acumulativas dosis-repuesta de acetilcolina ± S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia a 310 µg/ml de las fracciones soluble (CbM2Shx) e insoluble en hexano (CbM2Ihx) del extracto metanólico de <i>C. brasiliense</i> quimiotipo 2 (CbM2) sobre el íleon aislado de rata.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 12. Efecto relajante de las fracciones solubles (CbM1Shx y CbM2Shx)) e insolubles en hexano (CbM1Ihx y CbM2Ihx) de los quimiotipos 1 y 2 de <i>C. brasiliense</i> a 310 µg/ml en la contracción inducida por acetilcolina ± S.E.M. (<math>1 \times 10^{-4}</math> M) al íleon aislado de rata.....</b>	<b>25</b>

	Página
<b>Figura 13. Perfil cromatográfico en cromatografía en capa fina de las fracciones solubles (CbM1Shx y CbM2Shx) e insolubles (CbM1Ihx y CbM2Ihx) y compuestos aislados de las hojas de los quimiotipo 1 y 2 de <i>C. brasiliense</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 14. Curvas acumulativas dosis-respuesta de acetilcolina <math>\pm</math> S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia de la mammea A/BA sobre el íleon aislado de rata.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 15. Curvas acumulativas dosis-repuesta de acetilcolina <math>\pm</math> S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia del ácido apetalico sobre el íleon aislado de rata.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 16. Efecto relajante a diferentes dosis de los compuestos mammea A/BA y ácido apetalico durante la contracción inducida por acetilcolina <math>\pm</math> S.E.M. (<math>1 \times 10^{-4}</math> M) al íleon aislado de rata.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 17. Curvas acumulativas dosis-repuesta de acetilcolina <math>\pm</math> S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia de los triterpenos canofilol y friedelina sobre el íleon aislado de rata.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 18. Espectro de RMN <math>^1</math>H del Ácido apetalico.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 19. Espectro de RMN <math>^1</math>H del Ácido protocatechuico.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 20. Espectro de RMN <math>^1</math>H de Amentoflavona.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 21. Espectro de RMN <math>^1</math>H del Canofilol.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 22. Espectro de RMN <math>^1</math>H de Friedelina.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 23. Espectro de RMN <math>^1</math>H de Mammea A/BA.....</b>	<b>55</b>

## RESUMEN

El árbol tropical *Calophyllum brasiliense* se encuentra ampliamente distribuido desde México hasta el Brasil y ha sido usado en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes padecimientos como son la diarrea, trastornos gástricos, procesos dolorosos e inflamatorios, “limpieza de la matriz”, várices, hemorroides y úlceras crónicas. Estos usos populares sugieren que los compuestos de la especie podrían actuar sobre el músculo liso en útero, vasos sanguíneos e intestino. En México existen dos poblaciones de esta planta denominados como quimiotipo 1 y quimiotipo 2 que difieren en los constituyentes químicos de las hojas. El primer quimiotipo exhibe una serie de cumarinas del tipo de las mammeas, mientras que el segundo quimiotipo contiene cromanonas y diversas dipiranocumarinas tetracíclicas. En el presente trabajo se examinó la actividad antiespasmódica de los metabolitos secundarios de las hojas de ambos quimiotipos de *C. brasiliense* usando como modelo biológico el íleon aislado de la rata albina Wistar (*Rattus norvegicus*). Para realizar los ensayos biológicos se obtuvieron los extractos metanólicos de las hojas de ambos quimiotipos los cuales mostraron la presencia de los compuestos mayoritarios reportados por nuestro grupo de trabajo al ser sometidos a cromatografía en capa fina en comparación con muestras originales aisladas por cromatografía en columna e identificadas por espectrometría de masas y diferentes técnicas espectroscópicas (principalmente resonancia magnética nuclear de protones). En el caso del extracto metanólico del quimiotipo 1 (CbM1) se identificó la presencia de mammea A/BA y en el extracto metanólico del quimiotipo 2 (CbM2) del ácido apetalico, así como algunas moléculas comunes en ambos extractos como son el ácido protocatechuico, amentoflavona, canofilol y friedelina. La actividad de CbM1 y CbM2 fue evaluada a diferentes concentraciones (1000, 310, 100 y 31 µg/ml) sobre músculo liso del íleon previamente contraído con acetilcolina ( $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M). Ambos extractos relajaron el músculo liso de forma dosis dependiente y no competitiva. Posteriormente cada uno de los extractos metanólicos se maceraron en hexano obteniéndose dos partes a) soluble en hexano (denominadas CbM1Shx para el quimiotipo 1 y CbM2Shx para el quimiotipo 2) y b) insoluble en hexano (denominadas CbM1Ihx para el quimiotipo 1 y CbM2Ihx para el quimiotipo 2). Estas fracciones resultantes al ser evaluadas a una concentración de 310 µg/ml determinaron que la mayor actividad antiespasmódica estaba en las solubles en

hexano (CbM1Shx y CbM2Shx). Al analizarlas por cromatografía en capa fina se demostró que CbM1Shx está constituida principalmente por cumarinas del tipo de las mammeas y para el caso de CbM2Shx se encontraron moléculas del tipo de las cromanonas. Por ello, se probó la actividad relajante de los correspondientes compuestos mayoritarios, mammea A/BA y ácido apetalico, a tres diferentes concentraciones (310, 100 y 31  $\mu\text{g/ml}$ ). Los compuestos fueron activos de manera no competitiva y dependiente de la concentración. Estos resultados demuestran que los metabolitos secundarios de las hojas de ambos quimiotipos de *C. brasiliense* son capaces de relajar la contractilidad del íleon de rata, apoyando científicamente el uso que se le da en la medicina tradicional.

## ABSTRACT

The tropical tree *Calophyllum brasiliense* is widely distributed from Mexico to Brazil and has been used in traditional medicine to treat various ailments such as diarrhea, gastric distress, pain and inflammatory processes, "clearing the matrix", varicose veins, hemorrhoids and chronic ulcers. These popular applications suggest that compounds of this species could act on the uterine smooth muscle, blood vessels and intestine. In México there are two known populations of this species named as chemotypes that differ in the chemical constituents of their leaves. The first chemotype synthesizes mammea type coumarins, while the second chemotype produces tetracyclic dipiranocoumarines, and chromanones. In the present work it was examined the antispasmodic activity of the secondary metabolites from the two chemotypes of *C. brasiliense*. As biological model it was employed the isolated ileum of Wistar albino rats (*Rattus norvegicus*). The methanol extracts of leaves of both chemotypes showed the presence of the main compounds by thin layer chromatography (TLC), as compared with original samples isolated by column chromatography and identified by spectroscopical techniques such as proton nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. The methanol extract of chemotype 1 (CbM1) contained mammea A/BA, while that of chemotype 2 (CbM2) with apetalic acid. Several molecules were found in both extracts, such as protocatechuic acid, amentoflavone, canophyllol and friedelin. CbM1 and CbM2 were evaluated at different concentrations (1000, 310, 100 and 31 µg/ml) on ileum smooth muscle pre-contracted with acetylcholine ( $1 \times 10^{-9}$  to  $1 \times 10^{-4}$  M). Both extracts relaxed the smooth muscle in a non-competitive and dose-dependent manner. Afterwards, each of the methanol extracts was macerated with hexane obtaining two parts a) soluble in hexane (called CbM1Shx for chemotype 1 and CbM2Shx for chemotype 2) and b) insoluble in hexane (called CbM1Ihx for chemotype 1 and CbM2Ihx for chemotype 2). These fractions were tested at 310 µg/ml determining that the highest antispasmodic activity was in the fraction soluble in hexane of the both chemotypes (CbM1Shx and CbM2Shx). CbM1Shx examined by TLC showed mainly mammea type coumarins, and in the case of CbM2Shx chromanones. Thus, it was tested the relaxant activity of mammea A/BA and apetalic acid at three different concentrations (310, 100 and 31 µg/ml). These compounds were active in a non-competitive and concentration-dependent manner. These results demonstrate that secondary metabolites

from the leaves of two chemotypes of *C. brasiliense* are able to relax the contractility of the rat ileum, supporting scientifically its medical applications in traditional medicine.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han estado estrechamente ligadas a la historia del hombre no solo como alimento sino también como fuente de salud. Se calcula que cerca de tres cuartas partes de la población mundial usan remedios herbolarios de casi 20,000 especies con fines terapéuticos (Tagboto y Townson, 2001; OMS, 2002). El uso de las plantas como medicación alternativa o complementaria se ha incrementado de manera notable sobre todo en los países desarrollados producto de la globalización y el avance tecnológico que han permitido la difusión de preparaciones medicinales derivadas de plantas descritas como medicina tradicional o fitofármacos (Verpoorte, 2005). Este incremento en el interés público ha producido un aumento en las ventas mundiales de productos herbolarios que se estima en más de 100 000 millones de dólares anuales en el mercado mundial (Gilani y Atta-ur-Rahman, 2005). Bajo este contexto se sigue buscando en la biodiversidad principios activos que sean fuentes potenciales de fármacos (Basso *et al.*, 2005).

Algunas familias de Angiospermas son conocidas por ser fuentes ricas en metabolitos secundarios que exhiben un amplio rango de propiedades biológicas, como es el caso de Clusiaceae, con sus aproximadamente 1090 especies en 27 géneros (Stevens, 2007). Dentro de este grupo destacan los árboles tropicales del género *Calophyllum* (Stevens, 1980), muchos de estos con compuestos capaces de generar una respuesta anti-secretora, citoprotectora, antinociceptiva, antimicrobiana, moluscocida, citotóxica a varias líneas celulares tumorales e inhibidora de la transcriptasa reversa del VIH-1 atribuido a cumarinas, xantonas, flavonoides y triterpenos (Noldin *et al.*, 2006). Una de las especies más estudiadas de esta familia es *C. brasiliense* Cambess. Este árbol tropical está ampliamente distribuido desde México hasta el Brasil y ha sido usado por la medicina tradicional para el tratamiento de reumatismo, várices, hemorroides, úlceras crónicas, curación de heridas, dolor de muelas, “limpieza de la matriz”, afecciones de la piel, diarrea, diabetes y como vermífugo (Correa, 1984; García-Barriga, 1992; Soto-Núñez y Sousa, 1995; Leonti *et al.*, 2001; Mesía-Vela *et al.*, 2001). Algunos de los usos populares sugieren que los compuestos de esta especie podrían actuar sobre la contractilidad del útero, vasos sanguíneos e intestino. Investigaciones realizadas en el Brasil indicaron que el extracto metanólico de las hojas de *C. brasiliense* inhibió la respuesta contráctil inducida por



acetilcolina en íleon de cobayo y duodeno de rata, sin embargo se desconocen los principios activos (Emendörfer *et al.*, 2005). De acuerdo a estas evidencias el presente estudio se enfocó en la identificación de los compuestos con actividad antiespasmódica a partir de los extractos metanólicos de las hojas de *C. brasiliense* distribuido en México, que potencialmente podrían ser utilizados no solo en padecimientos gastrointestinales, sino también en otros padecimientos relacionados con alteraciones del tono y/o movilidad del músculo liso como son asma, enfermedad de vías aéreas obstructiva crónica, incontinencia urinaria, enfermedad diverticular, achalasia gastro-esofágica e hipertensión (Bermann y Gericke, 1990; Gericke *et al.*, 1991).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El músculo liso como modelo farmacológico

Los modelos animales (p. e. rata, ratón, cobayo, conejo, perro, oveja, cabra, cerdo, primate) son una herramienta de trabajo indispensable para la investigación biomédica porque permiten reproducir y evaluar bajo condiciones controladas algún fenómeno fisiológico sin poner en riesgo la salud humana (Svedsen y Hau, 1994; Rashid *et al.*, 2004). En este tipo de estudios se utilizan organismos íntegros (*in vivo*) o partes de estos, en un medio artificial (*in vitro* o *ex vivo*). Normalmente, los modelos *in vivo* están sujetos a mayor número de variables lo que en algunas ocasiones dificulta la interpretación de los datos obtenidos, bajo este contexto, la utilización de órganos y tejidos aislados aporta varias ventajas cuando se estudia a un presunto agente terapéutico, permitiendo la cuantificación precisa de la respuesta o efecto y modo de acción sin la interferencia de procesos de absorción y distribución así como de reflejo neuronal o retroalimentación humoral (Barastegui, 1976; Flórez, 2003).

El músculo liso es un tejido presente en buena parte de los órganos que constituyen el cuerpo de los animales y se ha convertido en un modelo adecuado para estudiar los mecanismos moleculares, celulares o alteraciones del fenómeno ubicuo de transducción de señales que mantienen la homeostasis celular (Somlyo y Somlyo, 1994). En farmacología este modelo se utiliza para evaluar el mecanismo de acción de los fármacos, principalmente en órganos aislados del sistema vascular, tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital de la rata, ratón y cobayo (Somlyo y Somlyo, 1994). A esta técnica se suma el conocimiento que se tiene en algunos fármacos que son agonistas o antagonistas de receptores específicos mediadores de funciones fisiológicas básicas y por tanto son indispensables durante el proceso de la investigación. Los más conocidos son la nicotina y la muscarina (agonistas selectivos pioneros para receptores nicotínicos y muscarínicos), la cocaína (inhibidor de la captura de catecolaminas), la yohimbina (bloqueador selectivo adrenérgico  $\alpha_2$ ) y la himbacina (prototipo de agente antimuscarínico cardioselectivo) (Gilani, 1998).

El modelo farmacológico consiste de segmentos denervados del órgano con musculatura lisa en un baño bajo condiciones fisiológicas controladas donde se mide la capacidad que tiene un fármaco para inducir la contractilidad o la inhibición del mismo en presencia de un antagonista o un agonista respectivamente. Estos cambios morfológicos y funcionales están relacionados con el mecanismo de señalización celular mediada por receptores (Barastegui, 1976; Flórez, 2003).

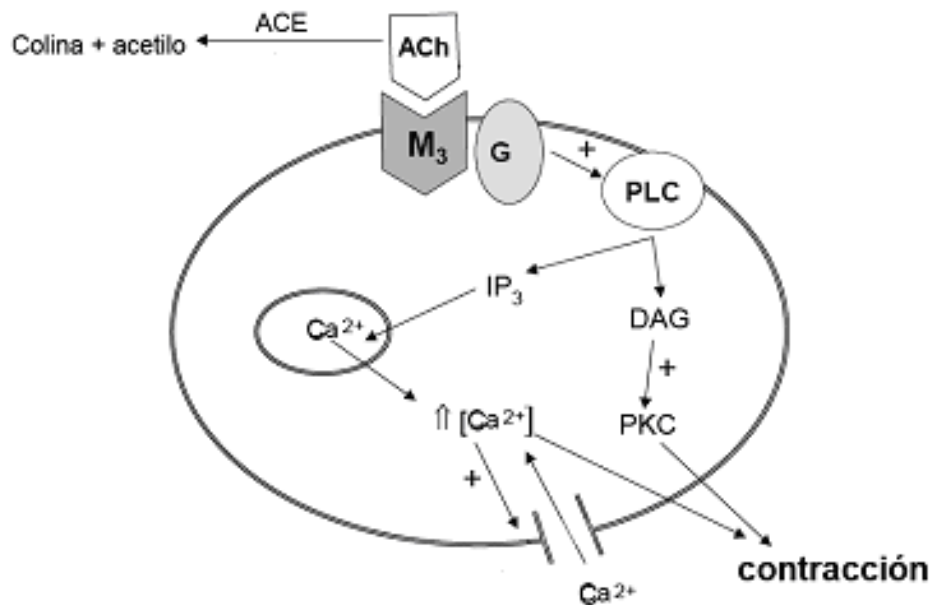
Una buena cantidad de estudios clínicos con plantas utilizadas contra el dolor abdominal y la diarrea muestran que los agentes terapéuticos actúan sobre la movilidad del tracto gastrointestinal. Es por esto que el músculo liso ha sido un modelo ampliamente empleado para la evaluación de los remedios herbolarios usados contra malestares gastrointestinales (Allescher, 2006).

### **2.1.1 Vías de señalización asociadas a la contracción de la musculatura lisa**

La contracción en las células del músculo liso se inicia cuando un receptor transmembranal acoplado a proteína Gq (proteína heterotrimérica conformada por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  unida a GTP) es activado por un ligando apropiado (p.e. norepinefrina, angiotensina II o vasopresina en el músculo vascular; carbacol en el traqueal; acetilcolina en el intestinal) que promueve un cambio conformacional, ocasionando al interior la liberación de la subunidad Gq $\alpha$ . Esta subunidad activa a la fosfolipasa C; una cinasa que específicamente hidroliza el fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) de la membrana lipídica en inositol-1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), los cuales actúan como segundos mensajeros. El IP<sub>3</sub> se encarga de liberar e incrementar los niveles intracelulares de calcio ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) al unirse a canales/receptores en el retículo sarcoplásmico. Por otro lado el DAG activa en la membrana plasmática a la proteína cinasa C la cual se encargara de amplificar la señal hacia diferentes moléculas efectoras (Horowitz et al., 1996; Murthy, 2006).

El gradiente de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> activa a la calmodulina y esta a su vez a las cinasas MLCK (miosina cinasas) las cuales se encargan de fosforilar a las cadenas ligeras de miosina generando un pico de contracción inicial conocido como fásico. Coordinadamente, la proteína cinasa C vía la cinasa ERK1/2 produce la activación de la fosfolipasa A citoplasmática (cPLA<sub>2</sub>).

Esta última, hidroliza a la fosfatidilcolina generando ácido araquidónico el cual dispara la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extra celular para desencadenar un segundo gradiente de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que produce la contracción sostenida o tónica. Todo este proceso es regulado negativamente por fosfatasas y fosfodiesterasas. (Véase Figura 1) (Horowitz *et al.*, 1996; Murthy, 2006). Dentro de estas intrincadas rutas los fármacos pueden actuar a diferentes niveles los cuales van desde receptores (con o sin proteínas G acopladas), enzimas efectoras (p. e. adenilato y guanilato ciclasas, fosfolipasas, cinasas y sintasas) hasta enzimas que finalizan la respuesta (p. e. fosfodiesterasas y fosfatasas) (Eyster, 1998).



**Figura 1. Mecanismo de señalización durante la contracción fásica inducida por acetilcolina (ACh) en célula de íleon (M<sub>3</sub>, receptor muscarínico; G, proteína G; IP<sub>3</sub>, inositol-1,4,5 trifosfato; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína cinasa C; Ca<sup>2+</sup>, calcio y ACE acetilcolinesterasa).**

Para el caso de la contracción del músculo liso intestinal, se ha descrito que este posee propiedades funcionales y regionales (p. e. duodeno, yeyuno, íleon, colon) que lo distinguen de los otros tipos de musculatura visceral y vascular (p. e. estomago proximal, esfínteres, vejiga biliar, vasos sanguíneos). Este tejido posee contracciones rítmicas y espontáneamente activas, con ciclos de despolarización y repolarización membranar denominados ondas lentas, que son generados por una compleja organización nerviosa

ubicada en la pared intestinal cuyo origen se encuentra en un ganglio conocido como el plexo de Auerbach en donde existen neuronas marcapasos (Tomita, 1981).

