

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE  
METABOLITOS SECUNDARIOS DE CLUSIACEAE  
MEXICANAS SOBRE EL VIH-1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

BIÓL. MAIRA ESTRELLA HUERTA REYES

DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO REYES CHILPA

MEXICO, D.F.

2004

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Maia Estrella

Huerta Reyes

FECHA: 18- Nov -2004

FIRMA: Maia E

Este trabajo fue realizado en los laboratorios 2-5 y 2-10 del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM y en el Laboratorio de la Unidad de Servicios en VIH/SIDA del Programa de VIH/SIDA de la Ciudad de México y el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Ricardo Reyes Chilpa y la asesoría del Dr. Manuel Jiménez Estrada y la Dra. Carmen Soler Claudín.

La presente investigación fue financiada por el proyecto "Búsqueda de Compuestos de Origen Vegetal con Posible Actividad Inhibitoria de la Transcriptasa Reversa del Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1)", DGAPA-UNAM (IN207301).

Agradezco a CONACYT el apoyo de beca No. 158374 otorgado para la realización de este trabajo, así como a DGEP, UNAM por la beca complementaria. Agradezco también a The Nagai Foundation Tokyo la Beca Internacional otorgada durante la estancia realizada en Fukuoka, Japón.



## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincera gratitud al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por la dirección de este trabajo. Gracias por tus enseñanzas, confianza y amistad durante todo este tiempo.

Agradezco con todo cariño y respeto a los miembros del Comité Tutorial, los doctores Manuel Jiménez Estrada y Carmen Soler Claudín su apoyo, interés y guía para la realización de este trabajo. Agradezco también con mucho cariño a MariCarmen Basualdo, todo su tiempo, y entusiasmo durante la realización de los ensayos virales.

A los miembros del Jurado, Dr. Tirso Ríos Castillo, Dra. Carmen Soler Claudín, Dra. Ma. Luisa Villareal Ortega, Dra. Beatriz Gómez García, Dr. Alfredo Ortega Hernández, Dr. Leovigildo Quijano y Dr. José Javier Espinosa Aguirre por su interés y comentarios que enriquecieron este trabajo de tesis.

A mis compañeros del laboratorio 2-5, Eduardo, Estrella, Elizabeth, Alicia, Jacqueline, Raquel y muy especialmente a Liz y Manuel, por tanto corazón compartido. A todos mis compañeros del laboratorio 2-10 por su solidaridad y amistad.

A la M. en C. Teresa Ramírez Apan y el M. en C. Antonio Nieto por su apoyo en la realización de los ensayos de actividad biológica. A Raquel Feregrino, por su ayuda y amistad.

A toda mi familia, Pelo, Pancho, Iyari, Mariana, Guita, Jaime, Jose, Peponi y Chavo por todo su amor y apoyo.

A Arturo Sony, por todo su amor, comprensión y por cuidar de mí.

A Korina, *in memoriam*

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	IV
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE ESPECTROS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIV

## CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	ANTECEDENTES .....	3
	1. VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA	
	1.1 Clasificación y Estructura .....	3
	1.2 Ciclo Replicativo .....	6
	1.3 Transcriptasa Reversa de VIH-1 .....	7
	2. TERAPIA ANTIRETROVIRAL	
	2.1 Fármacos en la Terapia de VIH/SIDA .....	9
	2.2 Inhibidores de Transcriptasa Reversa No Nucleósidos ..	10
	2.3 Terapia Antiretroviral Altamente Activa .....	15
	2.4 Productos Naturales como Antiretrovirales .....	16
	3. FAMILIA CLUSIACEAE COMO FUENTE DE ANTIRETROVIRALES	
	3.1 Diagnósis de la Familia .....	19
	3.2 Clusiaceae en México .....	20
	3.2.1 <i>Calophyllum brasiliense</i> .....	21

3.2.2	<i>Clusia quadrangula</i> .....	29
3.2.3	<i>Vismia mexicana</i> .....	30
3.3	Metabolitos Secundarios con Actividad Anti VIH aislados de Clusiaceae .....	32
3.3.1	Calanólidos .....	33
3.3.1.1	(+)-Calanólido A .....	35
3.3.2	Inophyllums y Cordatólidos .....	38
3.3.3	Benzofenonas y Xantonas .....	39
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	41
IV.	HIPÓTESIS .....	42
V.	OBJETIVOS .....	42
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	44
1.	ESTUDIO BOTÁNICO	
1.1	Obtención de los Especímenes Botánicos.....	45
2.	ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	
2.1	Evaluación de las Propiedades Anti VIH .....	46
2.1.1	Efecto Inhibitorio sobre TR VIH-1 .....	46
2.1.2	Efecto Tóxico sobre Linfocitos Humanos	47
2.1.3	Efecto sobre la Inhibición de la Replicación de VIH-1 en Linfocitos Humanos .....	47
3.	ESTUDIO QUÍMICO	
3.1	Cromatografía e Instrumentación .....	48
3.2	Extracto Hexánico de <i>Calophyllum brasiliense</i> .....	49
3.3	Extracto Acetónico de <i>C. brasiliense</i> .....	50
3.4	Extracto Metanólico de <i>C. brasiliense</i> .....	51
3.5	Extractos de <i>Vismia mexicana</i> y <i>Clusia quadrangula</i> .....	52
VII.	RESULTADOS .....	54
1.	ESTUDIO BOTÁNICO	

1.1	Obtención de los Especímenes Botánicos .....	54
<b>2. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b>		
2.1	Sondeo de Propiedades Anti VIH de los Extractos de Clusiaceae mexicanas .....	56
2.2	Sondeo de Propiedades Anti VIH de los Extractos de <i>C. brasiliense</i> .....	57
2.3	Curva Dosis-Respuesta de los Extractos Activos .....	59
2.4	Propiedades Anti VIH de los Compuestos Aislados de <i>C. brasiliense</i> .....	62
<b>3. ESTUDIO QUÍMICO</b>		
3.1	Composición Química de las Fracciones Activas de <i>C. brasiliense</i> .....	65
3.1.1	(+)-Calanólido A .....	67
3.1.2	(-)-Calanólido B .....	74
3.1.3	(+)-Calanólido C .....	76
3.1.4	Soulattrólido .....	79
3.1.5	Ácido apetalico .....	83
3.1.6	Ácido isoapetalico .....	88
3.1.7	Isómero estructural Ácido isoapetalico ...	90
3.1.8	Friedelina, canofilol y amentoflavona ...	92
<b>VIII. DISCUSIÓN .....</b>		
		93
<b>IX. CONCLUSIONES .....</b>		
		102
<b>X. PERSPECTIVAS .....</b>		
		104
<b>XI. REFERENCIAS .....</b>		
		105
<b>APÉNDICES</b>		
<b>APÉNDICE I. Protocolos de los Ensayos de Actividad Biológica .....</b>		
		120
<b>APÉNDICE II. Espectros .....</b>		
		129
<b>APÉNDICE III. Artículos Generados de la Investigación .....</b>		
		198



## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNt	Ácido Ribonucleico de Transferencia
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
c	Cuarteto
c	Concentración
ca.	Cerca
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CC	Cromatografía en Columna
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
cm	Centímetros
COSY	Espectroscopía de Correlación Homonuclear <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H bidimensional
δ	Desplazamiento químico
D	Ácido Aspártico
d	Doblete
d.a.p.	Diámetro a la Altura del Pecho
dc	Doble Cuarteto
dd	Doble de doble
ddc	Doble de doble cuarteto
DEPT	Acrecentamiento sin Distorsión por Transferencia de Polarización
DMSO	Dimetilsulfóxido
D. E.	Desviación Estándar
E	Ácido Glutámico
EM-FAB	Espectrometría de Masas mediante Bombardeo Rápido de Átomos
EM-HR-FAB	Espectrometría de Masas mediante Bombradeo Rápido de Átomos de Alta Resolución

EM-IE	Espectrometría de Masas de Impacto Electrónico
FCME	Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los E. U. A.
gr	Gramos
G	Glicina
h	Horas
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HMBC	Espectroscopía de Correlación Heteronuclear bidimensional a larga distancia $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$
HMQC	Espectroscopía de Correlación Heteronuclear bidimensional $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$
Hz	Hertz
I	Integrasa
IF	Inhibidores de Fusión
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IP	Inhibidores de Proteasa
ITR	Inhibidores de Transcriptasa Reversa
ITRAN	Inhibidores de Transcriptasa Reversa Análogos a Nucleósidos ( <i>NRTI</i> , por sus siglas en inglés)
ITRNN	Inhibidores de Transcriptasa Reversa No Nucleósidos ( <i>NNRTI</i> , por sus siglas en inglés)
<i>I</i>	Constante de Acoplamiento
kDa	KiloDaltones
K	Lisina
L	Leucina
m	multiplete
mg	Miligramos
mM	Mili Molar
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
M	Metionina

MEXU	Herbario Nacional (Instituto de Biología, UNAM)
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MeOH	Metanol
//	Número de Individuos
nM	Nano Molar
nm	Nanómetros
N	Asparagina
p51	Subunidad proteica de 51 kiloDaltones de la enzima transcriptasa reversa del virus de inmunodeficiencia humana
p66	Subunidad proteica de 66 kiloDaltones de la enzima transcriptasa reversa del virus de inmunodeficiencia humana
ppm	Partes por Millón
PR	Proteasa
R	Arginina
Rf	Factor de Retención
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Singulete
sex	Sextuplete
spp.	Especies
SU	Proteína de Superficie del Virus de Inmunodeficiencia Humana
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
t	Triplete
T	Treonina
TARAA	Terapia Antiretroviral Altamente Activa
TI	Índice Terapéutico
TM	Proteína Transmembranal del Virus de Inmunodeficiencia Humana

TR	Transcriptasa Reversa
V	Valina
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
W	Triptofano
XAL	Herbario del Instituto de Ecología A. C. (Xalapa, Veracruz)
Y	Tirosina
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{g/ml}$	Microgramos por mililitro
$\mu\text{M}$	Micro Molar
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$	Rotación específica con respecto a la línea del sodio a 25°C

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática de un virión maduro de VIH-1	4
Figura 2.	Procesamiento de proteínas virales	5
Figura 3.	Ciclo Replicativo del VIH-1	7
Figura 4.	Transcriptasa Reversa de VIH-1	9
Figura 5.	Cambios conformacionales en la TR VIH-1 debido a la unión de un Inhibidor de Transcriptasa Reversa No Nucleósido (ITRNN)	13
Figura 6.	Especies pertenecientes a la familia Clusiaceae	20
Figura 7.	Cumarinas, ácidos y triterpenos aislados de las hojas de <i>C. brasiliense</i> colectado en Santa Martha, Veracruz	23
Figura 8.	Brasixantonas aisladas de la corteza de <i>C. brasiliense</i> .	24
Figura 9.	Cumarinas aisladas de la corteza de <i>C. brasiliense</i> que presentaron actividad inhibitoria significativa sobre la activación del virus Epstein-Barr	25
Figura 10.	Cromanonas aisladas de la corteza de <i>C. brasiliense</i> de las cuales el ácido brasiliensofílico A y el ácido isobrasiliensofílico A fueron los compuestos con mayor actividad antibacteriana	26
Figura 11.	Ácido apetalico e isopetalico aislados del aceite de las semillas de <i>C. brasiliense</i>	27
Figura 12.	Xantonas aisladas de la madera de <i>C. brasiliense</i> colectado en México	28
Figura 13.	Metabolitos secundarios aislados del género <i>Clusia</i> spp.	30
Figura 14.	Metabolitos secundarios aislados de <i>V. baccifera</i>	31
Figura 15.	Dipirancoumarinas tetracíclicas de <i>Calophyllum</i> spp.	33
Figura 16.	Calanólidos aislados de <i>C. lanigerum</i> var. <i>austrocoriaceum</i>	34
Figura 17.	(+)-Calanólido A, ITRNN de origen natural	36
Figura 18.	Inophyllums y Cordatólidos con propiedades anti VIH	38
Figura 19.	Benzofenonas preniladas con propiedades anti VIH	40
Figura 20.	Xantonas aisladas de <i>Garcinia mangostana</i> colectada en Singapur y que presentan potente actividad inhibitoria sobre PR VIH-1	40
Figura 21.	Estrategia general	44
Figura 22.	Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de <i>C. brasiliense</i>	52



Figura 23.	Fraccionamiento biodirigido de los extractos de <i>Clusia quadrangula</i> y <i>Vismia mexicana</i>	53
Figura 24.	Mapa de la República Mexicana que muestra los lugares de colecta de algunas especies de Clusiaceae	54
Figura 25.	Inhibición sobre TR VIH-1 de los extractos de hojas de Clusiaceae mexicanas	56
Figura 26.	Efectos tóxico y antiviral de las fracciones activas de los extractos hexánico y metanólico de las hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i>	60
Figura 27.	Curvas concentración-respuesta de los extractos hexánico de <i>Calophyllum brasiliense</i> y <i>Clusia quadrangula</i>	61
Figura 28.	Fraccionamiento biodirigido del extracto hexánico de <i>C. brasiliense</i>	63
Figura 29.	Fraccionamiento biodirigido del extracto acetónico de <i>C. brasiliense</i>	64
Figura 30.	Metabolitos secundarios aislados de las hojas de <i>C. brasiliense</i> inactivos contra TR VIH-1	65
Figura 31.	Dipiranocumarinas aisladas de las hojas de <i>C. brasiliense</i> con propiedades anti VIH	66
Figura 32.	Espectro DEPT del calanólido A	68
Figura 33.	Espectro de RNM <sup>13</sup> C del calanólido A	69
Figura 34.	Espectro de RNM <sup>1</sup> H del calanólido A	70
Figura 35.	Espectro COSY del calanólido A	71
Figura 36.	Espectro HMBC del calanólido A	73
Figura 37.	Comparación de las ampliaciones de los espectros de RMN <sup>1</sup> H (3-7 ppm)	75
Figura 38.	Espectro de RNM <sup>13</sup> C del calanólido C	77
Figura 39.	Espectro HMBC del calanólido C	78
Figura 40.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del soulattrólido	80
Figura 41.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del soulattrólido	81
Figura 42.	Espectro HMQC del soulattrólido	82
Figura 43.	Espectro DEPT del ácido apetalico	84
Figura 44.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del ácido apetalico	85
Figura 45.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del ácido apetalico	86
Figura 46.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del ácido isoapetalico	89
Figura 47.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del isómero estructural del ácido isoapetalico.	91

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de infección con VIH	11
Tabla 2.	Combinaciones triples de fármacos más comunes (TARAA)	16
Tabla 3.	Algunos productos naturales de origen vegetal con actividad anti VIH-1	18
Tabla 4.	Especies de Clusiaceae presentes en México	21
Tabla 5.	Sondeo de actividad inhibitoria sobre TR VIH-1 de los extractos CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (50 µg/ml) de las Clusiaceae mexicanas	55
Tabla 6.	Evaluación de las propiedades inhibitorias sobre TR VIH-1 de las fracciones de los extractos de hoja de <i>Calophyllum brasiliense</i>	58
Tabla 7.	Evaluación de los compuestos aislados de las hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i> sobre TR VIH-1	62
Tabla 8.	Desplazamientos químicos de los protones del anillo D de los calanólidos	72
Tabla 9.	Desplazamientos químicos comparativos entre calanólido C y pseudocalanólido C	76
Tabla 10.	Comparación del anillo D de las dipiranocumarinas con actividades inhibitorias sobre TR VIH-1 aisladas de las hojas de <i>C. brasiliense</i> .	95

## LISTA DE ESPECTROS

Espectros del (+)-calanólido A	130
Espectros del (-)-calanólido B	140
Espectros del (+)-calanólido C	151
Espectros del soulattrólido	161
Espectros del ácido apetalico	171
Espectros del ácido isoapetalico	180
Espectros del isómero estructural del ácido isoapetalico	189



## RESUMEN

Los extractos de hojas de las 21 especies de Clusiaceae que crecen en México fueron evaluados respecto de sus propiedades inhibitorias sobre la transcriptasa reversa del VIH-1 mediante un ensayo inmuno-colorimétrico no radiactivo. Adicionalmente, se llevaron a cabo 2 ensayos en los que se evaluó la toxicidad sobre células linfocíticas y finalmente, se examinaron las propiedades inhibitorias de los extractos activos sobre la replicación de IIIb/LAV VIH-1 en un sistema celular. Los extractos de 5 especies (23.8%) mostraron una inhibición potente ( $\geq 70\%$ ) sobre la TR VIH-1, pero solo 4 mostraron baja toxicidad a células linfocíticas humanas MT2. Los extractos de *Calophyllum brasiliense* (hexano) y *Clusia quadrangula* ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ ), fueron los más potentes e inhibieron *in vitro* la TR VIH-1 con una  $\text{IC}_{50} = 29.6 \mu\text{g/ml}$  y  $42 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente. La toxicidad de estos extractos sobre células MT2 se observó con valores de  $\text{EC}_{50} = 92.5 \mu\text{g/ml}$  y  $91 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Adicionalmente, el extracto hexánico de *C. brasiliense*, mostró una inhibición potente sobre la replicación viral ( $\text{ED}_{50} = 37.1 \mu\text{g/ml}$ ) en el ensayo realizado en células, mientras *Clusia quadrangula* fue menos activa ( $\text{ED}_{50} = 124 \mu\text{g/ml}$ ).

El aislamiento de los compuestos responsables de la actividad anti VIH del extracto hexánico de las hojas de *C. brasiliense* se realizó mediante fraccionamiento cromatográfico biodirigido utilizando los ensayos previamente mencionados. Los compuestos obtenidos fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas como  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ , así como experimentos bidimensionales homonucleares (COSY) y heteronucleares  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  (HMQC y HMBC). Los compuestos activos son las dipiranocumarinas, calanólidos A, B, C y soulatrólido que se encuentran en bajas concentraciones. En contraste, los compuestos mayoritarios aislados, como ácido apetalico, ácido isoapetalico, un isómero estructural del ácido isoapetalico, friedelina y canofilol, carecieron de actividad inhibitoria sobre TR VIH-1.

El extracto acetónico de *C. brasiliense* mostró potente inhibición sobre la TR VIH-1, lo cual se debe a la presencia de calanólidos, pero fue tóxico a células MT2, este efecto se debió al biflavonoide amentoflavona, cuya alta toxicidad fue determinada.

El extracto metanólico de *C. brasiliense* mostró una potente inhibición sobre TR VIH-1, lo cual podría deberse a la presencia de taninos. Dicho extracto, no mostró efectos tóxicos sobre linfocitos MT2 pero presentó una pobre inhibición sobre la replicación viral en sistema celular.

Los resultados obtenidos en este estudio, apoyan la idea de que la familia Clusiaceae es una fuente potencial de productos naturales con actividad antiVIH. El calanólido C fue obtenido por primera vez como un producto natural y evaluado sobre TR VIH-1. El aislamiento de los calanólidos A, B y C de *C. brasiliense* constituye el primer reporte de la presencia de estos compuestos en las hojas de una especie americana y con amplia distribución en territorio nacional. Este hecho es interesante, puesto que *C. brasiliense* podría ser una fuente natural del (+)-calanólido A, el cual es un inhibidor potente de TR VIH-1 y que se encuentra actualmente en la fase II/III de la evaluación clínica, y a futuro, podría incorporarse al cuadro de medicamentos en la terapia VIH/SIDA.



## ABSTRACT

The organic extracts of 21 plant species of Clusiaceae from Mexico were screened for anti HIV-1 reverse transcriptase activity in a non-radioactive immuno colorimetric assay. Additionally, we carried out 2 assays for evaluating toxicity on lymphocytic cells and inhibition of viral replication in a cellular system. The extracts of 5 species (23.8%) exhibited significant inhibition ( $\geq 70\%$ ) of HIV-1 RT activity; but, only 4 extracts showed reduced toxicity to human lymphocytic MT2 cells and were further tested as inhibitors of HIV-1 IIIb/LAV replication in a cellular system. The best extracts were *Calophyllum brasiliense* (hexane) and *Clusia quadrangula* ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ ), which inhibited HIV-1 RT ( $\text{IC}_{50} = 29.6 \mu\text{g/ml}$  and  $42 \mu\text{g/ml}$ ), and showed an  $\text{EC}_{50} = 92.5 \mu\text{g/ml}$  and  $91 \mu\text{g/ml}$  on MT2 cells, respectively. However, only *Calophyllum brasiliense* hexane extract showed significant inhibition on viral replication ( $\text{ED}_{50} = 37.1 \mu\text{g/ml}$ ), while *Clusia quadrangula* was less active ( $\text{ED}_{50} = 124 \mu\text{g/ml}$ ).

The hexane extract of *Calophyllum brasiliense* leaves was fractionated following the 3 bioassays previously described. Isolation of active compounds was carried out by column chromatography and HPLC. Compounds were identified by spectroscopic techniques, such as,  $^1\text{H}$ NMR and  $^{13}\text{C}$ NMR, including two-dimensional homonuclear (COSY) and heteronuclear (HMQC and HMBC) experiments. These compounds are four dipyrano coumarins: calanolides A, B, C and soulattrolide. Other isolated compounds such as apetalic acid, isoapetalic acid, a structural isomer of isoapetalic acid, friedelin and canophyllol, were devoid of HIV-1 RT inhibitory activity.

The acetone extract of *C. brasiliense*, also showed potent inhibition on HIV-1 RT but was cytotoxic to MT2 cells. Antiviral activity was due to traces of calanolides. Amentoflavone was also isolated and could be responsible of the toxic effects exhibited by whole extract.

The methanol extract of *C. brasiliense* inhibited HIV-1 RT, was not toxic on MT2 cells but was unable to inhibit HIV-1 IIIb/LAV replication in a cellular system. These antiviral activities could be attributed to tannins.

Our results support the idea that plant extracts represent a valuable source for potential anti HIV compounds. This is the first report of the isolation of calanolides A, B and C from *C. brasiliense* leaves in American species. Calanolide C was obtained as a natural product for first time and showed moderate inhibitory properties. Particularly, (+)-calanolide A, a natural product, is considered as a potent inhibitor of HIV-1 RT, that is currently being tested in phase II/III clinical trials.

# I. INTRODUCCIÓN

En 1981 se dieron a conocer los primeros reportes de una nueva enfermedad humana, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), caracterizada por un severo daño inmunológico (Gottlieb M. S., *et al.*, 1981). El virus causante del SIDA fue identificado y denominado como Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Barré-Sinoussi F., *et al.*, 1983; Wong-Staal F. y R. C. Gallo, 1985; Levy J. A., *et al.*, 1985; Coffin J., *et al.*, 1986). También, se identificó que el principal blanco de la infección por VIH son los linfocitos CD4<sup>+</sup>, los cuales presentan una disminución progresiva en personas infectadas por este virus (Dalglish A. G., *et al.*, 1984).

Se calcula que actualmente más de 40 millones de personas están infectadas con VIH y que 21 millones de muertes se han registrado alrededor del mundo debido a este padecimiento. Tan sólo 3 millones de personas murieron en el pasado año 2003 y se estima que 15,000 personas se infectan con el virus cada día (UNAIDS, 2004).

En el ciclo replicativo de este virus se han determinado procesos específicos que son blanco de fármacos en el tratamiento de VIH/SIDA, como la transcripción del ARN viral en un ADNc de doble cadena, proceso regulado por la enzima transcriptasa reversa (TR).

La FDA (Administración de Drogas y Alimentos de los E. U. A.) ha aprobado hasta el momento 20 fármacos dirigidos a diferentes blancos virales para su uso en pacientes infectados con VIH. A pesar de que estos tratamientos han mostrado efectividad en el control de la infección (De Clercq E., 1999), estos beneficios son limitados por riesgos asociados con el uso prolongado de los fármacos (De Clercq E., 2000), pero sobretodo por el rápido desarrollo de resistencia a ellos (Raulin J., 2002). Surge entonces una continua necesidad de buscar nuevas sustancias inhibidoras de VIH con baja toxicidad que pudieran ofrecer alternativas en la terapia contra el VIH/SIDA.



En esta búsqueda de nuevas sustancias químicas con posible actividad inhibitoria sobre el VIH y en especial sobre la TR, se han considerado a los productos naturales. En particular, destacan los metabolitos secundarios como las piranocumarinas aisladas de diferentes especies de la familia de angiospermas Clusiaceae. Entre las piranocumarinas más exitosas se distingue el (+)-calanólido A, que actualmente se encuentra en la fase II/III del estudio clínico (Sarawak MediChem Pharmaceuticals, Inc., 2004).

Dado que la familia Clusiaceae representa una fuente potencial de nuevas sustancias químicas capaces de inhibir TR VIH-1, en el presente estudio se ha llevado a cabo un sondeo del total de las especies de Clusiaceae que se localizan en México respecto de sus propiedades inhibitorias sobre TR y sobre la replicación de VIH-1 *in vitro*, así como la evaluación de sus efectos citotóxicos sobre linfocitos humanos. Adicionalmente, en los extractos seleccionados, se identificaron plenamente los compuestos químicos responsables de estas actividades inhibitorias.