## **2.2 Las dolencias gastrointestinales**

A nivel mundial, las dolencias gastrointestinales son comunes y generalmente no severas o de baja importancia como para requerir atención médica; sí esta es recibida, normalmente los casos individuales no son tan relevantes para ser reportados. No obstante, la mayoría de estas inducen síntomas gastrointestinales agudos (Payment y Hunter, 2001).

### **2.2.1 Epidemiología de las dolencias gastrointestinales**

Varias son las causas de los padecimientos gastrointestinales destacando agentes parásitos como son los protozoarios *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora* spp y *Entamoeba histolytica*; las bacterias *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli*, *Aeromonas* spp, *Yersinia* spp y *Clostridium perfringens*; así como diferentes tipos de virus (enterovirus, rotavirus, parvovirus, adenovirus calicivirus y astrovirus). Estos patógenos pueden ser transmitidos de persona a persona, por zoonosis, en el alimento, agua y aire (Ellner, 1984; Goodman y Segreti, 1999).

Otros factores distintos a las infecciones que también causan diarreas y dolores agudos son la intolerancia a la leche y a la proteína de soya, cambios de dieta o exceso de nutrientes, por efecto colateral de un fármaco (especialmente antibióticos) o por envenenamiento con toxinas u otro tipo de sustancias (glutamato monosódico, mercurio orgánico, antimonio y cobre) que pueden presentarse en el agua y los alimentos (Payment y Hunter, 2001). La mayor cantidad de datos estadísticos publicados en relación a problemas gastrointestinales proviene de los Estados Unidos (50.2%) (Timmer *et al.*, 2001). En la mas reciente recopilación (Shaheen *et al.*, 2006) con datos del año 2002 se establece que aproximadamente dos millones de norteamericanos (60% mujeres y 40% hombres) recibieron atención médica u hospitalización por dolencias relacionadas con el aparato digestivo generándose gastos superiores a 40,000 millones de dólares en el tratamiento de estas enfermedades sobre todo en el rubro de los medicamentos con alrededor de 10,000 millones.

Entre los casos de malestares gastrointestinales el síntoma por excelencia fue el dolor abdominal (41%), seguido por la diarrea (13%) y el vomito (9%). El diagnóstico ofrecido con mayor frecuencia fue reflujo gastroesofágico (19%), ligeramente por encima de los espasmos intestinales (14%) y la gastroenteritis (12%). La mayor mortalidad por enfermedades gastrointestinales estuvo asociada al cáncer anal y colorectal (2.3%), cáncer pancreático (1.2%), cáncer esofágico (0.51 %) y cáncer de estomago (0.5%). En relación a estos datos los medicamentos con mayor demanda y venta fueron los antiácidos principalmente fármacos inhibidores de la bomba de protones (77%). Hasta el momento los estudios revelan que las enfermedades gastrointestinales suceden en un rango de 0.5-2 episodios por año por persona con una incidencia de 5-100 episodios por cada 1000 pacientes por semana dependiendo de la estación y la edad (Payment y Hunter, 2001).

### **2.2.2 Las plantas en el tratamiento de las dolencias gastrointestinales**

La mayoría de las plantas utilizadas contra padecimientos gastrointestinales caen en la categoría de antiespasmódicos y antidiarreicos. Algunas revisiones indican que estas plantas contienen agentes antimicrobianos, colinérgicos y bloqueadores de canales de calcio (Jabeen, 2001). El sinergismo produce el efecto terapéutico deseado tanto en constipaciones intestinales como en diarreas. A esta situación se suma la acción selectiva que presentan por un órgano en particular y en algunos casos su uso se extiende a desordenes cardiovasculares, asma, tos, labor prematura, úlceras gástricas y desordenes neurológicos (migraña, epilepsia, depresión y Alzheimer) (Gilani y Atta-ur-Rahman, 2005).

Por las condiciones precarias y de pobreza que tienen algunos países subdesarrollados son las plantas medicinales el mayor recurso para tratar las dolencias gastrointestinales (p. e. diarrea y disentería) que pueden llegar a causar morbilidad y mortalidad (OMS, 2002).

En América Latina el uso de la flora medicinal para contrarrestar los malestares gastrointestinales es extensiva, tan solo en México se utilizan como remedio cerca de 1000 de las 3100 plantas que constituyen la flora medicinal nacional (Argueta-Villamar *et al.*, 1994).

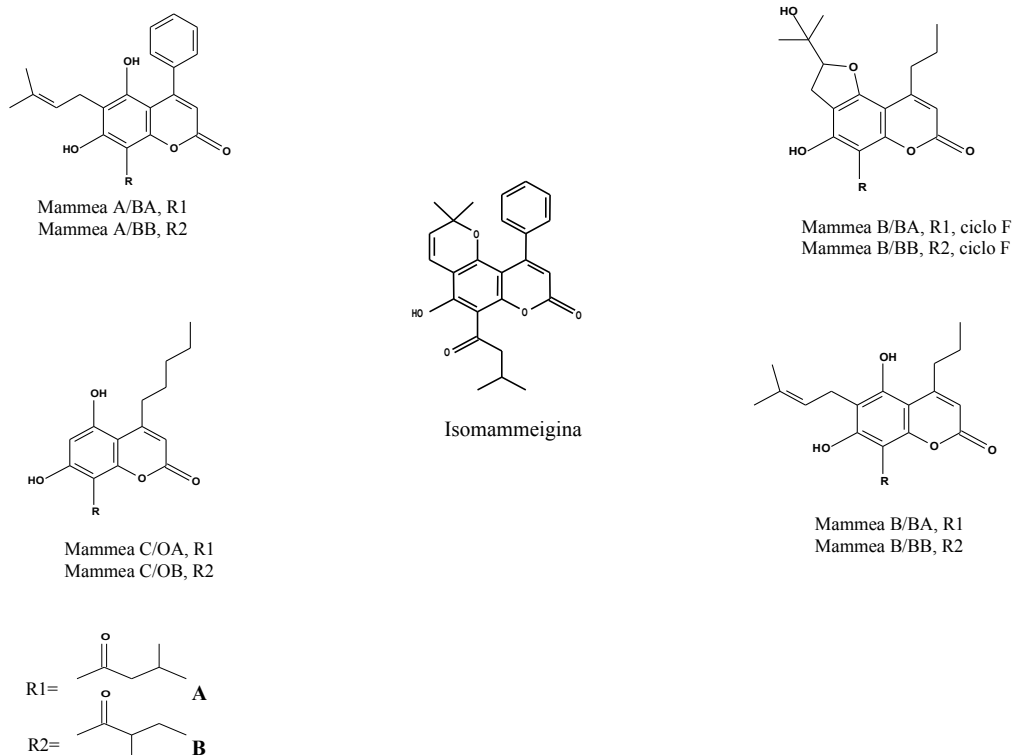
## **2.3 *Calophyllum brasiliense* Cambess**

### **2.3.1 Etnobotánica**

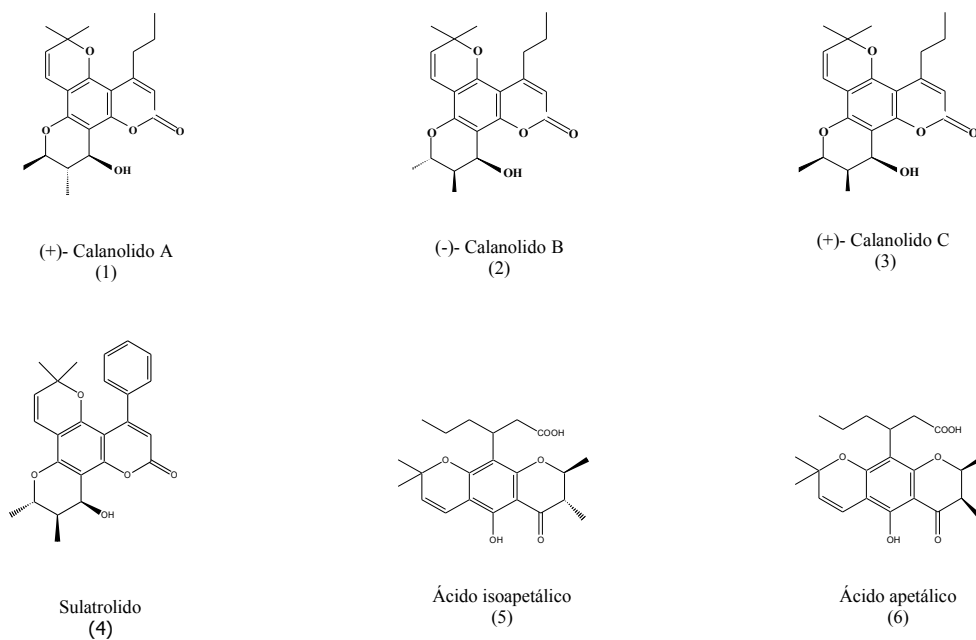
La especie *Calophyllum brasiliense* es un árbol tropical ampliamente distribuido desde México hasta el Brasil y ha sido usado por la medicina tradicional para el tratamiento de numerosos padecimientos. En México el cocimiento de la corteza se da a beber a las parturientas para la “limpieza de la matriz” (Soto-Núñez y Sousa, 1995) y el látex que mana del tronco se aplica contra afecciones de la piel, curación de heridas así como para el dolor de muelas (Leonti *et al.*, 2001). En Colombia, el látex es utilizado para la curación del ombligo de los recién nacidos (García-Barriga, 1992). En Perú la infusión de la corteza se usa para tratar la diarrea (Vásquez, 1990), En Guyana la infusión de la planta mezclada con *Coutarea hexandra* Schumann forma un preparado contra la diabetes y “gusanos” (Greenard *et al.*, 1987). En Brasil, la infusión de la corteza es empleada para tratar la diarrea, reumatismo, várices, hemorroides y úlceras crónicas (Correa, 1984; Guarim-neto, 1987; Guimarez *et al.*, 1993 citados por Mesía-Vela *et al.*, 2001). Otras aplicaciones en Sudamérica son: el tratamiento de bronquitis, trastornos gástricos y hepáticos (Sartori *et al.*, 1999), dolor (Lewis, 1977), inflamación, diabetes e hipertensión (Duke, 1994), herpes y reumatismo (Rutter, 1990). Muchos de los usos populares sugieren que los compuestos de esta especie podrían actuar sobre la musculatura lisa vascular y visceral.

### **2.3.2 Fitoquímica y farmacología**

Estudios realizados en México han mostrado que *C. brasiliense* presenta dos poblaciones (quimiotipos) que difieren en los constituyentes químicos de las hojas. El quimiotipo 1 presenta una serie de cumarinas del tipo de las mammeas; siendo el constituyente mayoritario la mammea A/BA (Reyes *et al.*, 2004a) (Figura 2). El quimiotipo 2 contiene diversas dipiranocumarinas tetracíclicas y cromanonas; principalmente el ácido apetalico (Huerta *et al.*, 2004) (Figura 3). Así mismo, en las hojas existen compuestos comunes entre ambos quimiotipos, como son los triterpenos canofilol y friedelina, el biflavonoide amentoflavona y el ácido protocatechuico (Huerta, *et al.*, 2004; Reyes, *et al.*, 2004; Aguilar, 2005) (Figura 4).

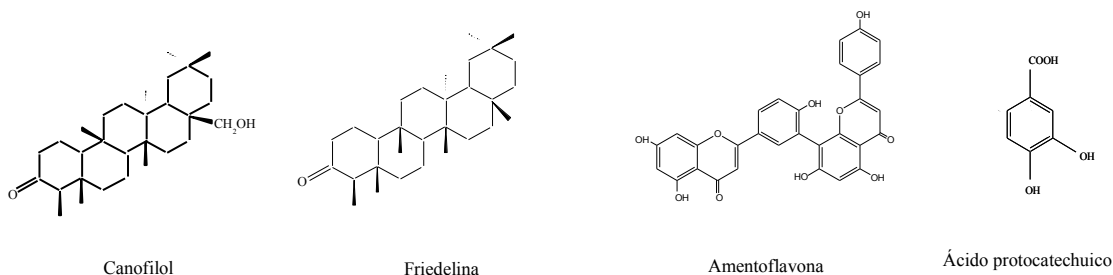


**Figura 2. Cumarinas del tipo de las mammeas aisladas de las hojas de *Calophyllum brasiliense* (Quimiotipo 1).**



**Figura 3. Dipiranocumarinas (1 – 4) y cromanonas (5 y 6) aisladas de las hojas de *Calophyllum brasiliense* (Quimiotipo 2).**





**Figura 4. Compuestos comunes presentes en las hojas de ambos quimiotipos de *Calophyllum brasiliense*.**

Algunos de estos compuestos exhiben importantes propiedades biológicas al ser evaluados *in vitro*. Las mammeas A/BA + A/BB, B/BA + B/BB y C/OA + C/OB son citotóxicas a las líneas tumorales humanas derivadas de linfoma K562, U251 derivada de sistema nervioso central y la línea celular derivada de próstata PC3, así mismo inhiben el crecimiento de las bacterias enteropatógenas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Bacillus subtilis* (Reyes *et al.*, 2004a). Recientemente se encontró que mammea A/BB presenta actividad antiproliferativa sin toxicidad aparente en macrófagos contra *Leishmania amazonensis* (Brenzan *et al.*, 2007). Por otra parte, las dipiranocumarinas tetracíclicas inhiben la transcriptasa reversa del VIH-1 (Huerta *et al.*, 2004). Las cromanonas, ácidos apetalico e isoapetalico tienen actividad citotóxica contra las líneas tumorales humanas derivadas de carcinoma epidermoide oral KB y sobre la línea derivada de carcinoma epitelioide cervical Hela (Shen, *et al.*, 2004). Sumado a lo anterior, también inhiben al hongo de importancia medica *Aspergillus fumigatus* (Hay *et al.*, 2003).

En un cernimiento realizado con 44 plantas brasileñas seleccionadas por uso popular como diuréticos y antihipertensivos, solo cinco de ellas presentaron actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), entre estas *C. brasiliense* (Braga *et al.*, 2007). Esta enzima cataliza la formación de angiotensina I en angiotensina II, una hormona que posee propiedades vasoconstrictoras y por tanto está encargada de mantener los niveles normales de presión sanguínea. Los extractos etanólicos de tallo y hojas *C. brasiliense* inhibieron en un 54.9% y 33.5%, respectivamente a la ECA. Los autores atribuyen la actividad inhibidora del extracto de hojas a los compuestos caracterizados en ellas;

amentoflavona, quercetina y sus glucósidos, cuya actividad contra la ECA ya ha sido probada y la del extracto de tallo a polifenoles, posiblemente xantonas que están presentes en esta especie y otras de la familia Clusiaceae (Braga *et al.*, 2007).

Investigaciones realizadas con plantas seleccionadas por sus antecedentes en la medicina tradicional del Brasil para tratar afecciones intestinales, tales como diarrea y espasmos, indicaron que dos especies presentan actividad antiespasmódica, una de ellas *C. brasiliense*. El extracto metanólico de las hojas de esta especie inhibió la respuesta contráctil inducida por acetilcolina, de manera no competitiva y dependiente de la concentración, en íleon de cobayo ( $IC_{50}$  1.47 mg/ml) y duodeno de rata ( $IC_{50}$  0.18 mg/ml). Sin embargo, hasta el momento se desconocen los principios activos responsables de esta actividad biológica (Emendörfer *et al.*, 2005).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antecedentes etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos del árbol *C. brasiliense* sugieren que algunos de sus compuestos podrían tener actividad sobre la musculatura lisa. En este sentido el presente trabajo pretende responder la siguiente interrogante:

¿Los metabolitos secundarios de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense* distribuido en México, tienen actividad antiespasmódica?

### 4. HIPÓTESIS

Las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense* contienen metabolitos secundarios capaces de disminuir la contractilidad espontánea e inducida del íleon de rata.

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense* sobre la contractilidad del íleon aislado de rata.

#### 5.1.1 Objetivos particulares

- Preparar los extractos metanólicos de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense* así como caracterizar químicamente los compuestos a ensayar.
- Evaluar el efecto los extractos, fracciones resultantes y compuestos caracterizados de ambos quimiotipos de *C. brasiliense* en la contractilidad del íleon aislado de rata.
- Establecer y comparar el efecto observado entre quimiotipos y proponer los compuestos responsables de la actividad biológica.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Preparación de los extractos y compuestos de *C. brasiliense*

#### 6.1.1 Material vegetal

Las hojas del árbol *Calophyllum brasiliense* Cambess, fueron colectadas en dos regiones del Estado de Veracruz, México. El quimiotipo 1 en la sierra de Santa Martha (Volcán de San Martín Pajapan) con depósito de espécimen número 437 en el Herbario del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana. En lo correspondiente al quimiotipo 2, su colecta fue realizada en zonas aledañas a la Reserva de Biología Tropical de la UNAM “Los Tuxtlas” depositándose un espécimen con el número 14425 en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en la ciudad de México.

#### 6.1.2 Extractos

Para obtener los extractos metanólicos de los quimiotipos 1 (CbM1) y 2 (CbM2) de *C. brasiliense* el material vegetal fue desecado en cámara húmeda. Respectivamente, estas hojas secas (250g) fueron maceradas (3 veces) en metanol (1L) a temperatura ambiente durante 24 horas. Las extracciones resultantes se concentraron bajo presión reducida en un evaporador rotatorio. Estos extractos se evaluaron en el modelo *in vitro* a un rango de concentración de 1000, 310, 100 y 31 µg/ml, disueltos en solución salina fisiológica (Krebs- Henseleit modificado: acetona (99:1)). Debido a su actividad los dos extractos metanólicos posteriormente se maceraron con hexano hasta agotar el producto obteniéndose de cada uno dos fracciones: a) soluble en hexano (CbM1Shx y CbM2Shx) y b) insoluble en hexano (CbM1Ihx y CbM2Ihx). Todas las fracciones resultantes fueron sometidas al modelo experimental a una concentración única de 310 µg/ml. Los dos extractos metanólicos y sus fracciones resultantes fueron analizados por cromatografía en capa fina (CCF) mediante cromatofolios de gel de sílice con base de aluminio (ALUGRAM®); fase normal (SIL-G/UV 254) y reversa (RP-18W/UV 254), en comparación con estándares de los compuestos mayoritarios aislados y caracterizados en anteriores investigaciones (Huerta *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2004a; Aguilar, 2005).

### 6.1.3 Compuestos

Durante todo el proceso de investigación los dos extractos metanólicos y sus fracciones resultantes fueron analizados mediante CCF usando como referencia los compuestos mayoritarios ácido apetalico, ácido protocatechuico, amentoflavona, canofilol, friedelina y mammea A/BA, los cuales fueron aislados y caracterizados mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear, infrarrojo, rotación óptica, espectrometría de masas y punto de fusión, como parte de otros estudios realizados con las hojas de *C. brasiliense* en el laboratorio 2-5 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (Huerta *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2004a; Aguilar, 2005).

Únicamente los metabolitos secundarios ácido apetalico, canofilol, friedelina y mammea A/BA fueron evaluados en el modelo *in vitro* a 310, 100 y 31µg/ml al ser identificados por CCF como componentes de las fracciones que resultaron más activas.