## II. ANTECEDENTES

### 1. VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

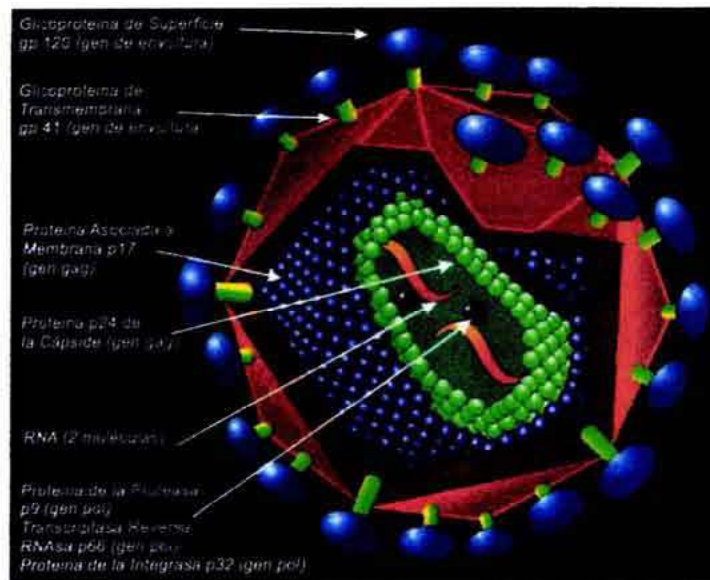
#### 1.1 Clasificación y Estructura

El agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es un retrovirus, el cual ha sido nombrado como Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Barré-Sinoussi F., *et al.*, 1983; Wong-Staal F. y R. C. Gallo, 1985). A nivel de género se encuentra ubicado como *Lentivirus*, donde sus miembros son asociados con largos períodos de incubación y tienen como blanco diversos linajes de células hematopoiéticas, particularmente linfocitos (Freed E. O. y Martin M. A., 2001). Otros virus similares que infectan diversas especies incluyen al virus visna/maedi (oveja), virus de artritis/encefalitis caprina (VAEC), virus de anemia infecciosa equina (VAIE) y los virus de inmunodeficiencia felina (VIF), bovina (VIB), y de simios (VIS). Hasta el momento han sido identificados y caracterizados 2 tipos: VIH-1 y VIH-2 (Coffin J. A., *et al.*, 1986). El primero, se distribuye ampliamente alrededor del mundo, pero con una alta prevalencia en África Central, Europa, Asia y Estados Unidos. A pesar de que las infecciones con VIH-2 están localizadas principalmente en países del oeste de África, individuos infectados con VIH-2 han sido también detectados en Europa, Sudamérica, Estados Unidos, Asia y Australia (Evans L. A., Levy J. A., 1993). La ultraestructura del VIH-1 y VIH-2 es similar, lo cual se demuestra en el tropismo hacia la misma célula hospedera; sin embargo, la homología del total de la secuencia de nucleótidos entre ambos tipos es aproximadamente del 40% (Guyader M., *et al.*, 1987).

Al igual que otros lentivirus, las partículas maduras de VIH presentan un diámetro característico de 100-120 nm y están cubiertos por una membrana que rodea a la cápside y a la nucleocápside de forma cónica (Figura 1). Las partículas virales típicamente esféricas, poseen 2 copias de ARN (de polaridad



positiva) y las enzimas transcriptasa reversa (TR), proteasa (PR) e integrasa (I) (Evans L. A., Levy J. A., 1993; Freed E. O. y Martin M. A., 2001).



**Figura 1.** Representación esquemática de un virión maduro de VIH-1.

<http://www.pmsida.gov.ar/infeccion1.htm>

El genoma de VIH-1 consta de sólo 3 genes que codifican para proteínas estructurales: gag, pol y env. Estas proteínas estructurales son inicialmente sintetizadas como precursores de poliproteínas y subsecuentemente son procesadas por proteasas virales ó celulares en partículas maduras. El precursor Gag Pr55 tiene como productos las proteínas de la matriz (MA) p17, cápside (CA) p24, nucleocápside (NC) p7 y p6. Por otra parte, la autocatálisis del precursor Gag-Pol Pr160, da la proteasa (PR), la transcriptasa reversa (TR) y la integrasa (IN), mientras que la digestión proteolítica por enzimas celulares

convierte el precursor Env gp160 en las proteínas de superficie (SU) gp120, y la transmembranal (TM) gp41. Las restantes 6 genes (Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu y Nef) codifican para proteínas accesorias que participan en procesos de regulación de la expresión/replicación viral y que son productos de la traducción primaria del procesamiento de ARNm (Figura 2).

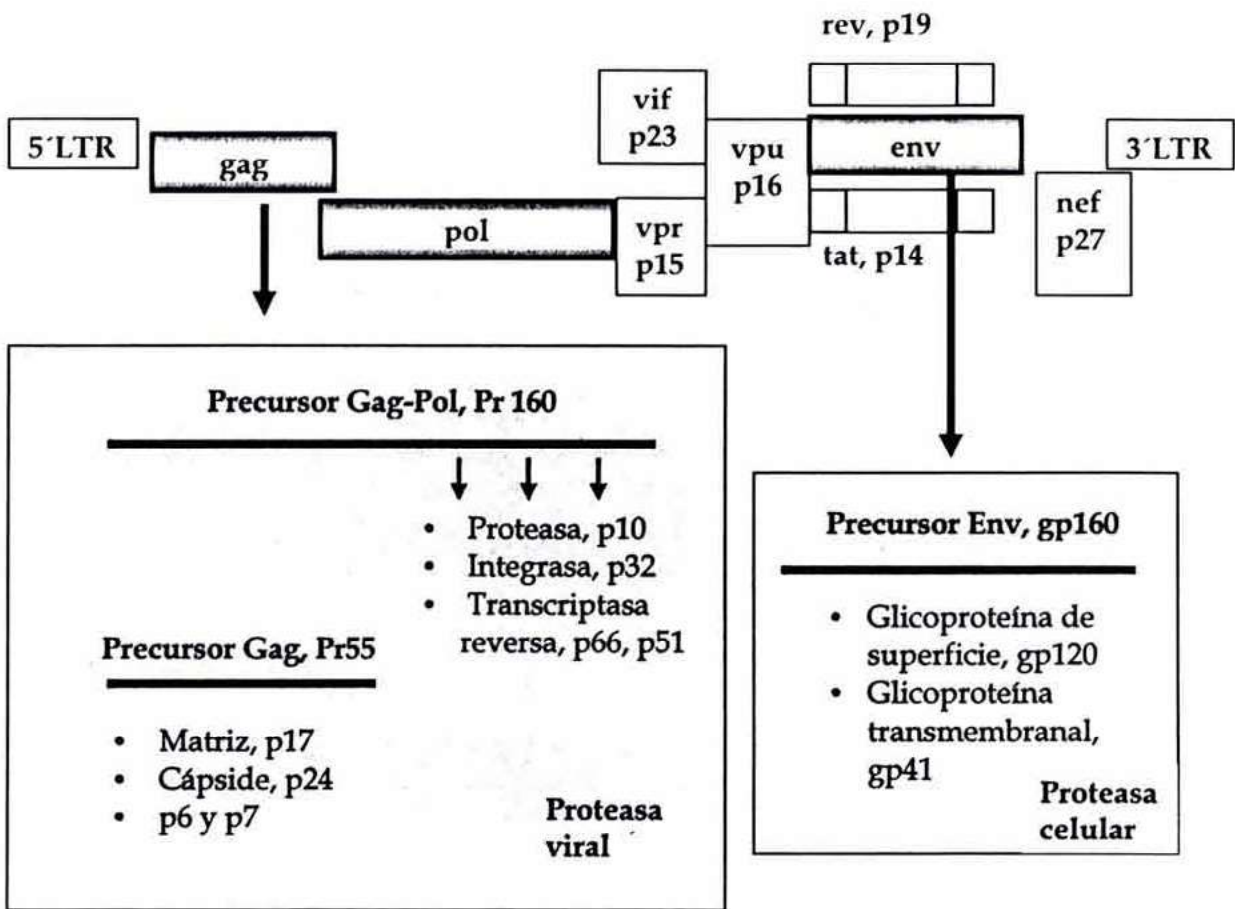


Figura 2. Procesamiento de proteínas virales.

(Modificado de Levy J. A., 1998).

## 1.2 Ciclo Replicativo

El ciclo replicativo de VIH-1 puede llevarse a cabo en 10 pasos (Cos P., *et al.*, 2004) (Figura 3). Comienza con la interacción de viriones libres con la célula (1). Esta unión se lleva a cabo mediante las glicoproteínas virales gp120 (SU) y gp41 (TM), así como con los receptores CD4<sup>+</sup> (Dalglish A. G., *et al.*, 1984; Klatzmann D., *et al.*, 1984) y los coreceptores de quimiocinas CXCR4 ó CCR5 de la célula hospedera. Estos receptores son requeridos para la unión y fusión del virus (2) (Fauci A. S., *et al.*, 1996). Como es característico de los retrovirus, inmediatamente después de la fusión de la membrana viral con la membrana celular, las partículas virales parcialmente desnudas, quedan libres en el citoplasma (3) y se inicia la transcripción del ARN viral en un cADN de doble cadena (Hu W. S. y Temin H. M., 1990). Este proceso es regulado por la enzima TR (4) (Freed E. O. y Martin M. A., 2001). El ADN (producto de la retrotranscripción) es transportado a través del citoplasma hacia el interior del núcleo donde es integrado al ADN cromosomal de la célula hospedera mediante la integrasa (5), que forma parte del complejo de preintegración (Pullen K. A. y Champoux J. J., 1990). El ADN viral integrado sirve como molde para que la ARN polimerasa dependiente de ADN (Pol II) sintetice los ARNm (6) que son traducidos en proteínas virales en el citoplasma de las células infectadas (Evans L. A., Levy J. A., 1993). El precursor de las glicoproteínas gp160 y las poliproteínas de Gag y Gag/Pol son transportadas por vías independientes hacia la membrana. Éstas últimas participan en la formación de partículas esféricas que contienen las glicoproteínas virales TM y SU (7), y que emergen de la célula (8) como viriones inmaduros (9) (Berman P. W., Nunes W. M., Haffar O. K., 1988). La proteólisis subsecuente, mediada por la proteasa ubicada en el virión inmaduro, genera partículas maduras que contienen la nucleocápside cónica característica de los viriones maduros (10) (Kato I., *et al.*, 1985). La proteólisis puede ocurrir durante o inmediatamente después de que la partícula viral deja la célula (Freed E. O. y Martin M. A., 2001; Goff P., 2001).



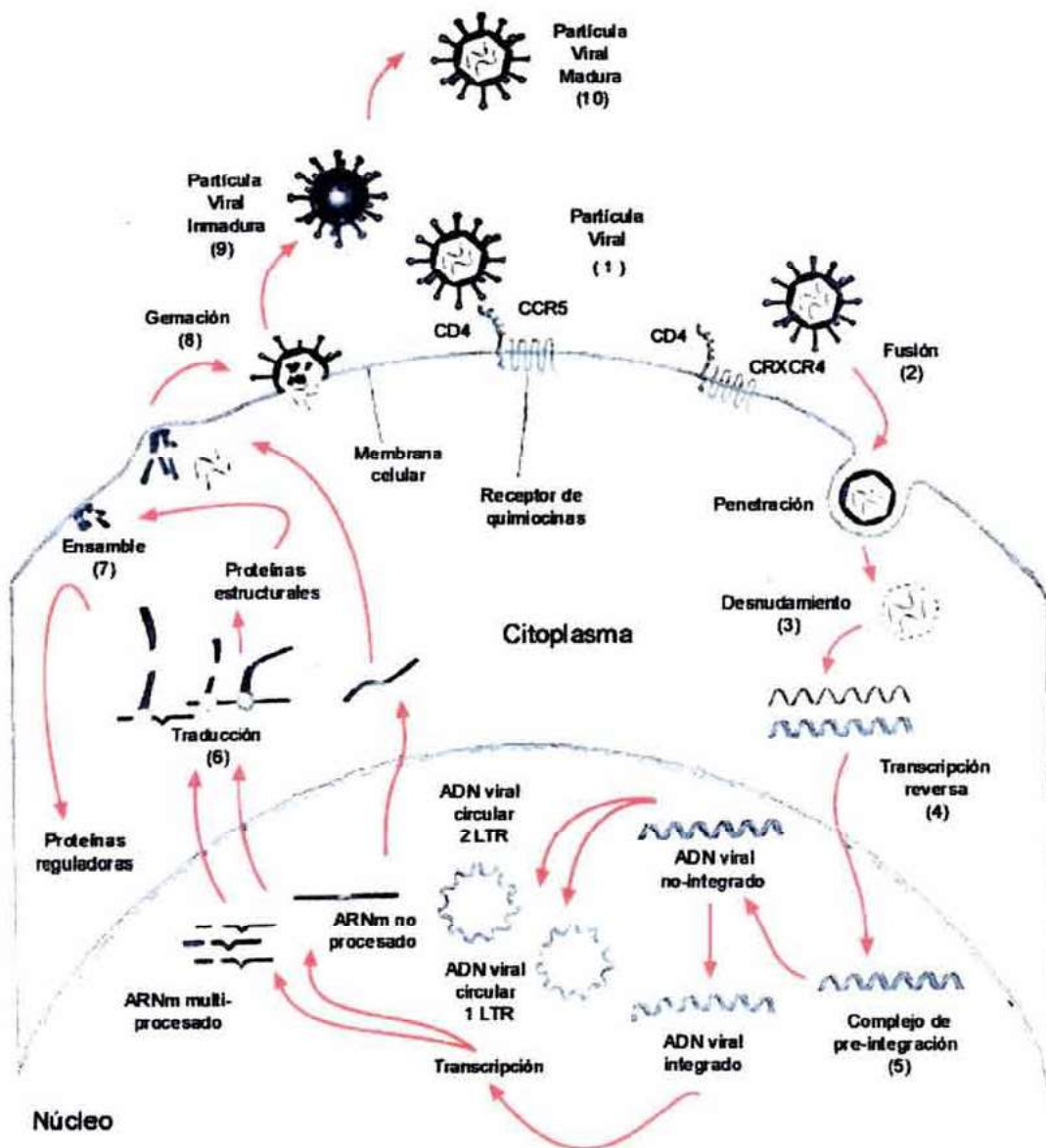


Figura 3. Ciclo Replicativo del VIH-1.