Otras sustancias empleadas durante los experimentos se usaron en grado analítico para la preparación de las diferentes soluciones:

- Anestésico: uretano (J. T. Baker<sup>®</sup>) en agua destilada 15g en 100ml (Rojas *et al.* 1997).
- Solución salina; Krebs- Henseleit modificado (Borrelli *et al.*, 2006): cloruro de sodio (NaCl) 119mM, cloruro de potasio (KCl) 4.75mM, fosfato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1.2mM, bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) 25mM, sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) 1.5mM, cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) 2.5mM y glucosa 11mM todos de la marca J. T. Baker<sup>®</sup>.
- Vehículo: solución stock Krebs- Henseleit modificado/ acetona (Sigma–Aldrich<sup>®</sup>) al 1%.
- Control positivo; espasmódico: solución stock de cloruro de acetilcolina (Sigma–Aldrich<sup>®</sup>) 1 x 10<sup>-5</sup> M en Krebs- Henseleit modificado.

## **6.2 Evaluación de la actividad farmacológica**

### **6.2.1 Animales**

Ratas albinas macho Wistar (*Rattus norvegicus*) con un peso aproximado de 250-300g fueron proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde son criadas y mantenidas en jaulas de plástico bajo condiciones controladas de luz (ciclos de luz/oscuridad de 12 hrs) y temperatura (23-25°C) con libre acceso al agua y alimento (Purina Chow). Los animales fueron condicionados al laboratorio por 48 horas previas al experimento y con alimento restringido las últimas 24 horas evitando así los contenidos intestinales. Las ratas se trataron conforme a la norma oficial mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

### **6.2.2 Preparación del modelo experimental**

Durante el experimento, las ratas fueron anestesiadas con uretano vía intraperitoneal (1.5g/Kg) (Rojas *et al.* 1997) e inmediatamente sacrificadas por desplazamiento cervical. Posteriormente, siguiendo el método de Magnus fue removido el íleon terminal a 2cm de la unión íleon-cecal. Previo al montaje se eliminó el tejido superfluo al íleon, así como de sus contenidos intraluminales, todo ello realizado en una caja Petri con solución salina fisiológica oxigenada a 37°C. Una vez limpio, el íleon se corto en segmentos transversales de 1cm libres de placas de Peyer. A cada segmento se le colocaron dos puntos opuestos de sujeción (asas de hilo), fijando uno de los extremos a la base de la cámara en el baño de órganos y el otro extremo al transductor isométrico. Simultáneamente, se probaron cuatro preparaciones ajustadas a una tensión inicial de 1g en cámaras de 15ml conteniendo Krebs-Henseleit modificado a 37°C con oxigenación constante de carbógeno (95% O<sub>2</sub> : 5% CO<sub>2</sub>) (Borrelli *et al.*, 2006). Los cambios en la tensión fueron transformados en señal eléctrica mediante un transductor FT03-C con la subsiguiente amplificación en un polígrafo Grass 79 (Medical Instruments, Quincy, Massachusset, USA) para finalmente ser digitalizados en un ordenador (Software TENSION 41). Dos de los cuatro canales se asignaron como controles y cada experimento fue repetido en tres ocasiones ( $n=6$ ).

Una vez acoplado el experimento, los segmentos de íleon se estabilizaron por un periodo mínimo de una hora con cambios graduales y constantes de la solución salina Krebs-Henseleit. Para confirmar la viabilidad y capacidad de contracción de los segmentos, se registró una curva acumulativa dosis-respuesta de acetilcolina ( $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M) previo a cada ensayo. Una vez eliminado el fármaco y transcurrido un periodo de recuperación de 20 minutos, se inició el experimento en ausencia (controles negativos) y presencia, según el caso, de los extractos (1000, 310, 100 y 31  $\mu\text{g/ml}$ ), fracciones (310  $\mu\text{g/ml}$ ) y compuestos (310, 100 y 31  $\mu\text{g/ml}$ ) incubados por 15 minutos. Para confirmar la funcionalidad de las preparaciones de íleon, al finalizar cada ensayo se realizó inmediatamente una nueva curva dosis-respuesta de acetilcolina. El vehículo disolvente de las sustancias a probar también fue adicionado a los baños asignados como control negativo, confirmando que la acetona al 1% en solución Krebs- Henseleit no afecta el desempeño experimental.

### **6.2.3 Análisis estadístico.**

Los datos generados se expresaron como las medias  $\pm$  error estándar (S. E. M.) de los porcentajes obtenidos teniendo como parámetro la contracción máxima generada por los segmentos de íleon inducidos por acetilcolina antes de la adición de alguno los tratamientos al baño de órganos.

Mediante el programa de computadora Origin 7.0<sup>®</sup>, las series de datos del control y los tratamientos fueron comparados (ANOVA) con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Rendimiento de los extractos metanólicos de *C. brasiliense*

Producto de la extracción de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense* y su posterior fraccionamiento se obtuvieron los siguientes rendimientos: CbM1 53.9%, CbM2 43.2%, CbM1Shx 32.3%, CbM1Ihx 65.9%, CbM2Shx 40.5%, CbM2Ihx 51.3%. (Véase figura 5).

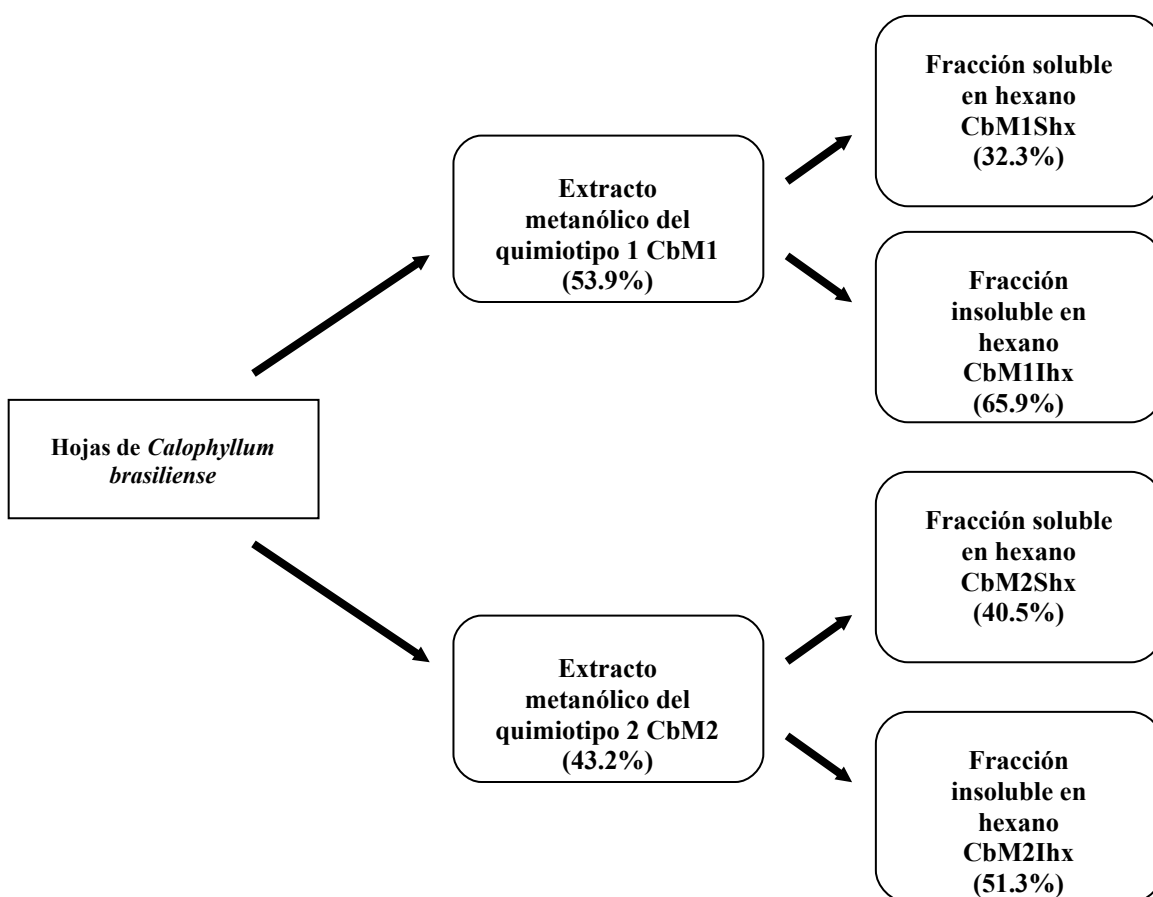


Figura 5. Diagrama de la elaboración de los extractos y fracciones de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *Calophyllum brasiliense*.

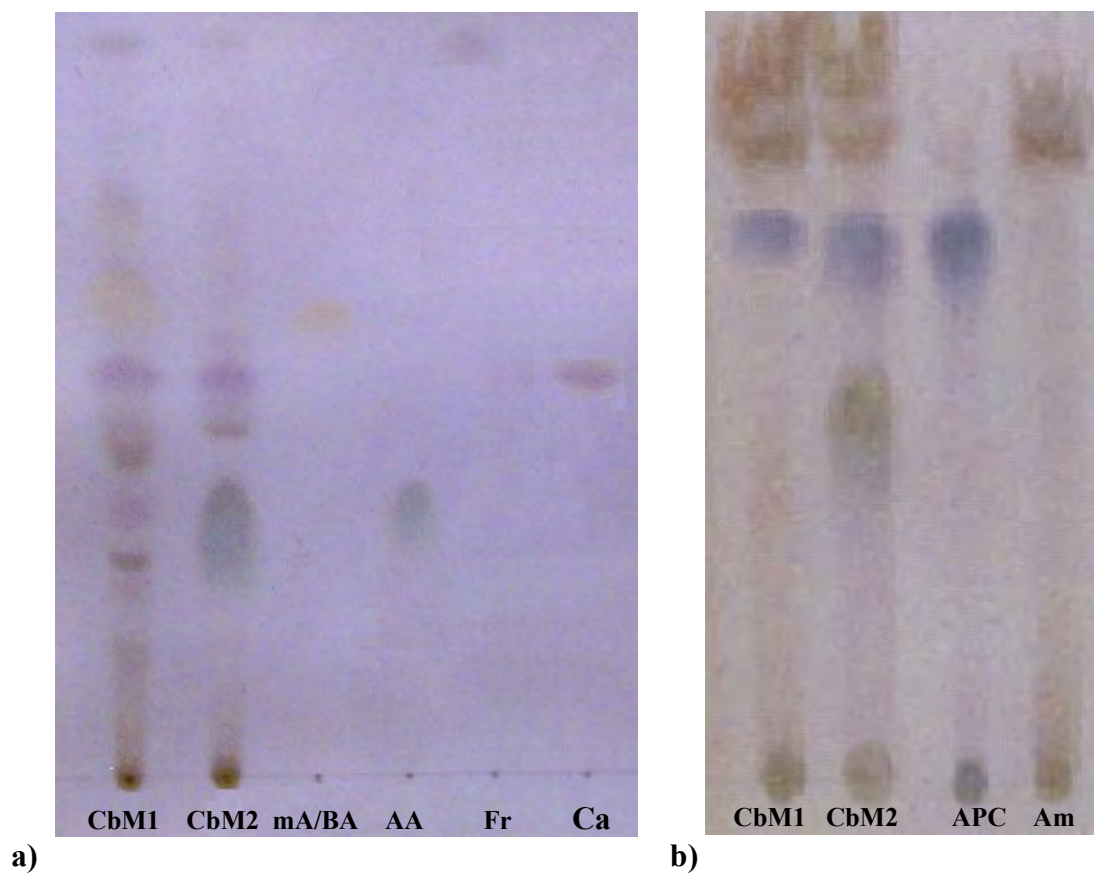


Estos extractos metanólicos así como sus fracciones resultantes revelaron la presencia de los compuestos mayoritarios: ácido apetalico, ácido protocatechuico, amentoflavona, canofilol, friedelina y mammea A/BA (Huerta *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2004a; Aguilar, 2005) (Cuadro 1). La identidad de estos compuestos fue reconocida por cromatografía en capa fina (CCF) usando cromatofolios de gel de sílice con base de aluminio (ALUGRAM®); fase normal (SIL-G/UV 254) y reversa (RP-18W/UV 254) (Figura 6).

**Cuadro 1. Compuestos presentes en los extractos metanólicos y fracciones resultantes de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense*.**

COMPUESTOS	EXTRACTOS					
	CbM1	CbM2	CbM1Shx	CbM1Ihx	CbM2Shx	CbM2Ihx
Ácido apetalico		+			+	
Ácido protocatechuico	+	+		+		+
Amentoflavona	+	+		+		+
Canofilol	+	+	+		+	
Friedelina	+	+	+		+	
Mammea A/BA	+		+			

+ indica la presencia del compuesto en el extracto

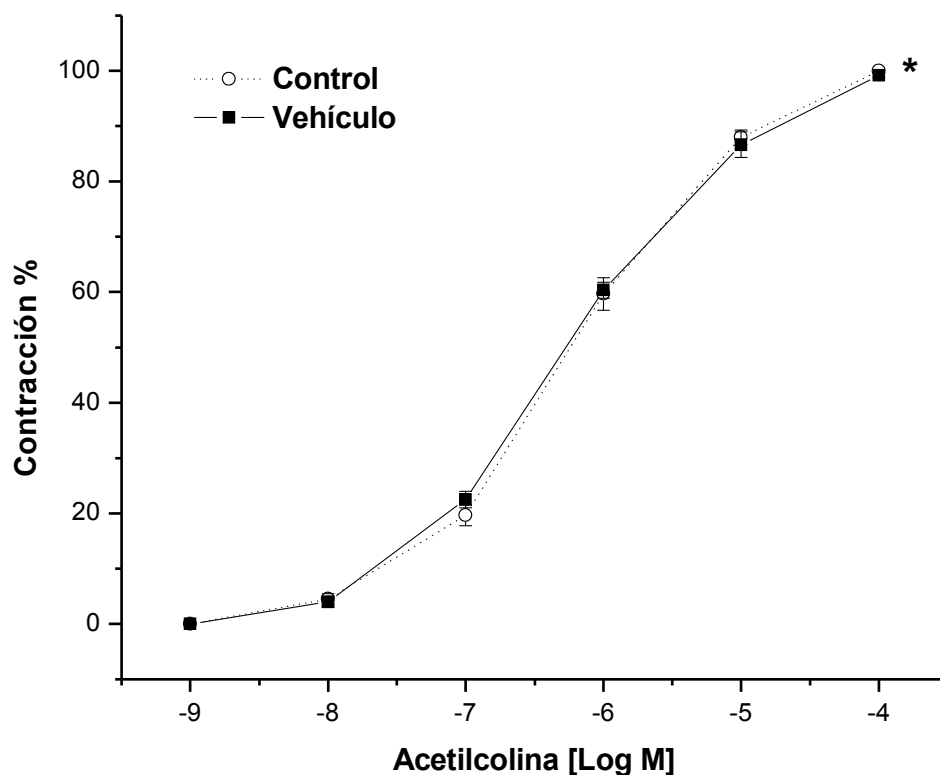


Extractos: CbM1, Metanólico quimiotipo 1; CbM2, Metanólico quimiotipo 2.  
 Compuestos: mA/BA, Mammea A/BA; AA, Ácido apetalico; Ca, Canofilol; Fr, Friedelina; APC, Ácido protocatechuico y Am, Amentoflavona.  
 Sistema: a) Fase normal 8:2 Hexano/Acetato de etilo. Revelador: Sulfato cérico. b) Fase reversa 9:1 Diclorometano / Metanol. Revelador: Cloruro férrico.

**Figura 6. Perfil cromatográfico en cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos y compuestos aislados de las hojas de los quimiotipo 1 y 2 de *Calophyllum brasiliense*.**

## 7.2 Actividad antiespasmódica de los extractos

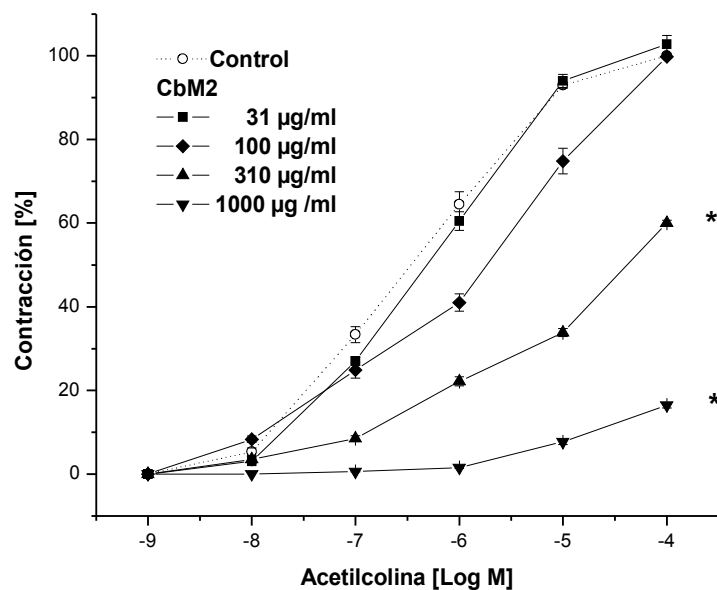
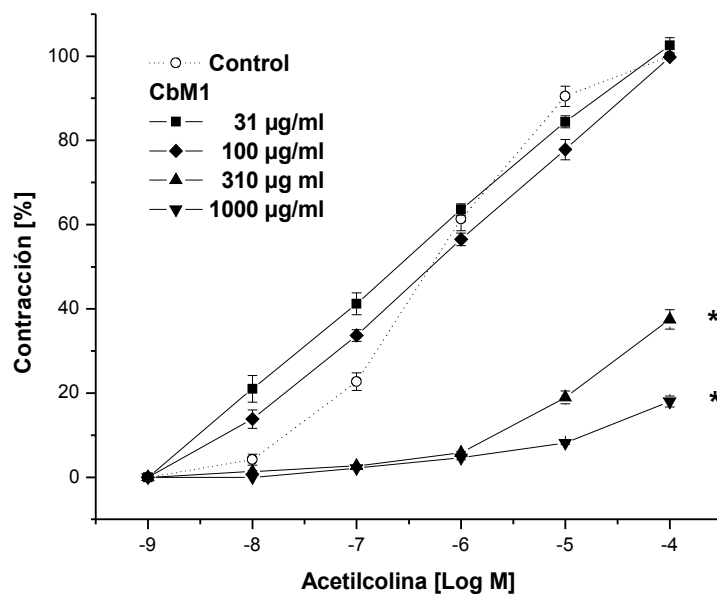
En primera instancia cabe resaltar que el disolvente o vehículo usado Krebs- Henseleit modificado-acetona (99:1) no cambia de manera significativa la contracción normal inducida por acetilcolina de los segmentos de íleon aislados de rata (Figura 7).



\* El tratamiento no es significativamente diferente al control  $P < 0.05$ .

**Figura 7. Curvas acumulativas dosis-respuesta de acetilcolina  $\pm$  S.E.M. en ausencia (control) y presencia de disolvente Krebs-Henseleit modificado-acetona (99:1) sobre el íleon aislado de rata.**

Los ensayos farmacológicos revelaron que los dos extractos metanólicos aislados de las hojas de *C. brasiliense*, correspondientes a los quimiotipos 1 y 2 presentan actividad espasmolítica de manera dosis dependiente y no competitiva en la contracción inducida al órgano aislado por acetilcolina. El extracto CbM1 relajó  $0.17 \pm 0.17\%$  a la concentración de  $100 \mu\text{g/ml}$ ,  $62.5 \pm 2.32\%$  a  $310 \mu\text{g/ml}$  y finalmente  $82 \pm 1.32\%$  a  $1000 \mu\text{g/ml}$ . Por su parte, el extracto CbM2 atenuó las contracciones del íleon aislado de rata en  $0.17 \pm 0.17\%$ ,  $40 \pm 0.68\%$  y  $83.5 \pm 0.67\%$  a las mismas concentraciones antes mencionadas respectivamente (Figura 8 y 9). Los valores de  $IC_{50}$  calculados para estos extractos fueron: CbM1  $301.35 \pm 3.09 \mu\text{g/ml}$  y CbM2  $381.14 \pm 2.80 \mu\text{g/ml}$  (Cuadro 2).



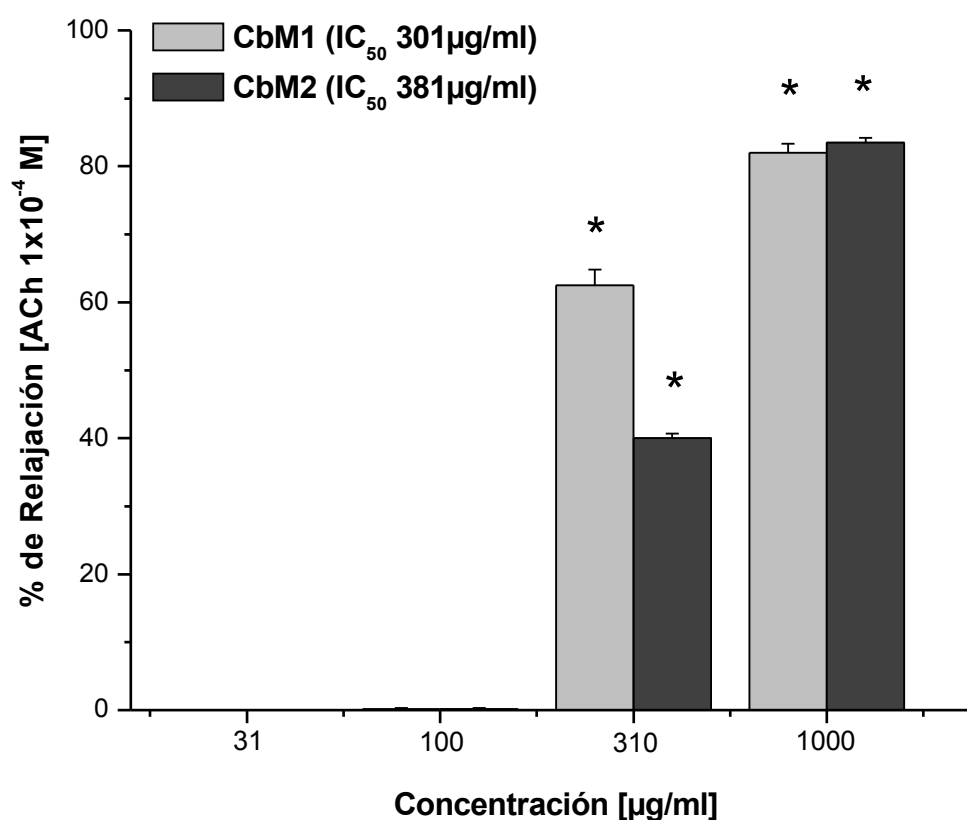
\* El tratamiento es significativamente diferente a el control en casi todos sus puntos  $P < 0.05$ .

**Figura 8.** Curvas acumulativas dosis-repuesta de acetilcolina  $\pm$  S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia del extracto metanólico de *C. brasiliense* quimiotipo 1 (CbM1) y 2 (CbM2) sobre el ileon aislado de rata.

**Cuadro 2. Efecto de los extractos metanólicos de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense* en la contracción inducida al ileon aislado de rata por acetilcolina.**

	Concentración inhibidora 50 (IC <sub>50</sub> ) (µg/ml)	Respuesta máxima en % (E <sub>max</sub> )
<b>CbM1</b>	<b>301.35±3.09</b>	<b>18±1.32</b>
<b>CbM2</b>	<b>381.14±2.80</b>	<b>16.5±0.67</b>

\* Los valores provienen de la media geométrica ± S.E.M. (n=6).

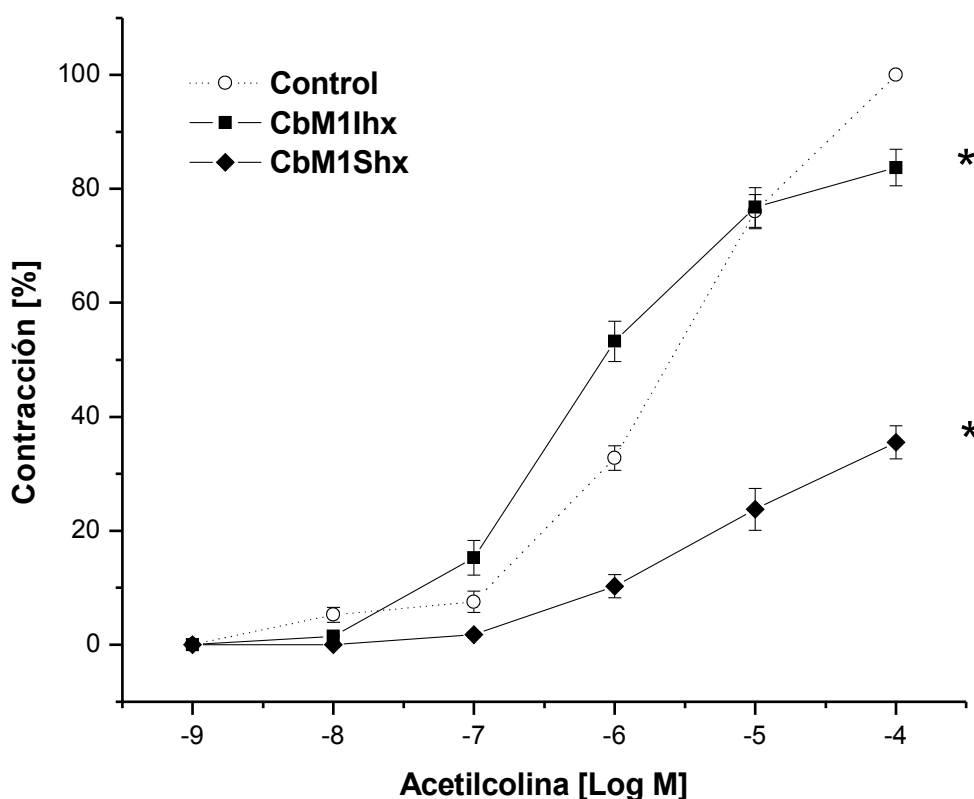


\* El tratamiento es significativamente diferente al control  $P < 0.05$ .

**Figura 9. Efecto relajante a diferentes dosis de los extractos metanólicos del quimiotipo 1 (CbM1) y 2 (CbM2) de *C. brasiliense* durante la contracción inducida por acetilcolina ± S.E.M. ( $1 \times 10^{-4}$  M) al ileon aislado de rata.**

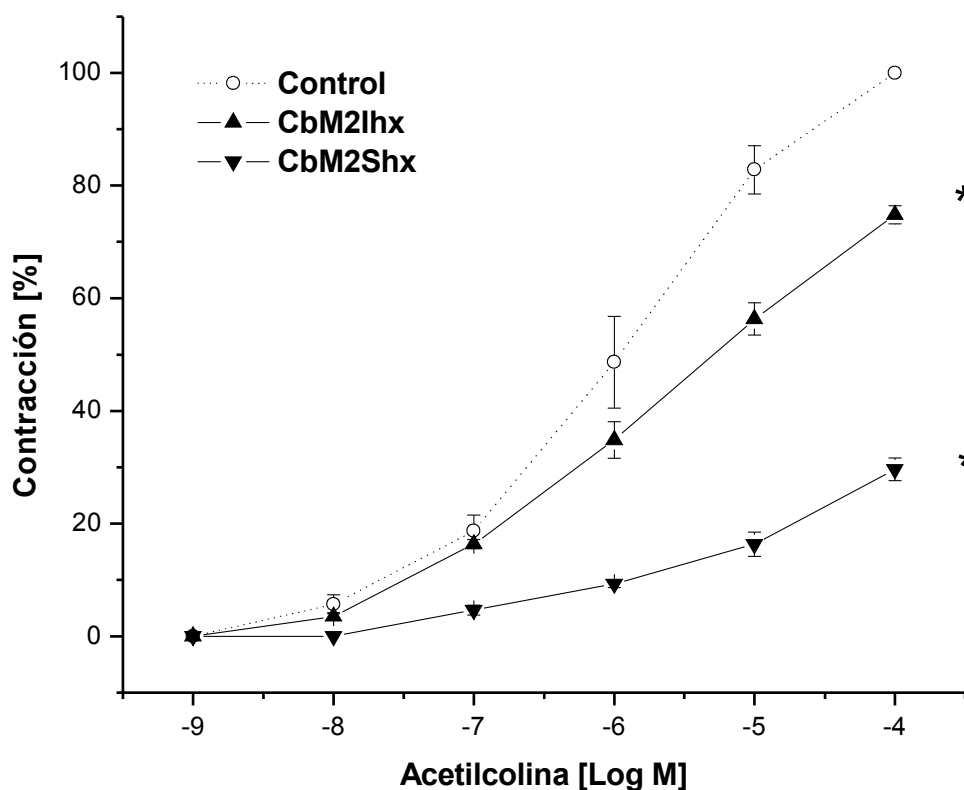
### 7.3 Actividad antiespasmódica de la fracciones

Con la finalidad de conocer la posible naturaleza de los componentes activos de cada uno de los extractos metanólicos, CbM1 y CbM2 fueron sometidos a un fraccionamiento con base a su polaridad obteniéndose fracciones solubles en hexano (CbM1Shx y CbM2Shx) e insolubles (CbM1Ihx y CbM2Ihx) (Figura 5). Teniendo en cuenta las  $IC_{50}$  resultantes y siguiendo el mismo sistema de concentraciones logarítmicas con base 10 se probaron las fracciones a 310  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 10 y 11).



\* El tratamiento es significativamente diferente a el control en casi todos sus puntos  $P < 0.05$ .

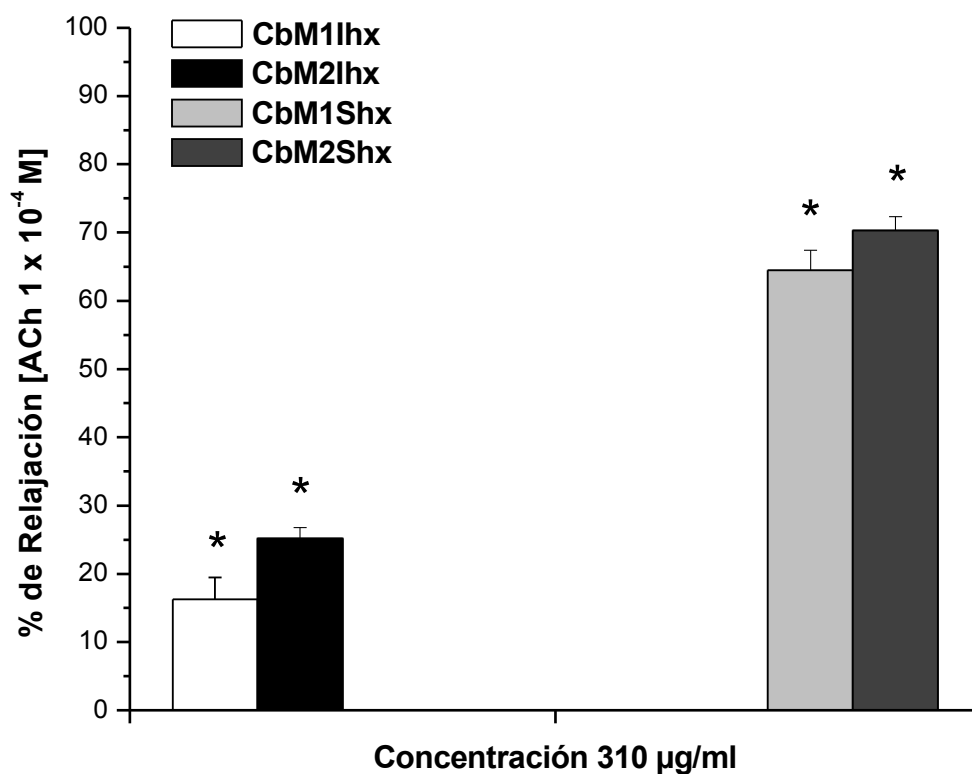
**Figura 10. Curvas acumulativas dosis-respuesta de acetilcolina  $\pm$  S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia a 310  $\mu\text{g/ml}$  de las fracciones soluble (CbM1Shx) e insoluble en hexano (CbM1Ihx) del extracto metanólico de *C. brasiliense* quimiotipo 1 (CbM1) sobre el ileon aislado de rata.**



\* El tratamiento es significativamente diferente a el control en casi todos sus puntos  $P < 0.05$ .

**Figura 11. Curvas acumulativas dosis-repuesta de acetilcolina  $\pm$  S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia a 310  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de las fracciones soluble (CbM2Shx) e insoluble en hexano (CbM2Ihx) del extracto metanólico de *C. brasiliense* quimiotipo 2 (CbM2) sobre el íleon aislado de rata.**

Las pruebas revelaron que la mayor actividad antiespasmódica en la contracción inducida por acetilcolina al íleon aislado de rata esta presente en las fracciones con componentes solubles en hexano de ambos quimiotipos. En este sentido, el porcentaje de relajación fue  $64.5 \pm 2.9$  para CbM1Shx y con CbM2Shx de  $70.3 \pm 2.03$  (Figura 12).

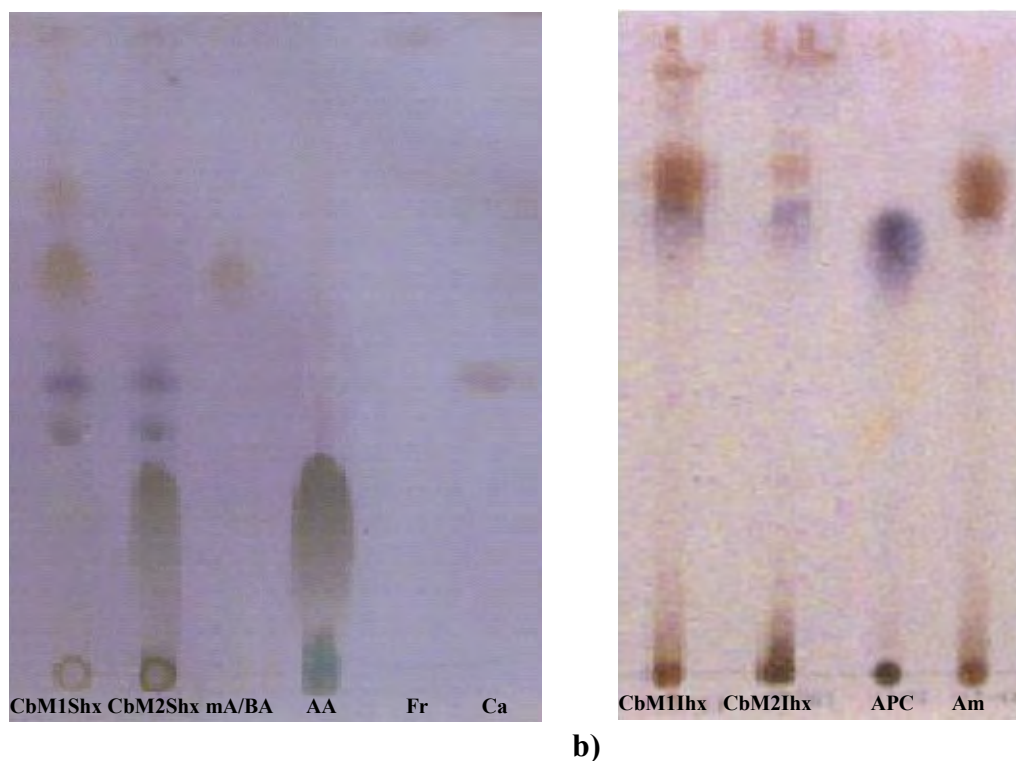


\* El tratamiento es significativamente diferente a el control  $P < 0.05$ .

**Figura 12.** Efecto relajante de las fracciones solubles (CbM1Shx y CbM2Shx) e insolubles en hexano (CbM1Ihx y CbM2Ihx) de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense* a 310 µg/ml en la contracción inducida por acetilcolina ± S.E.M. ( $1 \times 10^{-4}$  M) al ileon aislado de rata.

Las fracciones no polares CbM1Shx y CbM2Shx al ser analizadas por CCF fase normal revelaron un perfil muy similar al que se puede obtener extrayendo las hojas de *C. brasiliense* únicamente con hexano, es decir, una serie de cumarinas del tipo de las mammeas para el quimiotipo 1 en donde el compuesto mammea A/BA es el más abundante, contrastando con el quimiotipo 2, cuyo constituyente mayoritario es el ácido apétálico, que se observa en el cromatofolio como una gran mancha extendida desde el punto de aplicación característica de este ácido de cromanona. Otros componentes presentes comunes a estas fracciones son los triterpenos canofilol y friedelina (Figura 13).