(Cortesía de C. Soler).

### 1.3 Transcriptasa Reversa de VIH-1

La enzima TR de VIH-1 es un heterodímero de 2 subunidades de 66 (p66) y 51 kDa (p51). La subunidad p51 es derivada de la subunidad p66



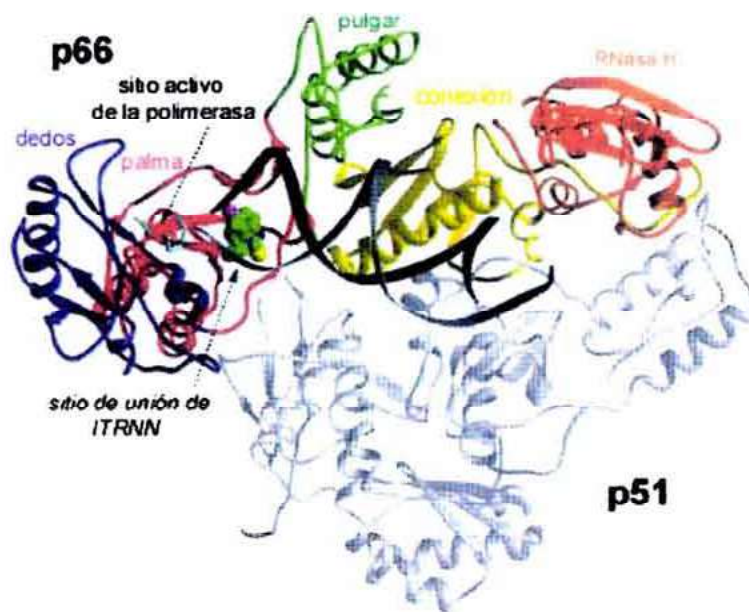
como producto de la remoción proteolítica de 15 kDa de p66 llevada a cabo por la PR de VIH-1 (Freed E. O., Martin M. A., 2001) (Figura 2). La estructura de la TR de VIH-1 fue determinada mediante cristalografía de rayos X. La estructura cristalina muestra un plegamiento asimétrico en el cual las orientaciones de p66 y p51 difieren sustancialmente (Jacobo-Molina A., *et al.*, 1991; Arnold E., *et al.*, 1992; Kohlstaed L. A., *et al.*, 1992).

La subunidad p66 puede ser visualizada con fines didácticos como una mano derecha (vista con la palma hacia arriba) que incluye el sitio activo de la polimerasa, conformado como una marcada hendidura formada por los dominios de la "palma", "dedos" y "pulgar" (Figura 4) (Jacobo-Molina A., *et al.*, 1993). El dominio de la polimerasa está unido a la ARNsa por el subdominio de conexión. El sitio activo, localizado en la "palma", contiene tres residuos de ácido aspártico (D) determinantes: D110, D185 y D186, que se localizan muy próximos entre sí y en coordinación con dos iones de  $Mg^{2+}$  (Huang H., *et al.*, 1998). Mutaciones de estos residuos de D anulan la actividad de polimerasa de la TR. La subunidad p51 muestra una estructura rígida que no forma parte de la hendidura de polimerización (Arnold E., *et al.*, 1992; Flint S. J., 2000).

Como se ha mencionado anteriormente, la TR cataliza la retrotranscripción de una cadena sencilla de ARN en una doble cadena de ADN durante la fase temprana del proceso infeccioso. Esta reacción se lleva a cabo en conjunto con la actividad de RNasaH. La TR de VIH-1 presenta tres funciones enzimáticas: 1) polimerasa (dirige la síntesis de ADN a partir de ARN, para la formación del ADN de polaridad negativa); 2) RNasaH (degrada el iniciador de ARNt y el ARN molde presente en el híbrido intermedio de ADN-ARN); 3) polimerasa de ADN a partir de ADN (polimeriza la cadena positiva de ADN y subsecuentes copias de ADN) (Flint S. J., 2000; Goff P., 2001).

La TR presenta una alta tasa de mutación durante la replicación, debido a que carece de un sistema de exonucleasa para la reparación y muy frecuentemente, el molde que sirve como base para la TR, cambia durante la

transcripción reversa (Evans L. A., Levy J. A., 1993; Coffin J. M., 1995). La tasa del total de mutaciones *in vivo* de VIH-1 que comprende sustituciones, cambios en el marco de lectura, deleciones simples y deleciones con inserciones, se calcula en  $3 \times 10^{-5}$  por ciclo replicativo. De la misma manera, las tasas de mutaciones *in vivo* de otros retrovirus (como BLV y MuLV) se observaron entre 2 y 10 veces menores que las de VIH-1 (Mansky L. M., Temin H. M., 1996).



**Figura 4.** Transcriptasa Reversa de VIH-1.

(Modificado de Flint S. J., *et al.*, 2000).

## 2. TERAPIA ANTIRETROVIRAL

### 2.1 Fármacos en la Terapia de VIH/SIDA

A 21 años de la identificación del VIH como agente causal del SIDA, diversos fármacos anti VIH han sido desarrollados y comercializados.



Dichos fármacos pueden ser clasificados en 3 grupos de acuerdo con sus mecanismos de acción: inhibidores de transcriptasa reversa (ITR); inhibidores de proteasa (IP) e inhibidores de fusión (IF). Los ITR se clasifican en 2 grupos: a) análogos a nucleósidos (ITRAN ó *NRTI* por sus siglas en inglés) que actúan sobre el sitio activo de la enzima; ó b) no nucleósidos (ITRNN ó *NNRTI*) que inhiben por la interacción específica con un sitio de unión alostérico (De Clercq E., 1993). Los IP se unen al sitio activo de la proteasa viral y evitan el procesamiento de las proteínas virales a enzimas funcionales. Las partículas virales son producidas aún cuando la PR es inhibida pero no son infecciosas (Wlodawer A., Erickson J. W., 1993). Los IF evitan la fusión del virus-célula y por lo tanto, la infección de células blanco (Kilby J. M., *et al.*, 1998). Sin embargo, el uso prolongado de estos fármacos frecuentemente provoca efectos secundarios graves (Tarinas A., *et al.*, 2000) (Tabla 1).

## 2.2 Inhibidores de Transcriptasa Reversa No Nucleósidos

De los 20 fármacos aprobados para el tratamiento de VIH, 11 están dirigidos a la enzima viral TR, con lo que la TR es considerada como el blanco molecular más atractivo para el desarrollo de fármacos anti VIH (Garg R., *et al.*, 1999). De estos 11 inhibidores, 8 son ITRAN y los otros 3 son ITRNN (Tabla 1).

Los ITRAN pueden ser considerados en su mayoría como 2',3'-dideoxynucleósidos que deben ser fosforilados dentro de la célula hospedera para ser incorporados a la cadena de ADN que se está sintetizando (Hao Z., *et al.*, 1990). En condiciones normales el grupo 3'-OH de los compuestos fosforilados, permite la incorporación de nucleótidos adicionales y por lo tanto la elongación del ADN. Sin embargo, estos inhibidores carecen del grupo 3'-OH y por ende, la transcripción reversa es bloqueada. Por ello, los ITRAN son también conocidos como terminadores de cadena (De Clercq E., 2000).

Tabla 1. Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de infección con VIH

Nombre genérico	Nombre comercial	Tipo de Inhibidor	Efectos secundarios
Zidovudina (AZT)	Retrovir <sup>®</sup> Glaxo-SmithKline; 1987 Versión genérica	ITRAN	SNC (dolor de cabeza, malestar), GI (náusea, vómito, diarrea, anorexia), dermatológicos (decoloración de las uñas), hematológicos (mielosupresión, anemia, trombocitopenia, alteraciones en los niveles de bilirrubina) y hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa)
Didanosina (ddI)	Videx <sup>®</sup> Bristol-Myers Squibb; 1991	ITRAN	SNC (neuropatía periférica, dolor de cabeza), GI (diarrea, pancreatitis) y hematológicos (leucopenia)
Zalcitabina (ddC)	Hivid <sup>®</sup> Hoffmann-La Roche; 1992	ITRAN	Hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa), en SNC (neuropatía periférica de manos y pies), hematológicos (anemia, leucopenia, trombocitopenia) y GI (pancreatitis)
Estavudina (d4T)	Zerit <sup>®</sup> Bristol-Myers Squibb; 1994 Versión genérica	ITRAN	Hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa); SNC (neuropatía periférica), GI (náuseas, vómito, diarrea, pancreatitis) y dermatológicos (prurito)
Lamivudina (3TC)	Epivir <sup>®</sup> Glaxo-SmithKline; 1995	ITRAN	SNC (dolor de cabeza, insomnio) y GI (náuseas, diarrea, dolor abdominal)
Abacavir (ABC)	Ziagen <sup>®</sup> Glaxo-SmithKline; 1998	ITRAN	Dermatológicos (prurito); GI (dolor abdominal, diarrea) y SNC (dolor de cabeza)
Tenofovir (TDF)	Viread <sup>®</sup> Gilead Sciences; 2001	ITRAN	SNC (neuropatía periférica, dolor de cabeza, fatiga); GI (pancreatitis, náuseas, vómito, dolor estomacal); hepatotoxicidad y nefrototoxicidad
Emtricitabina (FTC)	Emtriva <sup>®</sup> Gilead Sciences; 2004	ITRAN	SNC (dolor de cabeza), GI (diarrea, náusea), dermatológicos (salpullido, cambios en la coloración de la piel) y hepatotoxicidad
Nevirapina (NVP)	Viramune <sup>®</sup> Boehringer Ingelheim; 1996	ITRAN	SNC (somnolencia, dolor de cabeza, fatiga) y dermatológicos (prurito, salpullido), GI (diarrea, náuseas), hepatotoxicidad (elevados niveles de gamma glutamiltransferasa) y fiebre

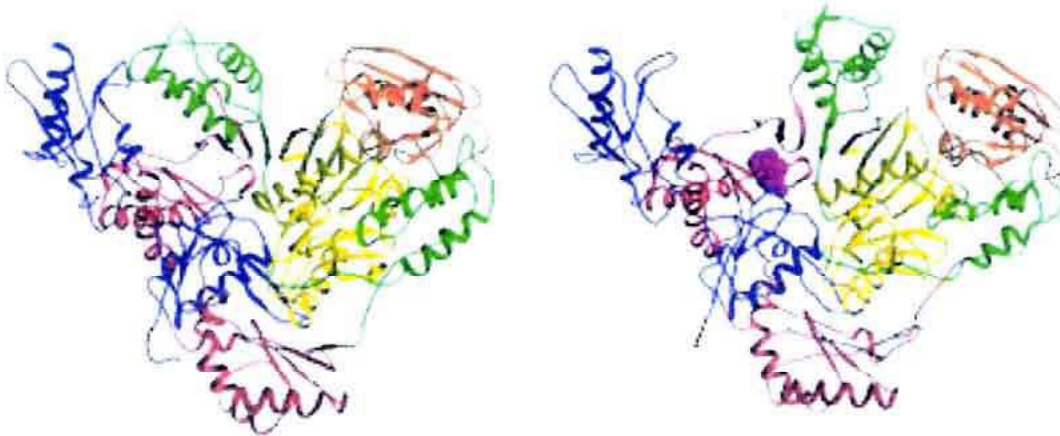


**Tabla 1. Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de infección con VIH (continuación)**

Delavirdina (DLV)	Rescriptor <sup>3</sup> Pfizer; 1997	ITRNN	Dermatológicos (salpullido), GI (náusea, vómito, diarrea); SNC (dolor de cabeza, fatiga) y hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa)
Efavirenz (EFV)	Sustiva <sup>3</sup> Bristol-Myers Squibb; 1998	ITRNN	GI (náusea); SNC (dolor de cabeza, fatiga, mareo, ansiedad); dermatológicos (salpullido)
Saquinavir (SQV)	Invirasa <sup>3</sup> , Fortovasa <sup>3</sup> Hoffmann-La Roche; 1995	IP	GI (diarrea, náusea), SNC (neuropatía periférica, dolor de cabeza), hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa) y dermatológicos (prurito)
Ritonavir (RTV)	Norvir <sup>3</sup> Abbot; 1996	IP	SNC (decaimiento general), GI (náusea, vómito, diarrea) y hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa)
Indinavir (IDV)	Crixivan <sup>3</sup> Merck & Co; 1997	IP	GI (náusea, vómitos, diarrea, dolor abdominal), SNC (dolor de cabeza), hepatotoxicidad (elevados niveles de bilirrubina total, amilasa) y nefrototoxicidad (nefrolitiasis)
Nelfinavir (NFV)	Viracept <sup>3</sup> Pfizer; 1997	IP	GI (diarrea, náusea, vómito, pérdida del apetito) y SNC (dolor de cabeza)
Amprénavir (APV)	Agenerase <sup>3</sup> Glaxo-SmithKline; 1999	IP	SNC (fatiga, dolor de cabeza), GI (náusea, vómito, diarrea) y dermatológicos (salpullido)
Lopinavir/ritonavir (LPV)	Kaletra <sup>3</sup> Abbot; 2000	IP	GI (cólicos, náusea, vómito, diarrea), SNC (decaimiento general, debilidad, fatiga, dolor de cabeza), dermatológicos (irritaciones en la piel) y pancreatitis
Atazanavir	Reyataz <sup>3</sup> Bristol-Myers Squibb; 2003	IP	Hepatotoxicidad (elevados niveles de bilirrubina), GI (náusea) y dermatológicos (pigmentación amarillenta en manos)
Fosamprenavir (FPV)	Lexiva <sup>3</sup> Glaxo-SmithKline; 2003	IP	SNC (dolor de cabeza), GI (náusea, vómito, diarrea, pérdida del apetito) y dermatológicos (salpullido)
Enfuvirtida (T20)	Fuzeon <sup>1</sup> Trimeris and Hoffmann-La Roche; 2003	IF	Dermatológicos (irritaciones en la piel), SNC (neuropatía periférica, fatiga), GI (náusea, vómito) y fiebre.

SNC: sistema nervioso central; GI: gastrointestinales.  
Modificado de Tarinas A., et al., 2000; Cos, P., et al., 2004; [www.aidsmed.com/drugs](http://www.aidsmed.com/drugs)

Los ITRNN interactúan en forma no competitiva con un sitio alostérico de la enzima. Esta unión produce un cambio conformacional en la enzima (Figura 5) que provoca la disminución de la afinidad del sustrato por el sitio activo (Arnold E., *et al.*, 1992). El sitio de unión de los ITRNN (*pocket*) está localizado a 10 Å de distancia del sitio de unión del sustrato y está asociado funcional y espacialmente con este sitio activo (Arnold E., *et al.*, 1992; Kroeger M. B., *et al.*, 1995). La interacción cooperativa entre estos 2 sitios posibilita un incremento en la efectividad de los ITRAN e ITRNN al utilizarlos en la terapia combinada (De Clercq E., 2000).



**Figura 5.** Cambios conformacionales en la TR VIH-1 debido a la unión de un Inhibidor de Transcriptasa Reversa No Nucleósido (ITRNN).

(Modificado de Arnold E., *et al.*, 1992; <http://www.sarawak-medichem.com/cala/pcres.htm>)

Los ITRNN son capaces de inhibir solamente a la TR de VIH-1, pero no a la del VIH-2 u otros retrovirus. Esta especificidad se debe a que solo en la TR VIH-1 se presenta una cavidad altamente hidrófoba y flexible donde se puede colocar en forma conveniente un compuesto diferente al sustrato de la enzima. Se



han descrito diversas interacciones que ocurren entre los análogos no nucleósidos y esta cavidad hidrófoba (Debyser Z., *et al.*, 1992). Algunas de estas interacciones son electrostáticas con algunos residuos, como: K101, K103 y E138; fuerzas de Van der Waals con L100, V106, Y181, G190, W229, L234 y Y318 y puentes de hidrógeno (De Clercq E., 2000).

A pesar de su diversidad estructural, existe un modo común de unión de los ITRNN a TR (Kroeger M. B., *et al.*, 1995). Estos inhibidores causan un reposicionamiento de la porción que contiene los residuos de ácido aspártico en las posiciones 110, 185 y 186 de la subunidad p66. Esto sugiere que los ITRNN inhiben TR por el cierre del sitio activo catalítico en una conformación inactiva reminiscente de la conformación observada en la subunidad inactiva p51 (Esnouf R., *et al.*, 1995; Kroeger M. B., *et al.*, 1995). Cuando los ITRNN se unen a la cavidad hidrofóbica de la TR (por ejemplo, nevirapina) mantienen una conformación similar. Difícilmente estos inhibidores se afectan unos a otros, pues los residuos de cadena de la cavidad hidrofóbica se adaptan a la unión de cada inhibidor de un modo altamente específico (Kroeger M. B., *et al.*, 1995; De Clercq E., 2000).

A pesar de que estos agentes antivirales han demostrado contribuir a la reducción de la carga viral, la alta tasa de replicación del VIH ( $10^{12}$  viriones por día) y su inherente variación genética (tasa de mutaciones del orden de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  sustituciones por nucleótido) conducen a la generación de cepas que exhiben resistencia a los fármacos empleados (De Clercq E., 1993; Freed E. O., Martin M. A., 2001). Las mutaciones que inducen la resistencia pueden tomar parte en cualquier lugar del genoma viral, incluyendo la TR. Múltiples mutaciones asociadas a resistencia han sido descritas para agentes anti TR VIH (tanto ITRAN como ITRNN), algunos ejemplos son: AZT (T215Y) (Kellam P., Boucher C. A. B., Larder B. A., 1992), ddI (L74V), ddC (K65R), d4T (V75T) (Lacey S. F., Larder B. A., 1994), 3TC (M184V) (Kavlick M. F., *et al.*, 1995). Para el caso de los ITRNN se sabe que una sola mutación, K103N puede causar que el VIH resista a todos los ITRNN (Munk B., 2003); mientras que Y181C puede conferir resistencia a algunos ITRNN.

Por otra parte, algunas mutaciones pueden provocar resistencia cruzada a diferentes compuestos (De Clercq E., 2000).

### 2.3 Terapia Antiretroviral Altamente Activa

Las combinaciones de inhibidores de TR y PR conforman los esquemas que se denominan terapia antiretroviral altamente activa (TARAA ó HAART), los cuales tienen un seguimiento protocolizado máximo, actualmente, de seis años. El uso de TARAA ofrece beneficios claros sobre la calidad y expectativa de vida de las personas con infección por VIH, mejorando el estado inmunológico general (De Clercq E., 1999). Esto cambió la perspectiva del VIH de una enfermedad mortal a un padecimiento crónico y tratable (Secretaría de Salud, 2004).

TARAA ha probado ser muy benéfica especialmente en combinaciones triples de fármacos (3 ITR; 2 ITR + 1 IP) (Tabla 2) sobre mono y bicombinaciones. En los pacientes infectados con VIH, ocasiona una reducción sostenida de carga viral plasmática, incremento en el número de linfocitos CD4, así como el retardo de la progresión a SIDA (Press N., *et al.*, 2002). Sin embargo, estos beneficios se han visto limitados por importantes riesgos asociados con el uso prolongado de estos tratamientos, tales como trastornos metabólicos y reacciones farmacológicas cruzadas con otros fármacos (De Clercq, E., 2000). La posibilidad de bajo apego de los pacientes a tratamientos permanentes se considera un factor importante en la inducción de resistencia viral. También podría traer efectos graves de toxicidad reconocidos en el sistema cardiovascular, hígado, riñón, cerebro, páncreas y piel (De Clercq, E., 2000; Guaraldi G., *et al.*, 2003; Secretaría de Salud, 2004). El hecho de que los ITR son usados siempre en la terapia triple, reafirma la búsqueda de nuevos inhibidores como alternativas en la terapia de TR VIH.



**Tabla 2.** Combinaciones triples de fármacos más comunes (TARAA)

<b>Tratamiento</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
IP + 2 ITRAN	Bien estudiado a largo plazo Efectivo y duradero	Efectos adversos corto- largo plazo
ITRNN + 2 ITRAN	Bien tolerados Mayor efectividad	Baja efectividad con altas cargas virales
3 ITRNN (AZT+ 3TC + ABC)	Bien tolerados	Menos efectivo con cargas virales altas Potencia relativa Resistencia
IP + ITRNN + ITRAN	Tres mecanismos de acción Alta potencia Efectivo en altas cargas virales	Interacciones con otros medicamentos Potencial de resistencia múltiple No está bien estudiado

Modificado de <http://www.salud.gob.mx/conasida/medicos/guias/medica/guia2004.pdf>.

## **2.4 Productos Naturales como Antiretrovirales**

En la búsqueda de nuevas sustancias químicas con posible actividad inhibitoria sobre VIH y en especial sobre TR, se han considerado a los productos naturales. Como resultado de estudios bioprospectivos de la flora y fauna, se han logrado identificar más de 60 productos naturales anti VIH-1 (Vlietinck A. J., *et al.*, 1998; Matthée G., Wroigth A. D., Köning G. M., 1999), que además de ser potencialmente útiles en el tratamiento del SIDA, han constituido moldes para el diseño de nuevos fármacos. Los productos naturales anti VIH de origen vegetal presentan una gran diversidad estructural, encontrándose: alcaloides, polisacáridos sulfatados, carbohidratos, cumarinas, taninos, derivados de ácidos fenólicos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, iridiodes, lignanos, xantonas, tiofenos, saponinas (Matthée G., Wroigth A. D., Köning G. M., 1999;

Yang S. S., *et al.*, 2001; Cos, P., *et al.*, 2004). Para algunos de ellos, se ha determinado su forma de acción, destacando aquellos que inhiben *in vitro* la actividad de TR (Kashman Y., *et al.*, 1992; Huang T. B., Fong W. P., Yeung H. W., 1997), la entrada/fusión, la formación de sincicios (Vlietinck A. J., *et al.*, 1998), así como la inhibición de PR e IN (Min B. S., *et al.*, 1999). Como ya se ha comentado con anterioridad, actualmente se propone actuar sobre blancos, tanto virales como celulares como una estrategia integral contra el VIH. En la tabla 3 se citan algunos de los ejemplos de la variedad de estos productos naturales aislados de plantas superiores y su sitio de acción en particular.

Entre los productos naturales extraídos de bacterias, hongos, invertebrados terrestres y marinos, destacan los siguientes: cianovirina-N, una proteína aislada de la cianobacteria *Nostoc ellipsosporum* y que ha sido identificada como inhibidor de entrada/fusión; la esponjotimidina, obtenida de la esponja *Cryptotethia crypta* y que se ha identificado como inhibidor de transcriptasa reversa; lamellarina  $\alpha$  20-sulfato ha sido reportado como un nuevo inhibidor de integrasa proveniente del molusco *Lamellaria* sp. y los déspidos y depsidonas aislados de líquenes y que se conocen como inhibidores de integrasa (Huang T. B., Fong W. P., Yeung H. W., 1997; Vlietinck A. J., *et al.*, 1998; Matthée G., Wroight A. D., Köning G. M., 1999; Yang S. S., *et al.*, 2001).

Entre los productos naturales identificados hasta hoy, los más sobresalientes son las cumarinas, puesto que actualmente el (+)-calanólido A (Kashman Y., *et al.*, 1992) se encuentra en la fase II/III del estudio clínico (Sarawak MediChem Pharmaceuticals, Inc., 2004). Este compuesto fue obtenido junto con otros similares de la familia Clusiaceae y será discutido con mayor amplitud más adelante (cf. Capítulo 3).

**Tabla 3.** Algunos productos naturales de origen vegetal con actividad anti VIH-1

Clase	Compuesto Químico	Sitio de acción	Fuente
Diterpeno	Ácido carnosólico	Proteasa	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae)
Triterpeno	Ácido betulínico y sus derivados	Entrada/fusión Formación de sincicio Proteasa	<i>Syzygium claviflorum</i> (Roxb.) Wall ex Cowan & Cowan (Myrtaceae)
Alcaloide dimérico	Michelaminas A, B y C	Entrada/fusión Transcriptasa reversa	<i>Ancistrocladus korupensis</i> D. W. Thomas & Gereau (Ancistrocladaceae)
Ácido fenólico	3,5-dicafeoil-ácido quínico	Integrasa y gp 120	<i>Baccharis genistelloides</i> (Lam.) Pers. (Asteraceae)
Glicosil-flavonoide	Baicalin	Transcriptasa reversa	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi (Lamiaceae)
Tanino	Putranjavin A	Transcriptasa reversa	<i>Phyllanthus emblica</i> L. (Euphorbiaceae)
Polisacárido	Acemanano	Activación de células asesinas	<i>Aloe barbadensis</i> Mill (Liliaceae)
Triterpeno	Ácido ursólico y sus derivados	Proteasa	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge (Rosaceae)
Triterpeno	Ácido oleanólico y sus derivados	Proteasa	<i>Xanthoceras sorbifolia</i> Bunge (Sapindaceae)
Alcaloide	Nitidina	Transcriptasa reversa	<i>Toddalia asiatica</i> (L.) Lam (Rutaceae)
Ácidos galoilquinico	Ácido 1,3,4,5-tetra-O-galoilquinico	Transcriptasa reversa	<i>Lepidobotrys staudtii</i> Engl. (Lepidobotryaceae)
Alcaloide	Cefarantina	TNF- $\alpha$ y NF- $\kappa$ B	<i>Stephania cephalantha</i> Hayata (Menispermaceae)
Cumarina	Calanólido A	Transcriptasa reversa	<i>Calophyllum lanigerum</i> var. <i>austrocoriaceum</i> (Clusiaceae)

Basado en: Huang T. B., Fong W. P., Yeung H. W., 1997; Vlietinck A. J., et al., 1998; Matthee G., Wroight A. D., Köning G.M., 1999; Min B. S., et al., 1999; Ma C., et al., 2000; Yang S. S., et al., 2001; Cos, P., et al., 2004.