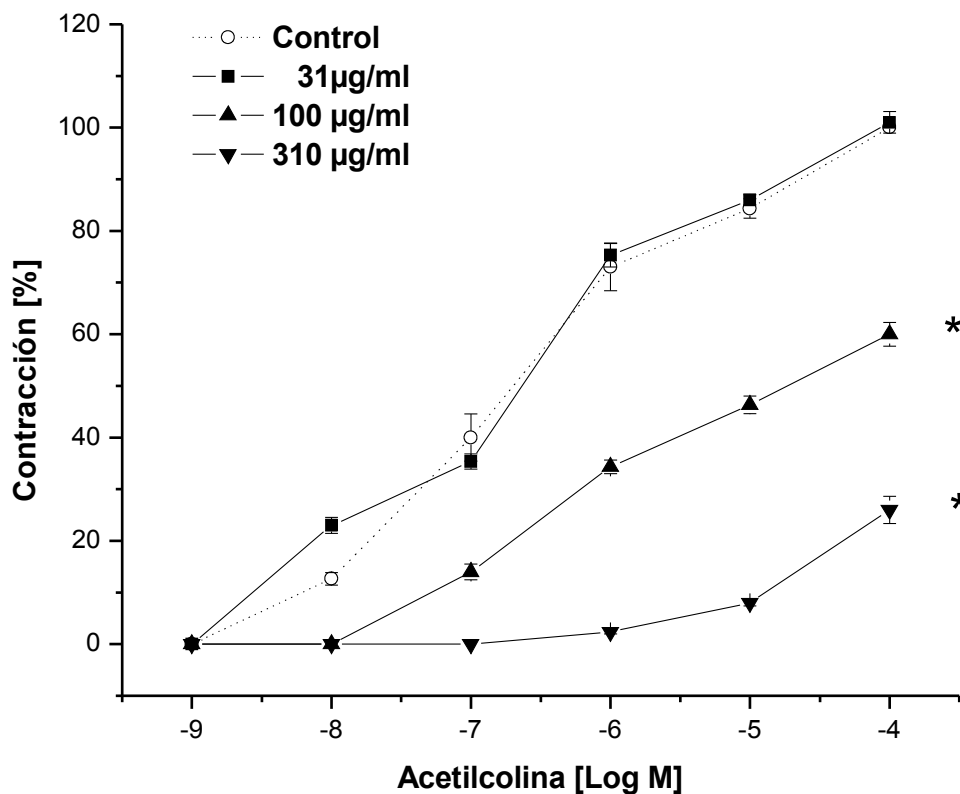
Fracciones: CbM1Shx, Soluble en hexano quimiotipo 1; CbM2Shx, Soluble en hexano quimiotipo 2  
 CbM1Ihx, Insoluble en hexano quimiotipo 1; CbM2Ihx, Insoluble en hexano quimiotipo 2.  
 Compuestos: mA/BA, Mammea A/BA; AA, Ácido apetalico; Ca, Canofilol; Fr, Friedelina; APC, Ácido protocatechuico y Am, Amentoflavona.  
 Sistema: a) Fase normal 8:2 Hexano/Acetato de etilo. Revelador: Sulfato cérico. b) Fase reversa 9:1 Cloroformo / Metanol. Revelador: Cloruro férrico.

**Figura 13. Perfil cromatográfico en cromatografía en capa fina de las fracciones solubles (CbM1Shx y CbM2Shx) e insolubles (CbM1Ihx y CbM2Ihx) y compuestos aislados de las hojas de los quimiotipo 1 y 2 de *C. brasiliense*.**

También fueron analizadas por CCF las fracciones insolubles en hexano CbM1Ihx y CbM2Ihx, ya que ambas presentaron actividad antiespasmódica aunque menos pronunciada en comparación con las fracciones solubles en hexano, con valores de relajación en porcentaje de  $16.25 \pm 3.2$  y  $25.16 \pm 1.62$  respectivamente (Figura 12). En estos perfiles fueron reconocidos un par de compuestos ya caracterizados en las hojas de *C. brasiliense* y comunes a otras plantas como son el ácido protocatechuico y el biflavonoide amentoflavona (Figura 13). Estos compuestos han sido ampliamente investigados sobre la musculatura lisa por lo que no fueron objeto de este estudio (Chakravarthy *et al.*, 1981 y Vasudeva y Sharma, 2008).

#### 7.4 Actividad antiespasmódica de los compuestos

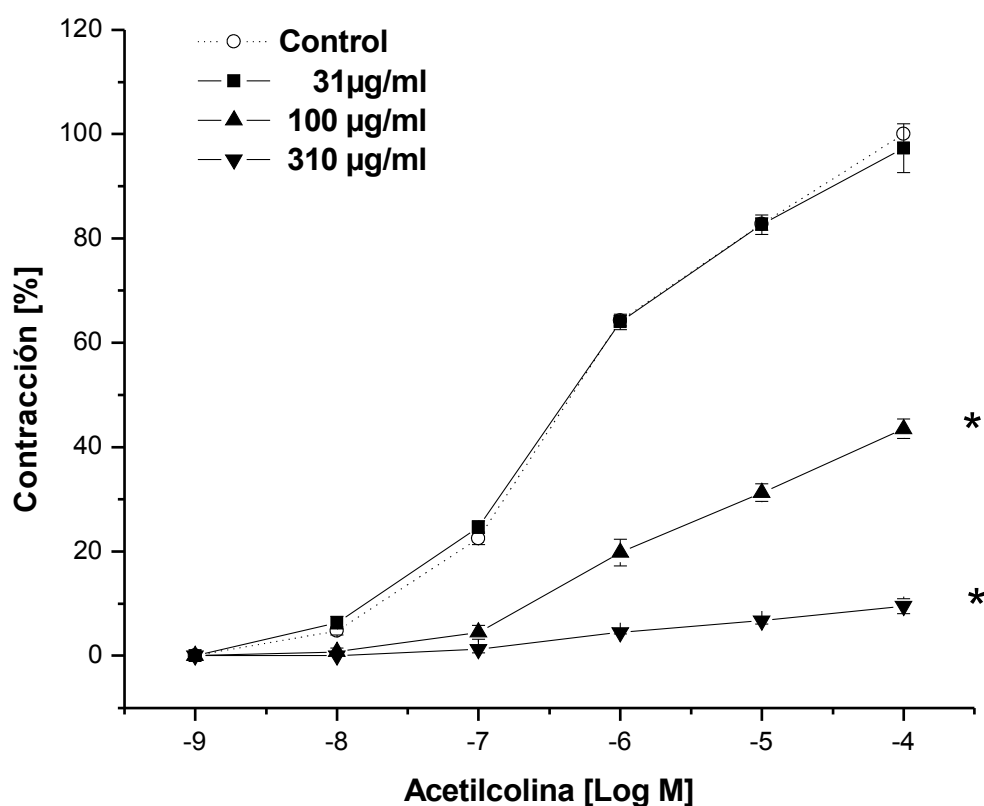
Con base en lo anterior, fueron probados en el modelo biológico los compuestos ácido apétálico, canofilol, friedelina y mammea A/BA a 310, 100 y 31  $\mu\text{g/ml}$ . De estos, solo la cumarina (Figura 14) y el ácido de cromanona (Figura 15) presentaron actividad espasmolítica dosis dependiente en la contracción colinérgica de los segmentos de íleon aislados de rata.



\* El tratamiento es significativamente diferente al control en casi todos sus puntos  $P < 0.05$ .

**Figura 14. Curvas acumulativas dosis-respuesta de acetilcolina  $\pm$  S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia de la mammea A/BA sobre el íleon aislado de rata.**

Ambos compuestos fenólicos alcanzaron porcentajes significativos de relajación a las concentraciones de 100 y 310  $\mu\text{g/ml}$ . Así, la mammea A/BA generó cifras correspondientes de inhibición de  $40\pm 2.31\%$  y  $74\pm 2.65\%$ , a diferencia del ácido apetalico el cual presentó mayor actividad espasmolítica con  $56.5\pm 1.85\%$  y  $90.5\pm 1.44\%$  respectivamente. Los valores calculados de concentración inhibidora 50 de estas sustancias, indica que el ácido apetalico es un antiespasmódico más potente ( $\text{IC}_{50}$  100  $\mu\text{g/ml}$ ) en comparación con la cumarina del tipo de las mammeas ( $\text{IC}_{50}$  145  $\mu\text{g/ml}$ ) (Cuadro 3 y figura 16).



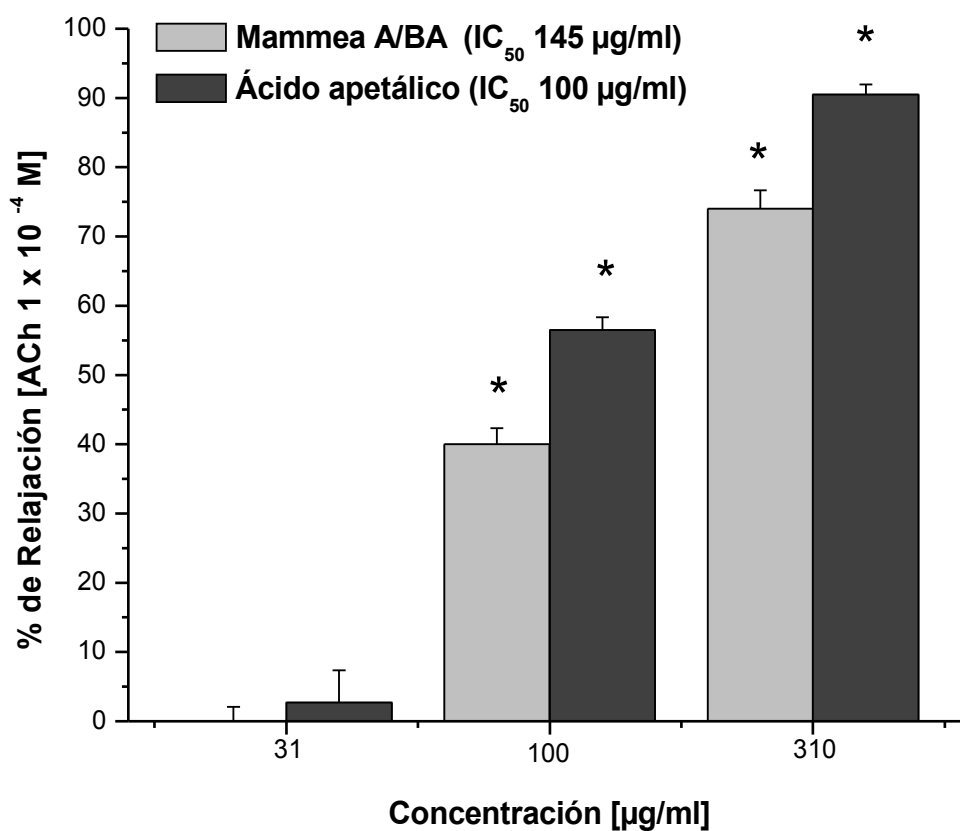
\* El tratamiento es significativamente diferente a el control en casi todos sus puntos  $P < 0.05$ .

**Figura 15. Curvas acumulativas dosis-respuesta de acetilcolina  $\pm$  S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia del ácido apetalico sobre el íleon aislado de rata.**

**Cuadro 3. Efecto de los compuestos aislados de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense* con actividad espasmolítica en la contracción inducida al íleon aislado de rata por acetilcolina.**

	Concentración inhibidora 50 (IC <sub>50</sub> ) (µg/ml)	Respuesta máxima en % (E <sub>max</sub> )
<b>Mammea A/BA</b>	<b>145.26±4.73</b>	<b>26±2.65</b>
<b>Ácido apetalico</b>	<b>100.26±6.11</b>	<b>9.5±1.44</b>

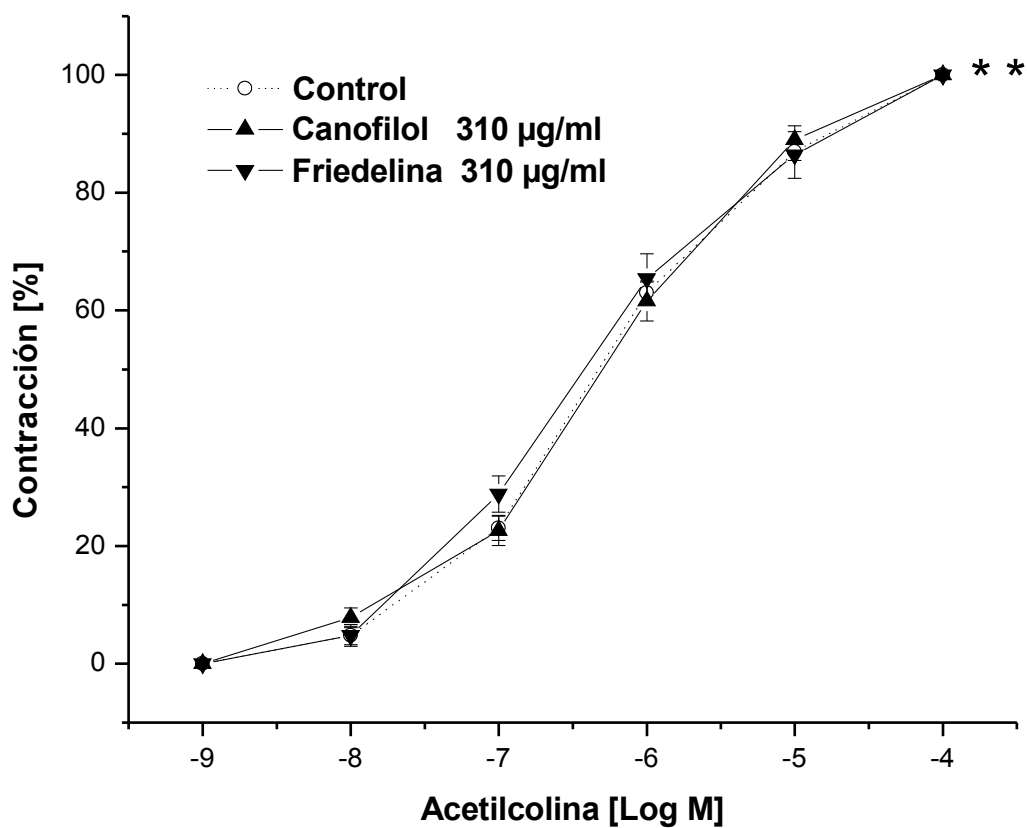
\* Los valores provienen de la media geométrica ± S.E.M. (n=6).



\* El tratamiento es significativamente diferente al control  $P < 0.05$ .

**Figura 16. Efecto relajante a diferentes dosis de los compuestos mammea A/BA y ácido apetalico durante la contracción inducida por acetilcolina ± S.E.M. ( $1 \times 10^{-4}$  M) al íleon aislado de rata.**

En lo correspondiente a los triterpenos canofilol y friedelina no presentaron ningún tipo de actividad espasmolítica (Figura 17).



\* El tratamiento no es significativamente diferente al control  $P < 0.05$ .

**Figura 17. Curvas acumulativas dosis-repuesta de acetilcolina  $\pm$  S.E.M. en ausencia (control negativo) y presencia de los triterpenos canofilol y friedelina sobre el íleon aislado de rata.**

## 8. DISCUSION

El tratamiento de la movilidad espástica sigue siendo un reto, debido en parte a la carencia que existe en el entendimiento de este desorden (Achem, 2004). A este hecho se suma que algunos de los fármacos utilizados como opción terapéutica presentan efectos colaterales no buscados como son, por ejemplo, boca seca y retención urinaria cuando se usan antimuscarínicos, o dolor de cabeza, náusea, vómito y constipación al emplearse bloqueadores de calcio. Por ello, las plantas son una opción en la búsqueda de antiespasmódicos seguros (Borrelli *et al.*, 2009).

Los antecedentes entobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos atribuidos al árbol tropical *Calophyllum brasiliense* permitieron plantear la hipótesis que en las hojas de esta especie se encuentran metabolitos secundarios capaces de actuar sobre la musculatura lisa del intestino delgado. Un estudio previo realizado en Brasil por Emendörfer y colaboradores (2005) demostró que el extracto metanólico de las hojas tiene actividad relajante sobre la contracción colinérgica en íleon de cobayo y duodeno de rata. En ambos modelos animales este efecto espasmolítico fue dependiente de la concentración y no competitivo. Aunque no se aislaron los principios activos los autores sugieren la posibilidad que la actividad es debida a cumarinas, como las que aislaron Reyes y colaboradores (2004a) de ejemplares mexicanos. Sin embargo, tan solo en México dicha especie presenta dos poblaciones que difieren en los constituyentes químicos de sus hojas, por lo cual son denominados como quimiotipo 1 (con cumarinas del tipo de las mammeas) (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004a) y quimiotipo 2 (con cromononas) (Huerta *et al.*, 2004).

Los resultados aquí obtenidos, muestran que los extractos metanólicos de las hojas de los quimiotipos 1 (CbM1) y 2 (CbM2) de *C. brasiliense* atenúan significativamente las contracciones espontáneas, así como las inducidas por acetilcolina, sobre el íleon aislado de la rata albina Wistar (*Rattus norvegicus*), de manera no competitiva y dependiente de la concentración. Este hecho coincide con las observaciones realizadas por los investigadores brasileños (Emendörfer *et al.*, 2005) a pesar de que nuestros datos fueron generados bajo

condiciones experimentales distintas por lo que no se pudieron hacer comparaciones precisas.

No obstante, al comparar el efecto entre los extractos metanólicos, podemos decir que el quimiotipo 1 (CbM1, IC<sub>50</sub> 301 µg/ml) resultó mas potente que el quimiotipo 2 (CbM2, IC<sub>50</sub> 381 µg/ml). Este hecho cambio al fraccionar dichos extractos con base a su polaridad en componentes solubles (CbM1Shx y CbM2Shx) y no solubles en hexano (CbM1Ihx y CbM2Ihx) observando dos tendencias: 1) Las fracciones solubles en hexano de ambos quimiotipos (CbM1Shx y CbM2Shx) fueron las más activas; 2) Las fracciones del quimiotipo 2, tanto la soluble (CbM2Shx) como la insoluble en hexano (CbM2Ihx) presentaron mayor efecto, en comparación a sus correspondientes fracciones homologas en el quimiotipo 1 (CbM1Shx y CbM1Ihx). Al analizar estas fracciones por cromatografía en capa fina junto con estándares de los compuestos mayoritarios aislados y caracterizados de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense*, se dedujo que la mayor actividad de dichos extractos se debe precisamente a los componentes en donde se establece la diferencia, es decir, los compuestos de naturaleza no polar, ya que los compuestos polares son los mismos entre ambos quimiotipos. Por esta razón, se llevaron a cabo ensayos farmacológicos con los compuestos mayoritarios mammea A/BA (quimiotipo 1) y ácido apétálico (quimiotipo 2); estos dos metabolitos secundarios de naturaleza no polar, relajaron el íleon aislado de rata de manera dosis dependiente y no competitiva en la contracción espontánea e inducida por acetilcolina, siendo el más potente el ácido apétálico (IC<sub>50</sub> 100 µg/ml) en comparación con la mammea A/BA (IC<sub>50</sub> 145 µg/ml).

Numerosos estudios sugieren que los compuestos fenólicos son de los metabolitos secundarios más activos sobre la musculatura lisa (Sansei, 1994; Harbore y Williams, 2000). Este grupo heterogéneo se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal (Strube *et al.*, 1993) presentando una vasta variedad de estructuras, entre las que sobresalen los ácidos fenólicos, taninos y flavonoides con múltiples efectos biológicos sobre la salud humana como son anticarcinogenos, anti-inflamatorios, antiespasmódicos, antioxidantes entre otros (Miller, 1996; Pietta *et al.*, 2003). Uno de los compuestos más conocidos, ya que es común a varias especies de plantas entre estas *C. brasiliense*, es el ácido

protocatechuico, este compuesto aromático de actividad antioxidante es inocuo sobre la contracción de la musculatura lisa (Vasudeva y Sharma, 2008). En contraste con el otro compuesto fenólico mayoritario de naturaleza polar presente en las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense* conocido como amentoflavona, este biflavonoide posee la capacidad de relajar de manera dosis dependiente el íleon aislado del cobayo (Chakravarthy *et al.*, 1981), así como el músculo liso vascular de aorta de rata vía dependiente de endotelio (Kang *et al.*, 2004). Con base en lo antes mencionado, es probable que esta sustancia sea la causante de la actividad observada con las fracciones polares de ambos quimiotipos CbM1Ihx y CbM2Ihx.