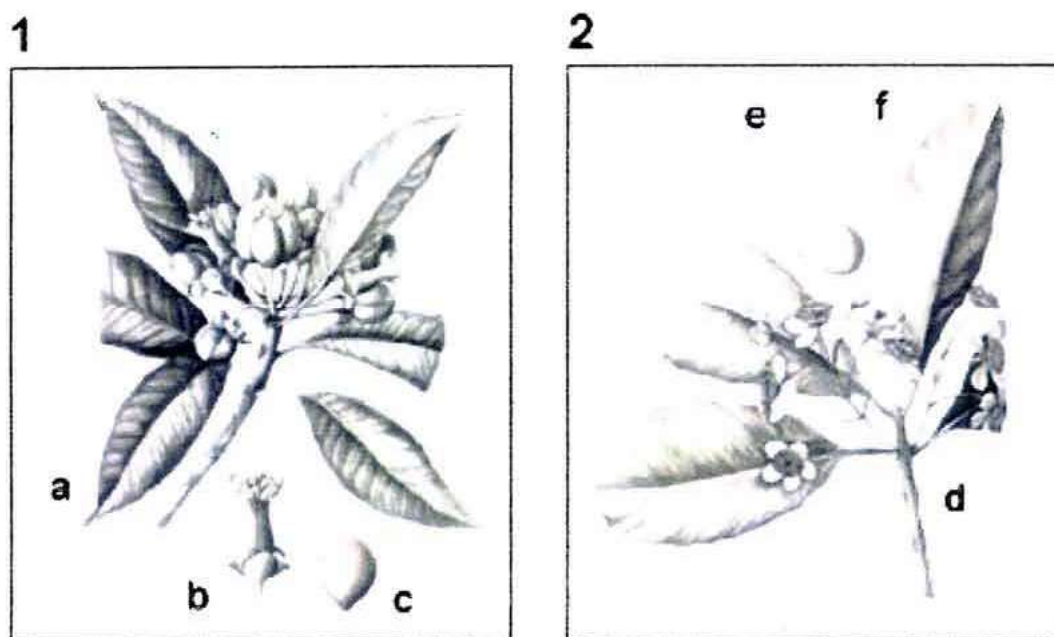
### 3. FAMILIA CLUSIACEAE COMO FUENTE DE ANTIRETROVIRALES

#### 3.1 Diagnósis de la Familia

La familia Clusiaceae está compuesta por árboles, arbustos, lianas y hierbas anuales o perennes de distribución pantropical, aunque también se han reportado en la región templada del hemisferio norte. Está constituida por aproximadamente 36 géneros y 1600 especies, donde el género tipo *Clusia*, posee cerca de 300 especies (Kearns D. M., *et al.*, 1998).

Los miembros de la familia Clusiaceae se caracterizan principalmente por presentar: hojas simples, usualmente opuestas y enteras sin estípulas (Figura 6). Las inflorescencias son terminales ó axilares, cimosas ó flores solitarias. Las flores son bisexuales ó unisexuales, dioicas, actinomórficas, con mucha frecuencia son blancas, amarillas ó rosas; bracteólas casi siempre presentes. Sépalos de 2-4, libres ó con poca frecuencia fusionados; pétalos (2)3-6(14), libres, decusados, imbricados ó convolutos. Los estambres son usualmente numerosos, frecuentemente agrupados en manojos de 2-5 y opuestos a los pétalos; las anteras son dehiscentes por aberturas longitudinales ó transversas ó por una variedad de tipos de poros distintos (*Clusia*). El ovario es compuesto, superior con (1-)3-5(-20+) carpelos unidos; placentación axial, menos frecuentemente parietal, basal o apical; estilos 1 ó tantos como carpelos; estigmas más o menos expandidos, lisos (raramente pilosos) ó puntiagudos y papilados, ó minúsculamente porados. Los frutos son usualmente cápsulas, aunque en algunas ocasiones pueden ser drupas; semillas (1)2-varias por carpelo, arilados o no (Maguire B., 1979; Kearns D. M., *et al.*, 1998).





**Figura 6.** Especies pertenecientes a la familia Clusiaceae. 1. *Symphonia globulifera* (a) inflorescencia terminal; (b) androceo, conformado por estambres fusionados, alrededor del estigma con 5 lóbulos; (c) fruto (cápsula). 2. *Calophyllum inophyllum* (d) inflorescencia axilar; (e) estambre; (f) gineceo.

(Modificado de Heywood V., 1993).

### 3.2 Clusiaceae en México

Clusiaceae fue revisada por última vez en nuestro país, hace 81 años (Standley P. C., 1923). Entonces, se reportaron 4 géneros y 11 especies.

Dada la falta de tratamientos taxonómicos modernos que reflejen la situación actual de la familia Clusiaceae en nuestro país, fue necesario iniciar este trabajo de tesis con la revisión taxonómica de la familia, mediante investigaciones de herbario y de campo. Se concluyó que Clusiaceae en México actualmente consta de *ca.* 8 géneros y 21 especies (Tabla 4).

**Tabla 4.** Especies de Clusiaceae presentes en México

Género	# especies	Nombre
<i>Calophyllum</i>	1	<i>C. brasiliense</i>
<i>Clusia</i>	10	<i>C. flava</i> , <i>C. guatemalensis</i> , <i>C. lundelli</i> , <i>C. massoniana</i> , <i>C. minor</i> , <i>C. pringlei</i> , <i>C. quadrangula</i> , <i>C. rosea</i> , <i>C. salvinii</i> y <i>C. tetra-trianthera</i>
<i>Mammea</i>	1	<i>M. americana</i>
<i>Garcinia</i>	2	<i>G. intermedia</i> y <i>G. macrophylla</i>
<i>Chrysochlamys</i>	2	<i>C. guatemaltecana</i> y <i>C. nicaraguensis</i>
<i>Symphonia</i>	1	<i>S. globulifera</i>
<i>Vismia</i>	3	<i>V. baccifera</i> , <i>V. camparaguey</i> y <i>V. mexicana</i>
<i>Marila</i>	1	<i>M. laxiflora</i>

### 3.2.1 *Calophyllum brasiliense*

El género *Calophyllum* está constituido por 187 especies, todas ellas árboles tropicales, la mayoría (179) se encuentran en el Viejo Mundo, en especial en Indo-Malasia. Apenas 8 especies se distribuyen en el Continente americano (Stevens P. F., 1980). En cuanto a diversidad, destacan Cuba, con 5 especies de *Calophyllum* y Colombia con 3 (García Barriga H., 1992). *Calophyllum brasiliense* es la única especie del género que se encuentra en México (Pennington T. D., Sarukhán J., 1998).

*Calophyllum brasiliense* es un árbol caducifolio con una altura aproximada de 40 a 50 metros y con un diámetro a la altura del pecho (d.a.p.) de aproximadamente 1.80 metros. Presenta flores blancas, dioicas. Las flores masculinas despiden un ligero aroma, florece de julio a diciembre. El fruto se presenta en drupas de color verde amarillento (Pennington T. D., Sarukhán J., 1998; Kearns D. M., et al., 1998). Se distribuye en América Latina, desde Brasil hasta México. En nuestro país, crece en los remanentes de las selvas altas y medianas

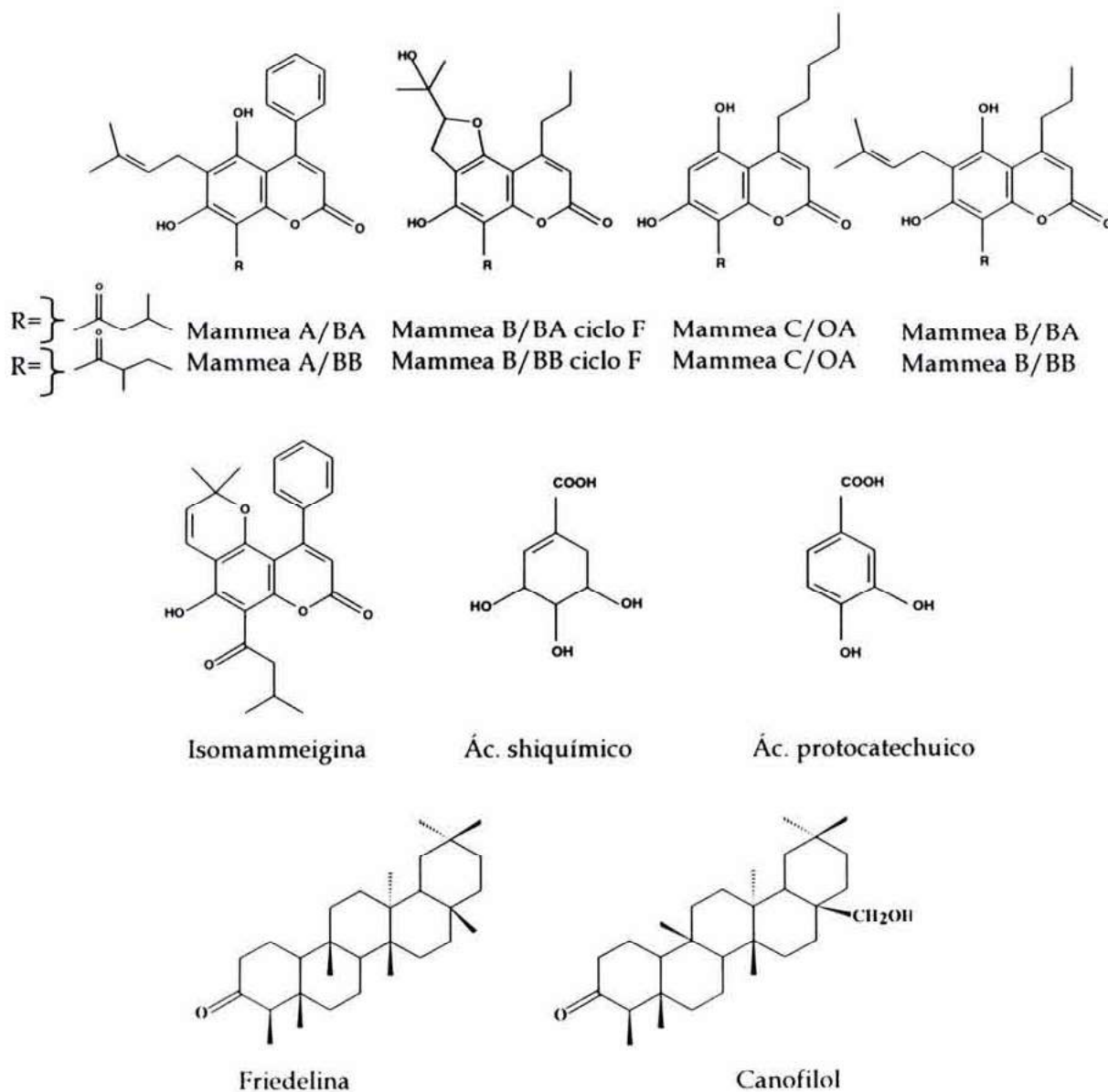
perennifolias y subcaducifolias. Recibe un sin número de nombres comunes, siendo el más común "Barí". Al látex que se obtiene de la corteza, llamado "Bálsamo de María", se le atribuyen popularmente propiedades medicinales. También se emplea como aglutinante e impermeabilizante en la elaboración de papel de corteza. De sus semillas se obtiene un aceite que se utiliza en algunas comunidades rurales con fines de iluminación y para curar algunas enfermedades cutáneas. En la Sierra de Atoyac, Guerrero, el té elaborado con la corteza de este árbol se da de beber a las parturientas durante nueve días para que "les limpie la matriz" (Soto Núñez, 1995). Desde el punto de vista fitoquímico se han realizado estudios de las hojas, madera, corteza y resina. Las xantonas, cromononas y cumarinas son los metabolitos secundarios más comunes que se han detectado en esta especie.

*Hojas.* Estudios de las hojas de ejemplares colectados en Brasil reportaron la presencia de viperina y quercetina, ácidos (ácido gálico y ácido protocatechuico) y el biflavonoide amentoflavona. Estos compuestos fenólicos estuvieron relacionados con la actividad analgésica observada en estudios con ratones (daSilva K. L., *et al.*, 2001).

En nuestro laboratorio se analizaron las hojas de un ejemplar colectado en la Sierra de Santa Martha, Veracruz. Presentó como componentes principales cumarinas del tipo de las mammeas, como son mammea A/BA, A/BB, isomammeigina, mammea B/BA, B/BB, C/OA, C/OB, B/BA ciclo F y B/BB ciclo F (Figura 7). También se aislaron triterpenos como la friedelina y canofilol, el biflavonoide amentoflavona y los ácidos protocatechuico y shikímico (Figura 7). Las cumarinas mostraron efecto citotóxico sobre las líneas tumorales K562 (linfoma), U251 (sistema nervioso central) y PC3 (próstata). Las mezclas de mammea A/BA+A/BB y mammea C/OA + C/OB inhibieron el crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo, cuando estos compuestos fueron evaluados contra TR VIH-1, ninguno de ellos mostró actividad mayor al 10% de inhibición (Reyes-Chilpa R., *et al.*, 2004). Al



analizar por cromatografía en capa fina los ejemplares de otra zona de colecta ubicada también en el estado de Veracruz (Los Tuxtlas), se encontró que la composición química de los extractos de hexano era diferente. Este quimiotipo fue sujeto de estudio en esta tesis respecto de sus propiedades inhibitorias sobre el VIH-1 y en particular sobre la enzima TR, como parte de las especies de la familia Clusiaceae que crecen en nuestro país.