Otro grupo de compuestos fenólicos relacionados a los flavonoides son las 4-cromanonas (cromonas o 1,4 benzopironas), las cuales presentan propiedades físicas y biológicas interesantes (Kabbe y Widdig 1982) como por ejemplo la capacidad de modular los canales de potasio en una amplia variedad de tejidos incluidos el músculo liso en donde causan un efecto relajante por hiperpolarización de membrana celular (Bermann y Gericke, 1990; Gericke *et al.*, 1991). Estos análogos benzopiranos son capaces de antagonizar las contracciones inducidas por la bradicinina, 5-hidroxitriptamina y acetilcolina, pero no las producidas por la histamina cuyos receptores son escasos en el íleon aislado de rata (Basu *et al.*, 1981). No obstante, algunas de las 4-cromanonas son utilizadas para prevenir la respuesta asmática temprana y tardía inducida por alérgenos inhalados (p.e. polen) al evitar la liberación de la histamina y otros mediadores químicos involucrados en la respuesta inflamatoria (Holgate y Edwards, 2003). El ácido apetalico presenta un sistema 4-cromanona sustituida, el cual posiblemente sea el causante de su actividad antiespasmódica.

Dentro de la familia Clusiaceae a la que pertenece el género *Calophyllum* existen otros compuestos fenólicos, también derivados benzopiranos, de distribución limitada en tres géneros (*Calophyllum*, *Mammea* y *Mesua*) con actividad biológica importante, los cuales son conocidos como cumarinas del tipo de las mammeas o cumarinas isopreniladas (Yang *et al.*, 2006). Investigaciones llevadas a cabo con el extracto de diclorometano-metanol de la corteza del tronco de *Mammea africana* reveló que su fracción de diclorometano inhibe las contracciones inducidas por cloruro de potasio, así como por noradrenalina, en aorta de



cobayo y rata. Su actividad fue parcialmente disminuida al pre-tratar el órgano aislado con éster metílico de nitro-L-arginina conocido como L-NAME (inhibidor de la óxido nítrico sintasa), pero no por indometacina (inhibidor de la enzima ciclooxigenasa -COX- responsable de la síntesis de prostaglandinas), indicando que la actividad es mayor cuando está presente el endotelio. Los autores atribuyen este efecto vasorelajante a tres compuestos aislados de la fracción activa, identificados como mammea B/BB, A/AA y B/BA. (Dongmo *et al.*, 2007; Nguelefack-Mbuyo *et al.*, 2008).

Es conocido el hecho que el óxido nítrico es el principal neurotransmisor del sistema nervioso entérico, no adrenérgico ni colinérgico, reconocido más por su actividad en vasos sanguíneos aunque también participa en la relajación del tracto gastrointestinal (Salzman 1995; Michuru *et al.*, 2002). Con base en lo antes expuesto, es posible sugerir que la mammea A/BA posee un mecanismo de acción similar al observado en otros derivados benzopiranos, los cuales relajan al estimular la apertura de los canales de potasio ( $K^+$ ) por hiperpolarización, ya sea bloqueando directamente los canales de calcio tipo L, o indirectamente, vía óxido nítrico causando un incremento en la síntesis de GMP cíclico y evitando así la entrada de calcio a la célula. (Kanada *et al.*, 1992; Ijioma *et al.*, 1995).

Finalmente, por la actividad relajante que presentan varios tipos de derivados benzopiranos se ha propuesto su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas a alteraciones del tono y/o movilidad del musculo liso de pulmón, vejiga, intestino, útero y sistema cardiovascular como son: asma, enfermedad de vías aéreas obstructiva crónica, incontinencia urinaria, síndrome de intestino irritable, enfermedad diverticular, achalasia gastro-esofagial e hipertensión (Bermann y Gericke, 1990; Gericke *et al.*, 1991).

## 9. CONCLUSIONES

- ✓ Los extractos metanólicos de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense* presentan actividad antiespasmódica de manera dosis dependiente y no competitiva en la contracción espontánea e inducida por acetilcolina al íleon aislado de rata.
- ✓ La mayor actividad espasmolítica de los extractos metanólicos de las hojas está presente en ambos quimiotipos en las fracciones con componentes de naturaleza no polar.
- ✓ Los compuestos mayoritarios presentes en estas fracciones activas que relajaron la contracción colinérgica de los segmentos de íleon aislados de rata fueron: mammea A/BA para el quimiotipo 1 y ácido apetalico para el quimiotipo 2, ambos de manera no competitiva y dependiente de la concentración.
- ✓ Los resultados obtenidos apoyan el uso tradicional de las hojas de *C. brasiliense* para el tratamiento de diferentes padecimientos que involucran al músculo liso intestinal, como son la diarrea y trastornos gástricos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Achem S. R. 2004. Treatment of spastic esophageal motility disorders. *Gastroenterology Clinics of North America*. **33**:107-124.
- Adjanahounn J. E., Aboubakar N., Dramare K., Ebo M. E., Ekpere J. A. Enoworok E. G., Focho D., Gbile Z. O., Kamanyi A., Kamsu-Kom J., Keita N. K., Nancy W. L., Nkongmeneck B., Sabatie B., Sofowora A., Tamze V. y Wirmum C. K. 1996. **Traditional Medicine and Pharmacopoeia Contribution to Ethnobotanical and Floristic Studies in Cameroon**. CNPMS. Porto-Novo. 125Pp.
- Aguilar Bañuelos E. A. 2005. Efecto de los metabolitos secundarios de *Calophyllum brasiliense* en los hongos colonizadores de las hojas: estudio *in vitro*. **Tesis de Licenciatura**. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Allescher H. D. 2006. Functional dyspepsia – a multicausal disease and its therapy. *Phytomedicine*. **13**:2-11.
- Argueta-Villamar A., Cano-Asseleih L. M. y Rodarte M. E. 1994. **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista (INI). Vols. I-III**. Instituto Nacional Indigenista, México.
- Balunas M. J. y Kinghorn A. D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Science*. **78**:431-441.
- Barastegui A. C. 1976. **Esquemas y Prácticas de Farmacología**. Ed. Espaxs. España.
- Basso L.A., Da Silva L.H., Fett-Neto A.G., De Azevedo Jr. W.F., Moreira I. de S., Palma M.S., Calixto J.B., Astolfi Filho S., Dos Santos R.R., Soares M.B. y Santos D.S. 2005. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **100**:475-506.
- Basu D. K., Murty R. S. R. y Murty W. S. 1981. Structure-activity relationship of benzopyrones towards their anti-autacoid and anti-acetylcholine activity. *Indian Journal of Pharmacology*. **13**(2):185-194.
- Bergmann R. y Gericke R. 1990. Synthesis and antihypertensive activity of 4-(1,2-dihydro-2-oxo-1pyridyl)-2H-1-benzopyrans and related compounds, new potassium channel activators. *Journal of Medicinal Chemistry*. **33**(2):492-504.

- Borges F., Roleira F., Milhazes N., Santana L. y Uriarte E. 2005. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Current Medicinal Chemistry*. **12**(8):887-916.
- Borrelli F., Capasso F., Capasso R., Ascione V., Aviello G., Longo R. y Izzo A. A. 2006. Effect of *Boswellia serrata* on intestinal motility in rodents: inhibition of diarrhoea without constipation. *British Journal of Pharmacology*. **148**:553-560.
- Borrelli F., Borbone N., Capasso R., Montesano D., De Marino S., Aviello G., Aprea G., Masone S., y Izzo A. A. 2009. Potent relaxant effect of a *Celastrus paniculatus* extract in the rat and human ileum. *Journal of Ethnopharmacology*. **122**:434-438.
- Brenzan M. A., Nakamura C. V. Prado Dias Filho B., Ueda-Nakamura T., Young M. C. M. y Garcia Cortez D. A. 2007. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research*. **101**:715-722.
- Braga F. C., Serra C. P., Viana-Júnior N. S., Oliveira A. B., Côrtes S. F. y Lombardi J. A. 2007. Angiotensin-converting enzyme inhibition by brazilian plants. *Fitoterapia*. **78**: 353-358.
- Cassani J, Luna H. M., Magos G. A., Tato P. y Jiménez-Estrada M. 2006. Vasorelaxant effect of ethanolic extract from *Cecropia obtusifolia* in Guinea pigs aortic rings. *Planta Med*. **72**(11):1001.
- Chakravarthy B. K., Rao Y. V., Gambhir S. S. y Gode K. D. 1981. Isolation of amentoflavone from *Selaginella rupestris* and its pharmacological activity on central nervous system, smooth muscles and isolated frog heart preparations. *Planta medica*. **43**(9):64-70.
- Côrrea M. P. 1984. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro, Brasil. Pp 318-337.
- Dongmo A. B., Azebaze A. G. B., Nguetefack T. K., Ouahouo B. M., Sontia B., Meyer M., Nkengfack A. E., Kamanyi A. y Vierling W. 2007. Vasodilatador effect of the extracts and some coumarins from the ítem bark of *Mammea africana* (Guttiferae). *Journal of Ethnopharmacology*. **111**:329-334.
- Ellner P.D. 1984. Infectious diarrhoeal diseases. *Microbiology Series* **12**:1–175.

- Emendörfer F., Emendörfer F., Bellato F., Noldin V. F., Niero R. y Cechinel-Filho V. 2005. Evaluation of the relaxant action of some brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. **8**(1):63-68.
- Eyster K. M. 1998. Introduction to signal transduction: a primer for untangling the web of intracellular messenger. *Biochemical Pharmacology*. **55**:1927-1938.
- Fernandez J., Reyes-Chilpa R., Ponce H., Oropeza M., VanCalsteren M. R., Jankowski C.K. y Campos M. G. 2005. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D<sub>4</sub>-induced contraction in guinea-pig airways. *European Journal of Pharmacology*. **522** (1-3):108-115.
- Florez J. 2003. **Farmacología Humana**. Ed. Masson. España.
- Floriani-Noldin V., Buffon-Isaias D. y Cechinel-Filho V. 2006. Género *Calophyllum*: Importancia química e farmacológica. *Química Nova*. **29** (3):549-554.
- García-Barriga H. 1992. *Flora Medicinal de Colombia*. Tercer Mundo Editores. Bogotá, Colombia. Tomo 2. Pp 210-212.
- Gentry A. H. 1993. Tropical forest biodiversity and the potencial for new medicinal plants. *In*: A. D. Kinghorn y M. F. Balandrin (eds.). **Human Medicinal Agents from Plants**. American Society, Washington, D C. Pp 13-24.
- Gericke R., Harting J. Lues I. y Schittenhem C. 1991. 3-methyl-2H-1-benzopyran potassium channel activators. *Journal of Medicinal Chemistry*. **34**(10):3074-3085.
- Gilani A. H. 1998. novel developments from natural products in cardiovascular research. *Phytotherapy Research*. **12**:S66-S69.
- Gilani A. H. y Atta-ur-Rahman. 2005. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. **100**:43-49.
- Goodman L. y Segreti J. 1999. Infectious Diarrhoea. *Disease-a-Month*. **1**:268–299.
- Hay A. E., Guilet D., Morel C., Larcher G., Macherel D., Le Ray A. M., Litaudon M. y Richomme P. 2003. Antifungal chromans inhibiting the mitochondrial respiratory chain of pea seed and new xanthones from *Calophyllum caledonicum*. *Planta medica*. **69**:1130-1135.
- Harborne J. B. 2001. Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Products Reports*. **18**:361-379.

- Harvey A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*. **5**(7):294-300.
- Holgate S. T. y Edwards A. M. 2003. The chromones: cromolyn sodium and nedocromil sodium, *In*: N. F. Adkinson, J. W. Yunginger y W. W. Busse (eds.). **Middlenton's allergy: Principles and Practice**, 6<sup>th</sup> Ed, Mosby. St Louis, MO. Pp 915.
- Horowitz A., Menice C. B., Laporte R. y Morgan K. G. 1996. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiological Reviews*. **76**(4):967-1003.
- Huerta-Reyes M., Basualdo M., Fumiko A., Jiménez-Estrada M., Soler C. y Reyes-Chilpa R. 2004. HIV-1 Inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **27**(9):1471-1475.
- Ijioma S. C., Challis R. A. y Boyle J. P. 1995. Comparative effects of activation of soluble and particulate guanylyl cyclase on cGMP elevation and relaxation of bovine tracheal smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*. **115**: 723-732.
- Kanada A. F., Hata N., Suthamnatpong T., Maehara T., Ishii T., Takeuchi T., y Yagasaki O. 1992. Key roles of nitric oxide and cyclic GMP in nonadrenergic and noncholinergic inhibition in rat ileum. *European Journal of Pharmacology*. **216**:287-292.
- Kang D. G., Yin M. H., Oh H., Lee D. H. y Lee H. S. 2004. Vasorelaxation by amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Planta Medica*. **70**(8):718-722.
- Leonti M., Vibrans, H., Sticher O. y Heinrich M. 2001. *Proceedings of the 42nd annual meeting of the american society of pharmacognosy*. Oaxaca, México. Julio 14-18.
- Mesía-Vela S., Sánchez R. I., Estrada-Muñiz E., Alavez-Solano D., Torres-Sosa C., Jiménez-Estrada M., Reyes-Chilpa R. y Kauffman F. C. 2001. Natural products isolated from mexican medicinal plants, novel inhibitors of sulfotransferases SULT1A1 and SULT2A1. *Phytomedicine*. **8**:481-488.
- Michiru Y., Mayuko O., Yasuko Y., Kaori F., Akikasu F., Tadayoshi T., Fumiaki H. y Tadashi T. 2002. A possible role of neurotensin in NANC relaxation of longitudinal muscle of the jejunum and ileum of Wistar rats. *British Journal of Pharmacology*. **137**:629-636.

- Miller A. L. 1996. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alternative Medicine Reviews*. **1**:103-111.
- Murthy K. S. 2006. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annual Reviews of Physiology*. **68**:345-374.
- Nguelefack-Mbuyo P. E., Nguelefack T. B., Dongmo A. B., Afkir S., Azebaze A. G. B., Dimo T., Legssyer A., Kamanyi A. y Ziyat A. 2008. Anti-hypertensive effects of the metanol/methylene chloride stem bark extract of *Mammea Africana* in L-NAME-induced hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **117**(3):446-450.
- Organización mundial de La Salud (OMS). 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. *Organización Mundial de la Salud de Ginebra*. **57**:1-9.
- Payment P. y Hunter P. R. 2001. Endemic and epidemic infectious intestinal disease and its relationship to drinking water 4. In: L. Fewtrell y J. Bartram (eds.) **Water Quality: Guidelines, Standards and Health**. World Health Organization (WHO) IWA Publishing, London, UK.
- Pietta P., Minoggio M. y Bramati L. 2003. Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*. **28**:257-312.
- Rashid S. T., Salacinski H. J. Hamilton G. y Seifalian A. M. 2004. The use of animals models in developing the discipline of cardiovascular tissue engineering: a review. *Biomaterials*. **25**:1627-1637.
- Reyes-Chilpa R., Estrada-Muñoz E., Ramirez-Apan T. Amekraz B., Amuelas A., Jankowsky C., y Vázquez-Torres M. 2004a. Cytotoxic effects of *Mammea* type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Science*. **75**:1635-1647.
- Reyes-Chilpa R., Rivera J., Oropeza M., Mendoza P., Amekraz B., Jankowski C. y Campos M. G. 2004b. Methanol extracts of *Hamelia patens* containing oxindole alkaloids relax KCl-induced contraction in rat myometrium. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **27**(10):1617-1620.
- Rojas-Martinez R. L., Almirall-Collazo J. J. y Barber-Gutiérrez A. 1997. Mecánica respiratoria del conejo bajo la acción del uretano, el pentobarbital o la mezcla cloralosa-uretano. *Revista Cubana de Investigación Biomedica*. **16**(1):50-54.
- Salzman A. L. 1995. Nitric oxide in the gut. *New Horizons*. **3**(1):33-45.

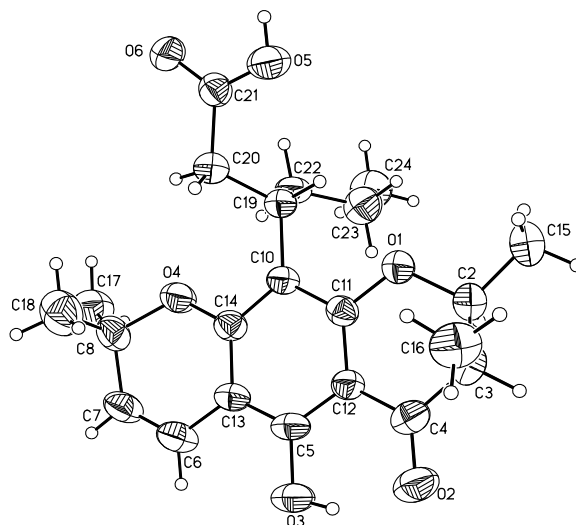
- Sansei N. 1994. Bioactive phenolic compounds in traditional medicines. *Pure and Applied Chemistry*. **66**:2263-2266.
- Sartori N. T., Canepelle D., de Sousa P. T. y Martins D. T. O. 1999. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*. **67**:149-156.
- Sato Y., Akao T., He J. X., Nojima H., Kuraishi Y., Morota T., Asano T. y Tani T. 2006. glycycomarin from glycyrrhizae radix acts as a potent antispasmodic through inhibition of phosphodiesterase 3. *Journal of Ethnopharmacology*. **105**(3):409-14.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, "NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio": (<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/062zoo.pdf>) Octubre 2010.
- Shaheen N. J., Hansen R. A., Morgan D. R., Gangarosa L. M., Ringel Y., Thiny M. T., Russo M. W. y Sandler R. S. 2006. The burden of gastrointestinal and liver disease, 2006. *American Journal of Gastroenterology*. **101**:2128-2138.
- Shen Y. C., Wang L. T., Khalil A. T. y Kuo Y. H. 2004. Chromanones and dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **52**(4):402-405.
- Somlyo A. P. y Somlyo A. V. 1994. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. **372**:231-236.
- Soto-Núñez J. C. Y Sousa M. 1995. *Plantas medicinales de la Cuenca del Río Balsas*. Cuadernos de Instituto de Biología # 25. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 198 Pp.
- Stevens P. F. 1980. A revision of the old world species of *Calophyllum* (Guttiferae). *Journal of the Arnold Arboretum*. **61**(2, 3):117-699.
- Stevens, P.F. 2007. Clusiaceae-Guttiferae. In: Kubitzki, K. (ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants**. Volume IX. Flowering Plants. Eudicots (Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p., Geraniales, Gunnerales, Myrtales, Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae Alliance, Pasifloraceae Alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae y Sabiaceae). Springer, Berlin. Pp. 48-66.