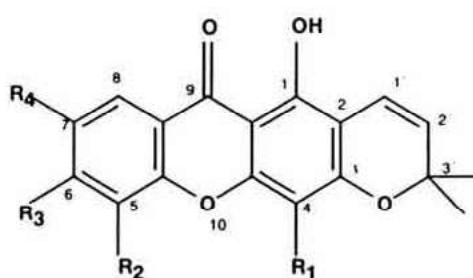


**Figura 7.** Cumarinas, ácidos y triterpenos aislados de las hojas de *C. brasiliense* colectado en Santa Martha, Veracruz.

(Reyes-Chilpa R., et al., 2004).



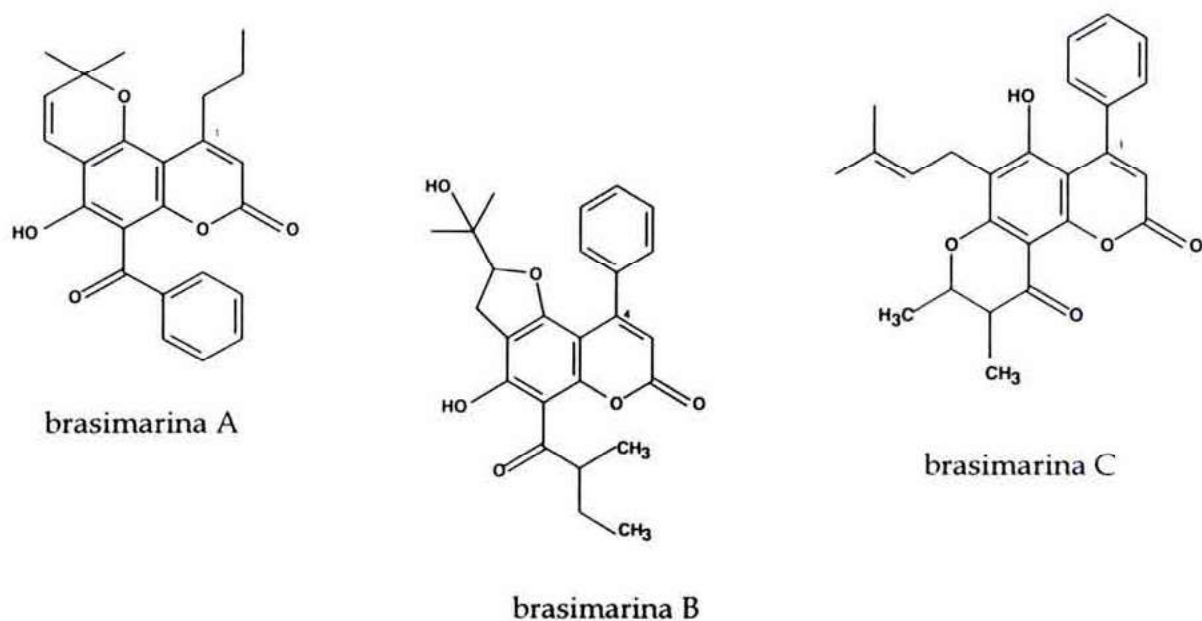
Corteza. Ito C., *et al.* (2002) reportaron el aislamiento de 7 nuevas xantonas (brasixantonas A, B, C, D, E, F y G) (Figura 8) aisladas de la corteza de un ejemplar colectado en Brasil, y 3 nuevas cumarinas 4-sustituídas (brasimarinas A, B y C) (Ito C., *et al.*, 2003c) (Figura 9). Entre estos compuestos, 4 xantonas y las 3 cumarinas mostraron actividad inhibitoria significativa sobre la activación del virus Epstein-Barr.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>A</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	
<b>B</b>		H	H	OH
<b>C</b>		H	H	OH
<b>D</b>		H	H	OH
<b>E</b>		H	OH	OCH <sub>3</sub>
<b>F</b>	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>

**Figura 8.** Brasixantonas aisladas de la corteza de *C. brasiliense*. B, C y D mostraron actividad inhibitoria significativa en la activación del virus Epstein-Barr.

(Ito C., *et al.*, 2002).

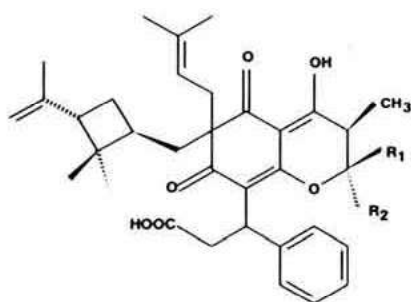


**Figura 9.** Coumarinas aisladas de la corteza de *C. brasiliense* que presentaron actividad inhibitoria significativa sobre la activación del virus Epstein-Barr.

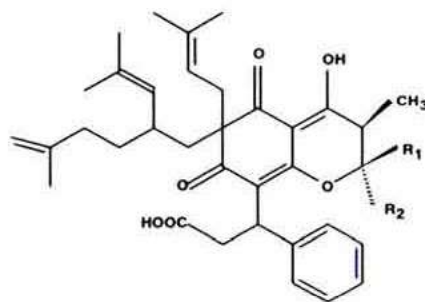
(Ito C., *et al.*, 2003c).

Recientemente, se estudió la corteza de un ejemplar colectado en nuestro país en Soteapan, Veracruz. Se aislaron seis nuevas cromanonas, como los ácidos: brasiliensofílico A, isobrasiliensofílico A, brasiliensofílico B, isobrasiliensofílico B, brasiliensofílico C e isobrasiliensofílico C de la corteza de *Calophyllum brasiliense*. Las cuatro primeras cromanonas presentan un anillo ciclobutiril poco frecuente y las últimas dos presentan sustituyentes isopropilo (Figura 10). El látex de la corteza de este árbol es usado tradicionalmente por los indígenas Popoloca que habitan el sur de Veracruz para tratar el dolor de dientes y para prevenir infecciones por microorganismos. Las cromanonas se evaluaron en ensayos de actividad antibacteriana contra las bacterias gram-positivas *Bacillus cereus* y *Staphylococcus epidermidis*, donde sólo

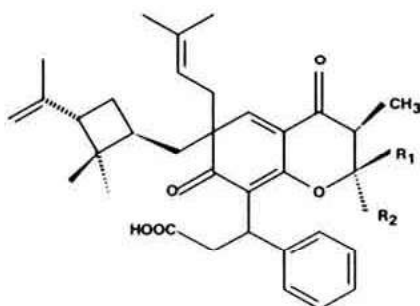
brasiliensofílico A e isobrasiliensofílico A mostraron alta actividad inhibitoria (MIC= 1  $\mu\text{g/ml}$ ). Los compuestos ácido brasiliensofílico B, isobrasiliensofílico B, presentaron moderada actividad inhibitoria (MIC= 4  $\mu\text{g/ml}$ ), mientras que los brasiliensofílico C e isobrasiliensofílico C fueron menos activos (MIC= 16  $\mu\text{g/ml}$ ). La presencia de un anillo ciclobutil en los compuestos brasiliensofílico A, isobrasiliensofílico A, ácido brasiliensofílico B e isobrasiliensofílico B puede contribuir a la actividad antibacteriana observada. Estas seis cromononas también fueron probadas en ensayos de citotoxicidad en líneas celulares como KB, HeLa, Jurkat T y células cancerígenas de miosarcoma; sin embargo ninguno de los compuestos presentó actividad citotóxica significativa ( $\text{IC}_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ ) (Cottiglia F., *et al.*, 2004).



$\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}_3$  ác. brasiliensofílico A  
 $\text{R}_1 = \text{CH}_3, \text{R}_2 = \text{H}$  ác. isobrasiliensofílico A



$\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}_3$  ác. brasiliensofílico C  
 $\text{R}_1 = \text{CH}_3, \text{R}_2 = \text{H}$  ác. isobrasiliensofílico C



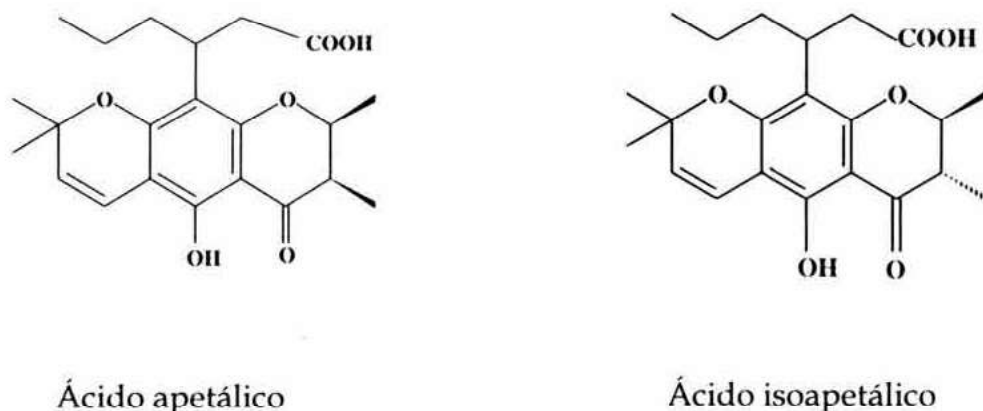
$\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}_3$  ác. brasiliensofílico B  
 $\text{R}_1 = \text{CH}_3, \text{R}_2 = \text{H}$  ác. isobrasiliensofílico B

**Figura 10.** Cromononas aisladas de la corteza de *C. brasiliense* de las cuales el ácido brasiliensofílico A y el ácido isobrasiliensofílico A fueron los compuestos con mayor actividad antibacteriana.

(Cottiglia F., *et al.*, 2004).



*Resina.* Stout G. H., Krahn M. M. y Breck G. D. (1968) estudiaron la resina de la corteza de *C. brasiliense* var. *rekoi* (Costa Rica) y obtuvieron 2 cromanonas, el ácido brasiliésico y el ácido isobrasiliésico. Plattner R. D., *et al.* (1974) reportaron el aislamiento de este tipo de compuestos del aceite de las semillas de la misma especie, obteniendo ácido apetalico e isoapetalico (Figura 11).



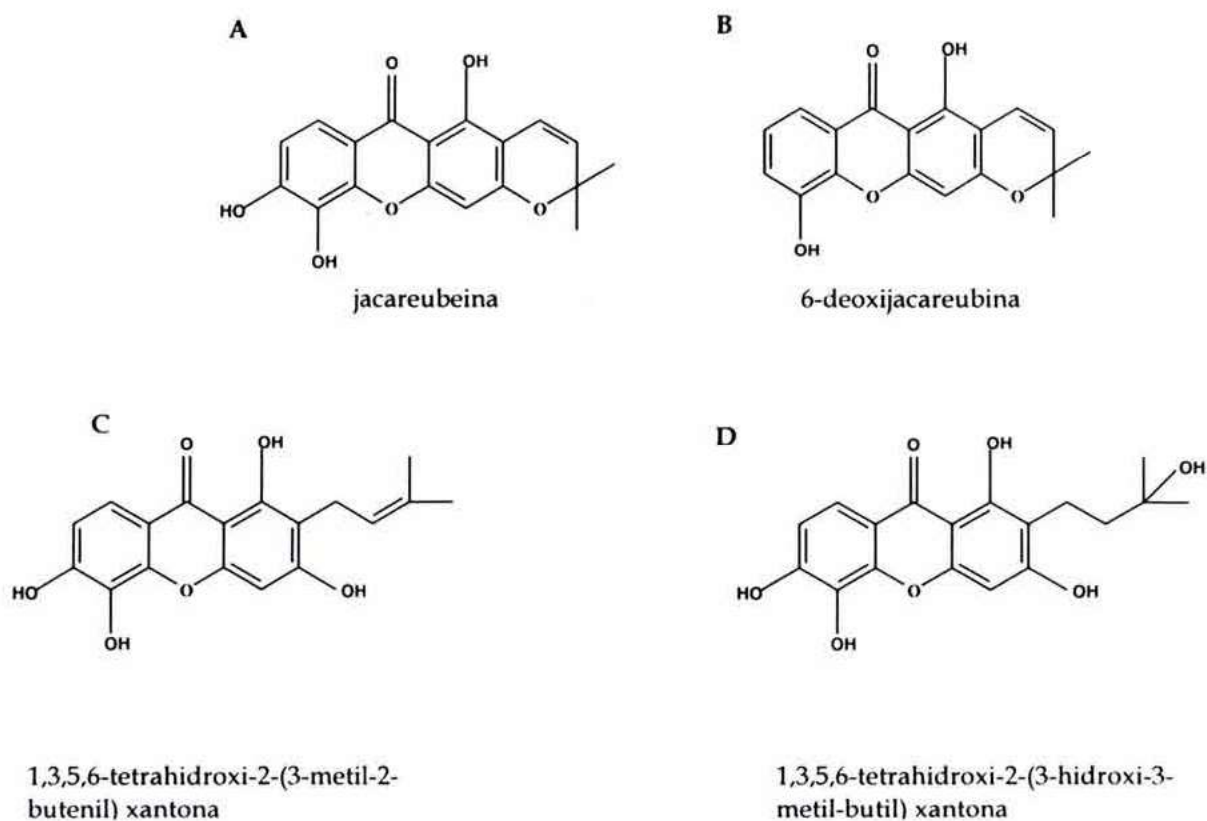
**Figura 11.** Ácido apetalico e isoapetalico aislados del aceite de las semillas de *C. brasiliense*.