- Stepp J. R. 2004. The role of weeds as sources of pharmaceuticals. *Journal of Ethnopharmacology*. **92**:163-166.
- Strube M., Dragstedt L. O. y Larsen J.C. 1993. **Naturally occurring antitumourigens. Vol. I. Plant phenols.** The Nordic Council of Ministers. Copenhagen, Denmark.
- Suffredini I.B., Paciencia M. L., Nepomuceno D.C., Younes R.N. y Varella A. D. 2006. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts - Clusiaceae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **101**:287-290.
- Svedsen P. y Hau J.1994. **Handbook of Laboratory Animal Science: Animal Models. Vol.II.** CRC Press Inc. Boca Raton, F L. 224 Pp
- Tagboto S. y Townson S. 2001. Antiparasitic properties of plant medicinal and other naturally occurring products. *Advances in Parasitology*. **50**:199-295.
- Timmer A., Hilsden R. J. y Sutherland L. R. 2001. Determinants of abstract acceptance for digestive disease week - a cross sectional study. *BMC Medical Research Methodology*. **1**:6-13.
- Tomita T. 1981. Electrical activity (spikes and slow wave) in gastrointestinal smooth muscles. *In*: E. Bülbbring, A. F. Brading, A. W. Jones y T. Tomita (eds.). **Smooth Muscle**. Ed. Edward Arnol. London. Pp 127-156.
- Vasudeva N. y Sharma S. K. 2008. Biologically active compounds from the genus *Hibiscus*. *Pharmaceutical Biology*. **46**(3):145-153.
- Verpoorte R. 2005. Perspectives of ethnopharmacology. *Journal of Medicine*. **100**:1-2.
- Yang H., Jiang B., Reynertson K. A., Basile M. J. y Kennelly E. J. 2006. Comparative analyses of bioactive mammea coumarins from seven part of *Mammea americana* by HPLC-PDA with LC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**(12):4114-4120.

# **I. APÉNDICE COMPUESTOS**

## Ácido apetalico.



**C<sub>22</sub>, H<sub>28</sub>, O<sub>6</sub>, cristales amarillos, p. f. 121-123.**

$[\alpha]_D^{25} = +0.034^0$  ( $c=2$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). UV (MeOH)  $\lambda$  max nm (log  $\epsilon$ ): 2.74 (4.33) y 298 (3.95).

IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$ : 3.516 (OH); 2979; 2932 y 2872 (CH), 1742 (COOH), 1706 (C=O), 1625 (C=C), 1450 (CH<sub>2</sub>), 1385 (CH<sub>3</sub>) y 1293 (C-O) cm<sup>-1</sup>. FAB-MS  $m/z$ : 389 (M<sup>+</sup> +1), 373, 329.

Datos de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Protón	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento $J$ (Hz)	Número de H
CH <sub>3</sub> -24	0.85	t	7.2	3
CH <sub>3</sub> -16	1.13	d	7.5	3
H-23	1.21	m	-	2
CH <sub>3</sub> -15	1.35	d	6.6	3
CH <sub>3</sub> -18	1.37	s	-	3
CH <sub>3</sub> -17	1.45	s	-	3
H-22	1.53	m	-	1
H-22	1.83	m	-	1
H-3	2.55	cd	(7 y 3)	1
H20	2.66	dd	(14.8 y 6.6)	1
H20'	2.83	dd	(14.8 y 8.5)	1
H19	3.69	m	-	1
H-2	4.50	cd	(6.2 y 3.6)	1
H-7	5.46	d	9.9	1
H-6	6.60	d	9.9	1
OH-5	12.39	s	-	1

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apq  
 Dr. Ricardo Reyes / Eduardo Aguilar  
 Clave: Ap  
 Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
 Hidrogeno-1  
 Eclipse 300 MHz Jeol (P)  
 6-12-2007  
 No. Reg. 3544

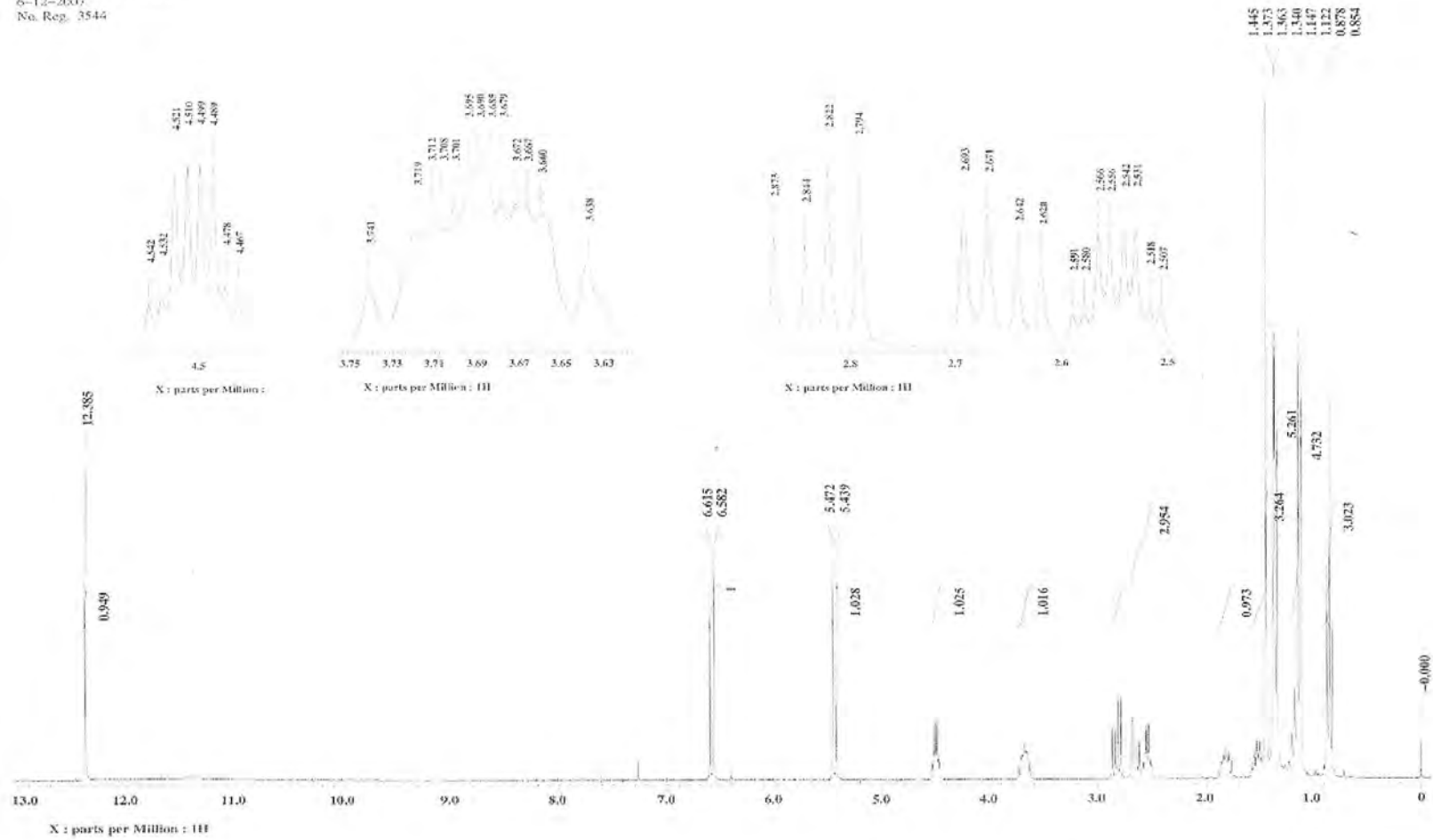
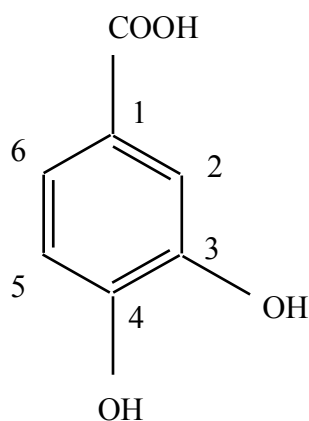


Figura 18. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del Ácido apético.

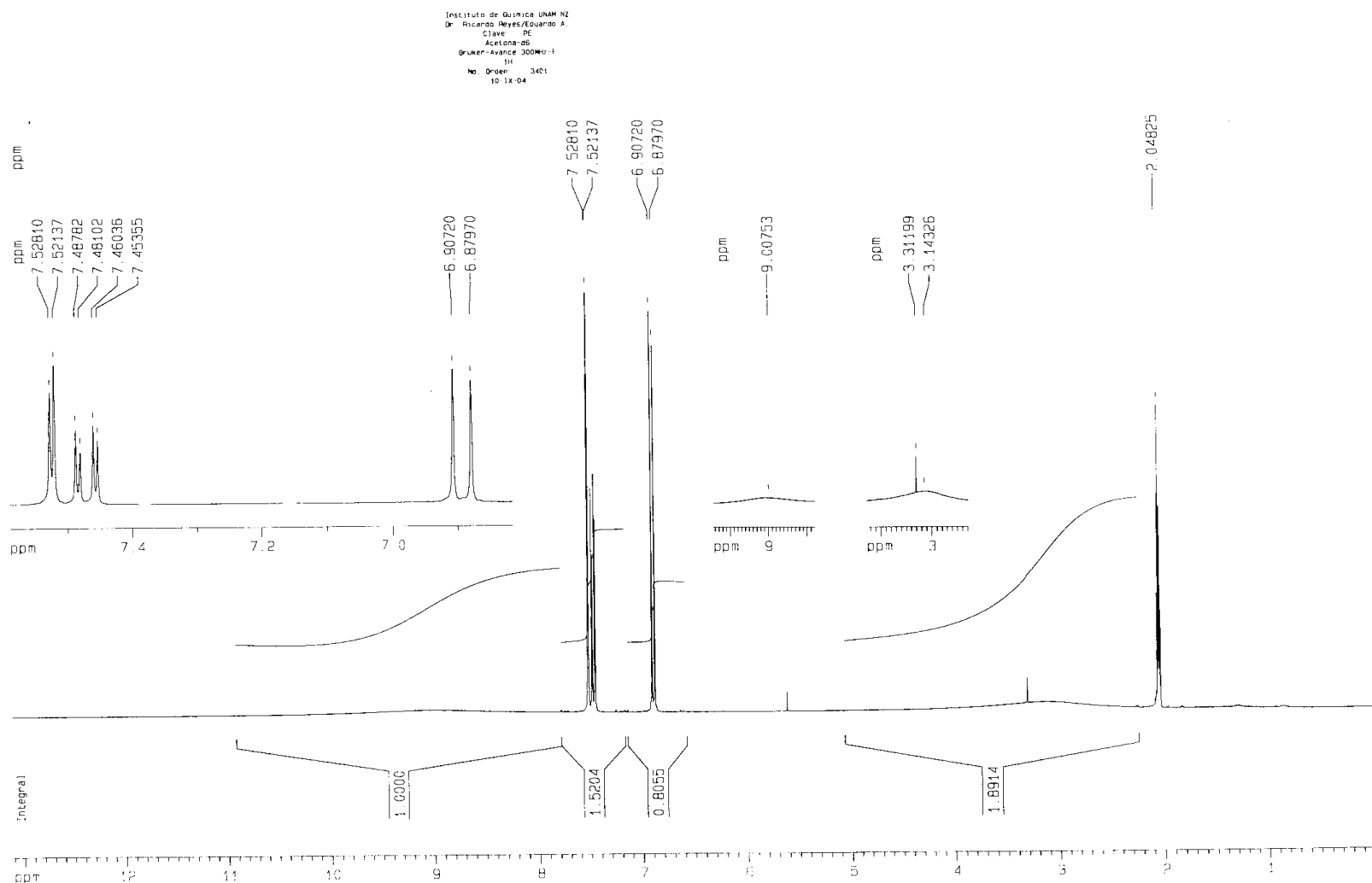
Ácido protocatechuico (3,4 Ácido dihidroxibenzoico).



$C_7$ ,  $H_6$ ,  $O_4$ , sólido blanco, p.f. 197-203.

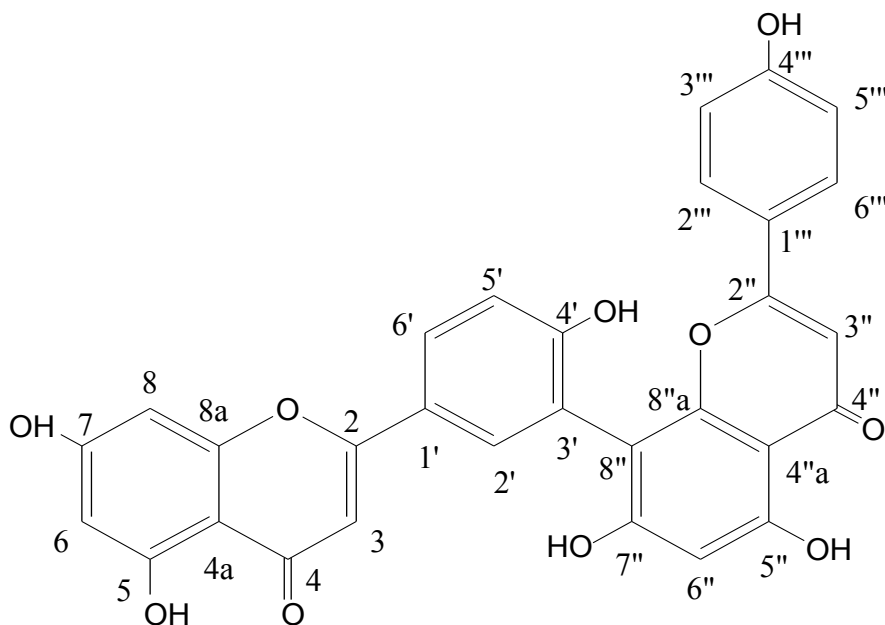
Datos de RMN  $^1H$  (300 MHz, Acetona D6).

Protón	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento $J$ (Hz)	Número de H
H-5	6.89	d	8.25	1
H-6	7.47	dd	2.04 y 8.2	1
H-2	7.52	d	2	1
OH	9.00	s	-	1



**Figura 19. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del Ácido protocatechuico.**

## Amentoflavona



$C_{30}$ ,  $H_{18}$ ,  $O_{10}$ , polvo amorfo amarillo pálido, p. f. 254-256.

IR (KBr)  $\nu_{max}$ : 3380, 3172, 2923, 1657, 1611, 1570, 1428, 1360, 1287, 1167, 1030 y 947  $cm^{-1}$ .

Datos de RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ).

Protón	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento $J$ (Hz)	Número de H
H-6	6.18	d	2.5	1
H-6''	6.39	s	-	1
H-8	6.45	d	2.5	1
H-3''' y H-5'''	6.70	d	9.0	2
H-3''	6.77	s	-	1
H-3	6.81	s	-	1
H-5'	7.13	d	9.0	1
H-2''' y H-6'''	7.56	d	9.0	2
H-6'	7.98	dd	(9.0 y 2.5)	1
H-2'	8.00	d	2.5	1
OH-5	12.96	s	-	1
OH-5''	13.09	s	-	1

Instituto de Quimica. UNAM (H.Rios)  
Dr-R-Reyes-Ch./E-Aguilar  
Clave: AMF  
No-registro: 51  
Experimento-Hidrogeno  
Disolvente-DMSO-d6  
VarianUnity-300MHz(D)  
Ene-11-2008

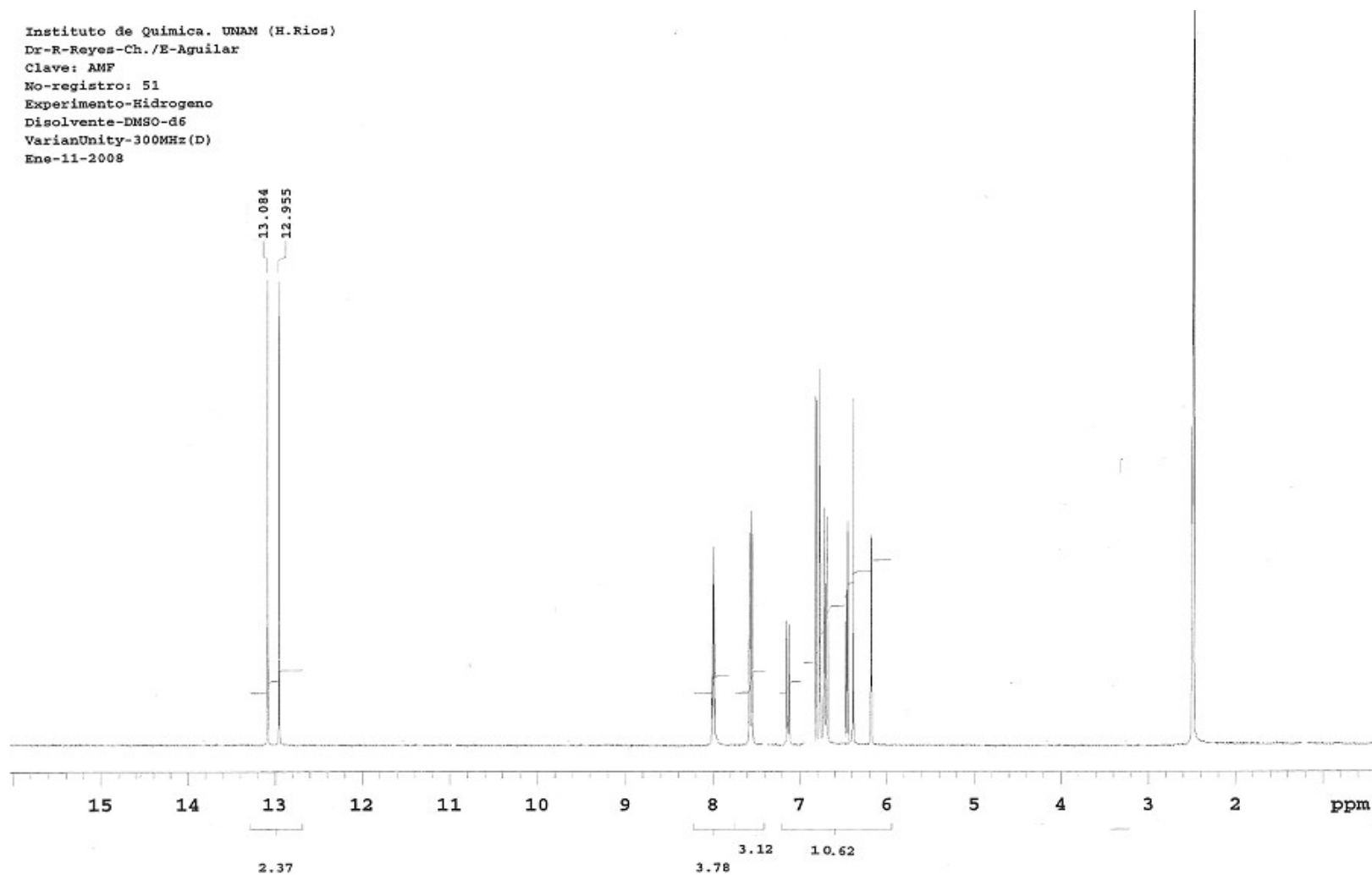
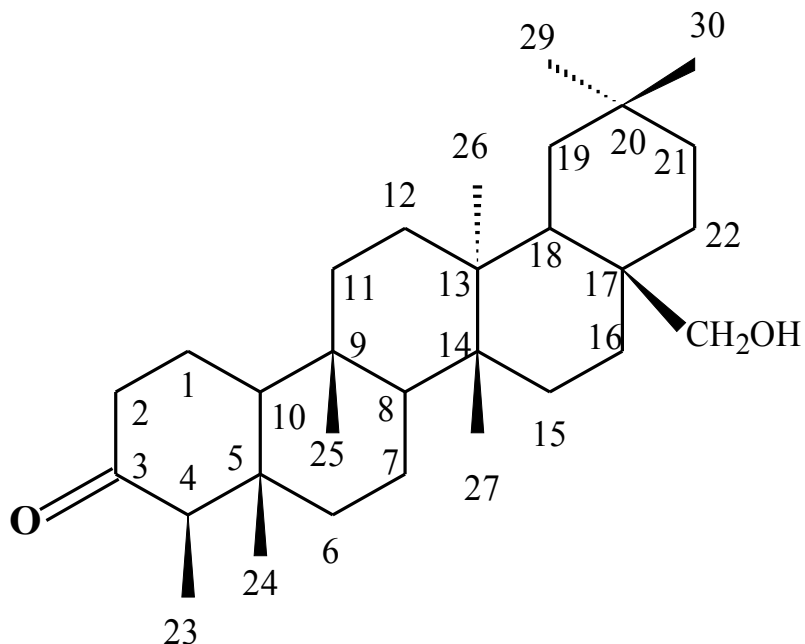


Figura 20. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Amentoflavona.



## Canofilol



$C_{30}, H_{50}, O_2$ , cristales blancos, p.f. 279-282.

IR (KBr)  $\nu_{max}$ : 3545, 2933, 2866, 1707, 1465 y 1387  $cm^{-1}$ .

Datos de RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ).

Protón	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento $J$ (Hz)	Número de H
CH <sub>3</sub> -24	0.72	s	-	3
CH <sub>3</sub> -25	0.86	s	-	3
CH <sub>3</sub> -23	0.88	s	-	3
CH <sub>3</sub> -27	0.91	s	-	3
CH <sub>3</sub> -26	0.97	s	-	3
CH <sub>3</sub> -29	0.99	s	-	3
CH <sub>3</sub> -30	1.12	s	-	3
CH <sub>2</sub> -28	3.63	s	-	2

Instituto de Quimica UNAM NZ  
Dr. Ricardo Reyes/Eduardo A.  
Clave:Ca  
CDC13  
Varian-Unity 300MHz-C  
1H  
No. Orden:3540  
18-08-03

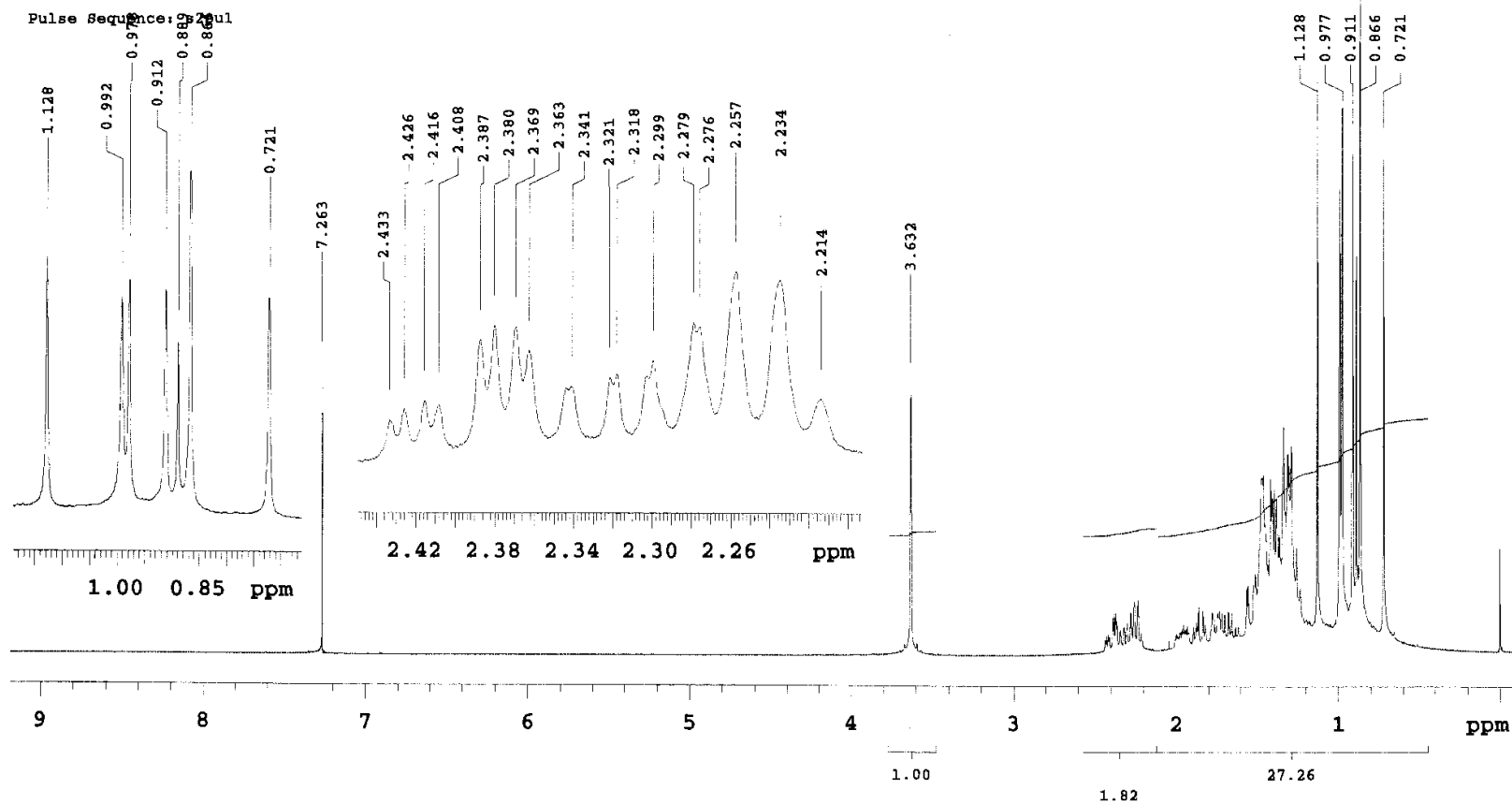
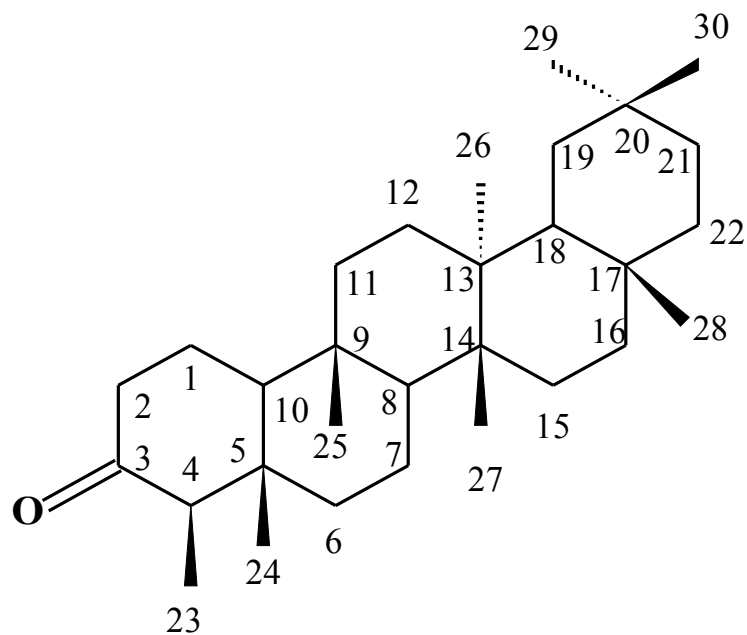


Figura 21. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del Canofilol.

## Friedelina



$C_{30}$ ,  $H_{50}$ ,  $O$ , cristales blancos, p.f. 267-269.

IR (KBr)  $\nu_{max}$ : 2926, 2860, 1711, 1453 y 1390  $cm^{-1}$ .

Datos de RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ).

Protón	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento $J$ (Hz)	Número de H
$CH_3$ -24	0.72	s	-	3
$CH_3$ -25	0.86	s	-	3
$CH_3$ -23	0.87	d	6.6	3
$CH_3$ -29	0.95	s	-	3
$CH_3$ -26	1.00	s	-	3
$CH_3$ -30	1.00	s	-	3
$CH_3$ -27	1.05	s	-	3
$CH_3$ -28	1.18	s	-	3
H-8	1.34	m	-	1
H-10	1.48	m	-	1
H-18	1.55	m	-	1
H-1b	1.67	m	-	1
H-1a	1.95	m	-	1
H-4	2.24	m	-	1
H-2	2.37	m	-	2

Instituto de Quimica UNAM NZ  
Dr. Ricardo Reyes/Eduardo A.  
Clave:Fr  
CDC13  
Varian-Unity 300MHz-C  
1H  
No. Orden:3539  
18-08-03

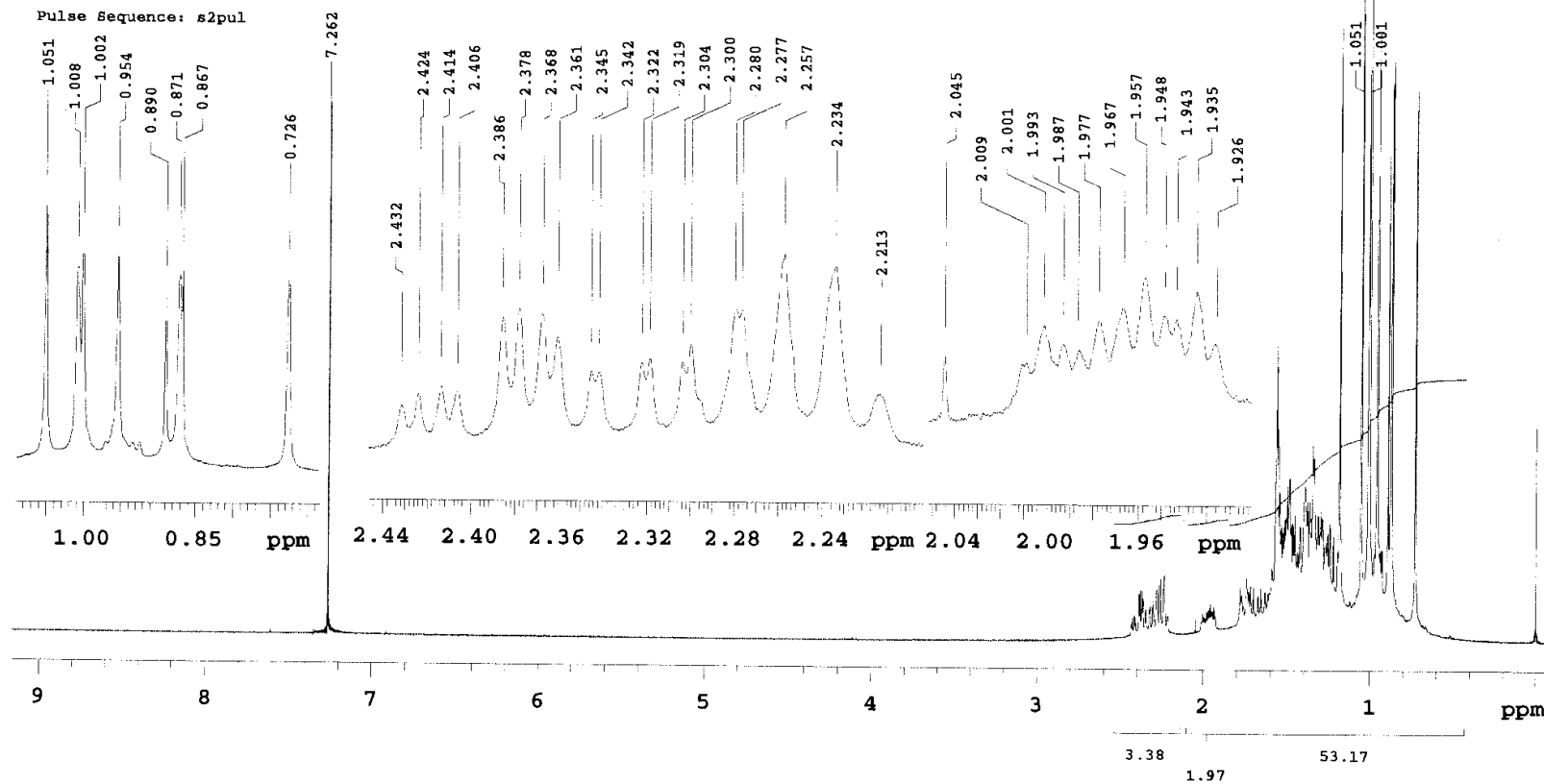
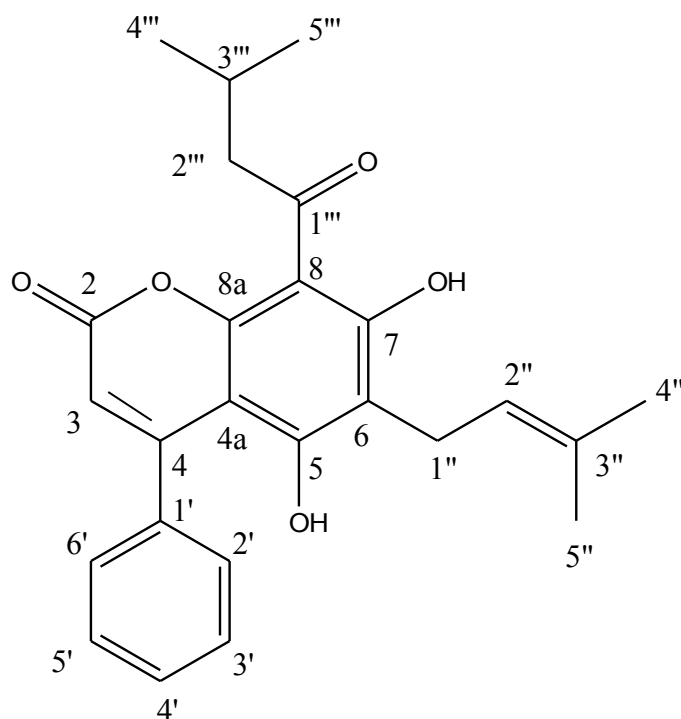


Figura 22. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Friedelina.

**Mammea A/BA.**



$C_{24}$ ,  $H_{26}$ ,  $O_5$ , agujas blancas, p.f. 122 – 124.

IR (KBr)  $\nu_{max}$ : 3985 (OH); 2964; 2932 y 2872 (CH), 1729 y 1724 (C=O), 1614 y 1556 (C=C) y 1390 (C-O)  $cm^{-1}$ .

Datos de RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ).

Protón	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento $J$ (Hz)	Número de H
H-4''' y H-5'''	1.06	d	6.6	6
H-5''	1.65	d	-	3
H-4''	1.70	s	-	3
H-3'''	2.31	m	6.7	1
H-2'''	3.19	d	6.7	2
H-1''	3.29	d	6.9	2
H-2''	5.09	m	6.9	1
OH-5	5.94	s	-	1
H-3	5.99	s	-	1
H-AR	7.42	m	-	2
H-AR	7.55	m	-	3
OH-7	14.59	s	-	1

Instituto de Química, UNAM (M. Mex)  
 Dr. E. Reyes-Ch, B. Aguilar  
 Clave: M  
 No-registro: 1464  
 Experimento-0140900  
 Disolvente-CDCl<sub>3</sub>  
 VarianUnity-300MHz(D)  
 Nov-27-2007

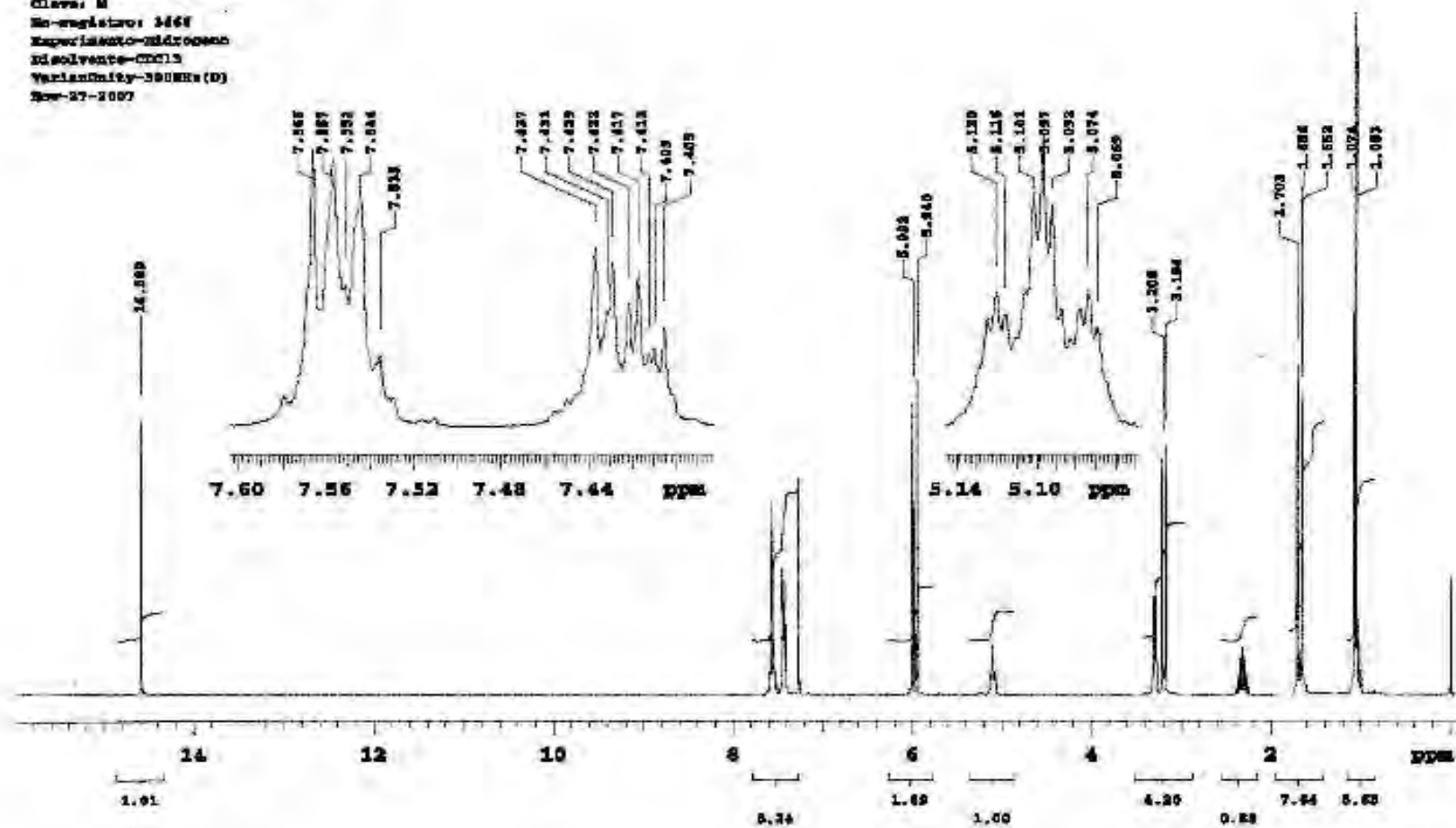


Figura 23. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de Mamea A/BA.