(Plattner R. D. *et al.*, 1974.)

*Madera.* Del duramen de *C. brasiliense* proveniente de ejemplares colectados en Brasil (Pereira M. O., Gottlieb O. R., Magalhaes M. T., 1966; 1967) y también de un ejemplar de México (Chiapas) se han aislado principalmente xantonas simples y preniladas, así como triterpenos del tipo de la friedelina. La muestra mexicana presentó únicamente xantonas preniladas, mientras que la de Brasil contuvo ambos tipos. Las xantonas preniladas jacareubina, 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona, 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona mostraron actividad inhibitoria (67.3%) del crecimiento

micelial del hongo de pudrición morena *Postia placenta* (Reyes-Chilpa R., Jiménez-Estrada M., Estrada-Muñiz E., 1997). Recientemente, Abe F., *et al.*, 2004, reportó que estas xantonas (Figura 12A y 12B), poseen alta actividad tripanocida (vs. *Trypanosoma cruzi*) (Figura 12).

Sin embargo, cuando estas xantonas fueron evaluadas contra TR VIH-1, ninguno de ellas mostró actividad inhibitoria (Estrada-Muñiz E., 2001).



**Figura 12.** Xantonas aisladas de la madera de *C. brasiliense* colectado en México. A, B y C mostraron actividad tripanocida (vs. *Trypanosoma cruzi*) y antifúngica (*Postia placenta*).

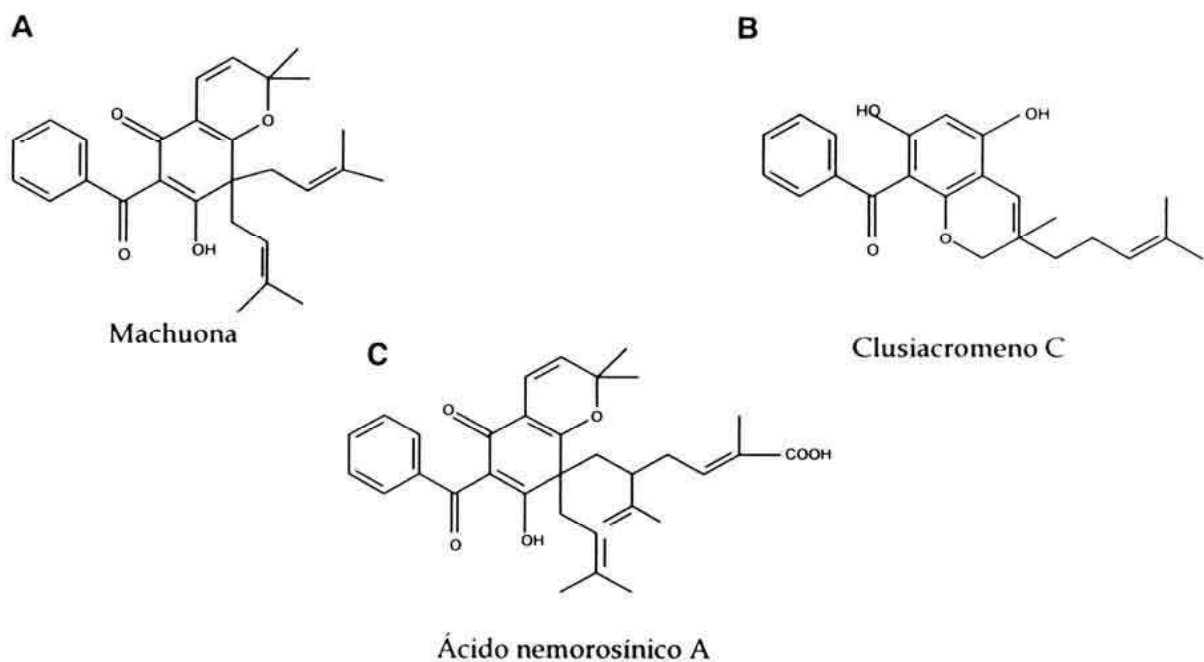
(Abe F., *et al.*, 2004).

### 3.2.2 *Clusia quadrangula*

El género *Clusia* comprende cerca de 250 especies, las cuales se distribuyen de manera importante en la América Tropical (Hammel B. E, 1986). En México se localizan 10 especies, que lo ubican como el género más numeroso de Clusiaceae. Son árboles o arbustos, frecuentemente epífitos cuando jóvenes, presentan hojas decusadas, enteras, coriáceas, lustrosas y por lo general carnosas. Las flores están en racimos axilares ó en panículas terminales; los frutos son capsulares usualmente carnosos (Kearns D. M., *et al.*, 1998). *Clusia quadrangula* crece en nuestro país como arbusto epífito ó árbol de 7 a 9 metros de altura. Las hojas son elípticas de 7 a 12 cm de largo y de 3 a 6 cm de ancho, acuminadas. Presentan las venas laterales muy numerosas y prominentes tanto en el haz como en el envés. Flores con pétalos de color blanco a crema del doble de largo que los sépalos, estambres muy numerosos. Frutos globosos u ovals de 2 cm de largo (Standley P. C., Williams L. O., 1961).

Respecto de los estudios fitoquímicos, de *Clusia* spp. se han aislado cerca de 30 compuestos, principalmente cromenos, benzofenonas y benzopiranos (Figura 13) (Delle Monache F., *et al.*, 1991a; 1991b; González J. G., *et al.*, 1995; Lokvam J., *et al.*, 2000; Christian O. E., *et al.*, 2001). Sin embargo, de las especies de *Clusia* con distribución en México, la única que ha sido estudiada desde el punto de vista químico es *C. rosea* (hojas colectadas en la República Dominicana), cuyos compuestos se tratarán en el apartado 3.3. La composición química de *C. rosea* y *C. quadrangula* originarias de México se desconoce.





(Delle Monache F., *et al.*, 1991a, 1991b; González J. G., *et al.*, 1995).

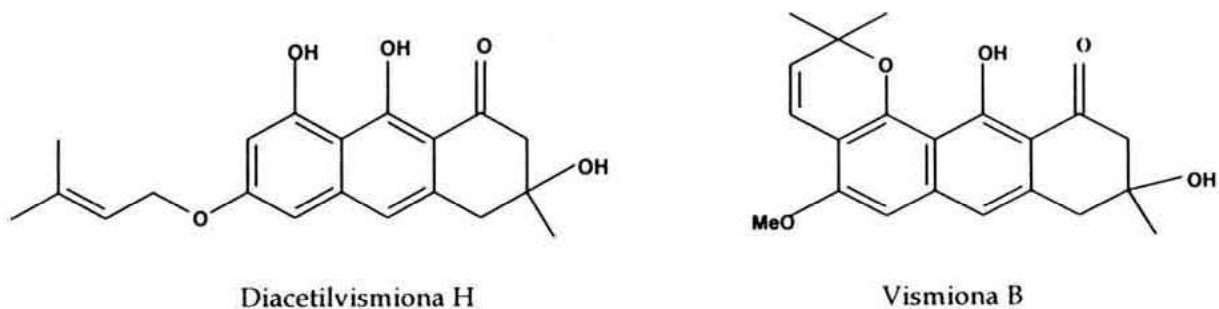
**Figura 13.** Metabolitos secundarios aislados del género *Clusia* spp. A. Aislado de *C. sandiense*. B. Constituyente del fruto de *C. multiflora*. C. Aislado de *C. nemorosa*.

### 3.2.3 *Vismia mexicana*

El género *Vismia* comprende cerca de 65 especies, las cuales se distribuyen de manera importante en la América Tropical desde México hasta Bolivia (Hammel B. E., 1986). Son árboles o arbustos, con las hojas densamente tomentosas que varían en color desde amarillo a naranja hasta rojo oscuro. *Vismia mexicana* crece en nuestro país como un árbol de copa triangular con hojas enteras, lanceoladas, típicamente acuminadas que miden entre 8 y hasta 18 cm y que en el envés son densamente tomentosas rojizas a blanquecinas y glabras en el haz. Las flores son terminales cimosas ó paniculadas, con 5 pétalos blancos,

estambres numerosos distribuidos en 5 grupos, frutos bacados globoso-ovoides de 1.5 cm y que contienen numerosas semillas (Standley P. C., 1923).

De acuerdo con estudios fitoquímicos previos, del género *Vismia* se han aislado triterpenos (principalmente  $\beta$ -sitosterol), antracenonas, antronas (Hussein A. A., *et al.*, 2003), antraquinonas, lignanos, benzofenonas (Fuller R. W., *et al.*, 1999a), benzocumarinas, y xantonas (Bilia A. R., *et al.*, 2000). De las especies con distribución en México, solo existen estudios fitoquímicos para *Vismia baccifera*. Las hojas de un ejemplar colectado en Panamá presentaron vismiona B, diacetilvismiona A y H (Figura 14) que fueron tóxicas a líneas celulares cancerígenas de mama (MCF-7) ( $IC_{50} = <2.0 \mu\text{g/ml}$ ), pulmón (H-460) ( $IC_{50} = <3 \mu\text{g/ml}$ ) y sistema nervioso central (SF-268) ( $IC_{50} = <3 \mu\text{g/ml}$ ) (Hussein A. A., *et al.*, 2003). La composición química de *V. baccifera* y *V. mexicana* originarias de México se desconoce.



**Figura 14.** Metabolitos secundarios aislados de *V. baccifera*

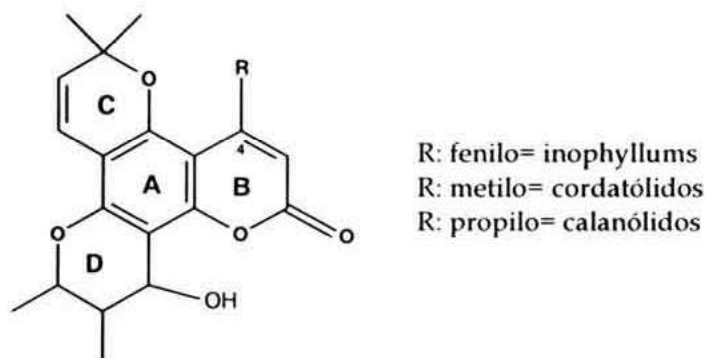
(Hussein A.A., *et al.*, 2003).

### 3.3 Metabolitos Secundarios con Actividad Anti VIH Aislados de Clusiaceae

La familia Clusiaceae ha sido estudiada químicamente desde hace casi medio siglo y recientemente, se han investigado las propiedades biológicas de sus metabolitos secundarios. Una variedad de compuestos han sido aislados e identificados de diversas especies de esta familia. Los terpenoides, cumarinas, xantonoides y benzofenonas son los metabolitos secundarios más comunes dentro de las especies de esta familia. Estos compuestos presentan diversas propiedades biológicas como antitumorales (Ito C., *et al.*, 1999; Itoigawa M., *et al.*, 2001; Ito C., *et al.*, 2003a; 2003b), antimaláricos (Francois G., *et al.*, 1999), antimicobacteriano (vs. *Mycobacterium tuberculosis*) (Suksamrarn S., *et al.*, 2003), antioxidantes (Chiang Y. M., *et al.*, 2003), antiparasitarias (Abe F., *et al.*, 2003; 2004), antifúngicas (Morel C., *et al.*, 2001; Oger J. M., *et al.*, 2002; Larcher G., *et al.*, 2004;), antibacteriano (Sakagami Y., *et al.*, 2002) y citotóxicas sobre líneas celulares cancerígenas (Banskota A. H., *et al.*, 1998; Seo E. K., *et al.*, 2000; Ho C. K., Huang Y. L., Chen C. C., 2002; Hussein A. A., *et al.*, 2003; Matsumoto K., *et al.*, 2003; Ee G. C., *et al.*, 2004). Sin embargo, la familia Clusiaceae ha alcanzado gran importancia en las últimas décadas, puesto que los extractos orgánicos de algunas especies, han exhibido una tasa de éxito mayor a otras familias respecto de su actividad anti VIH (Fuller R. W., *et al.*, 1999a).

Los compuestos anti VIH más importantes aislados de la familia Clusiaceae y del reino vegetal, son una serie de dipiranocumarinas tetracíclicas, aisladas en su totalidad del género *Calophyllum*, que comparten este esqueleto tetracíclico y las cuales difieren en el sustituyente en C<sub>4</sub>. Si se presenta un *n*-propilo se denominan calanólidos, si es un fenilo son inophyllums y si es un metilo son cordatólidos (Ishikawa T., 2000) (Figura 15).





**Figura 15.** Dipiranocumarinas tetracíclicas de *Calophyllum* spp.

(Modificado de Ishikawa T., 2000).

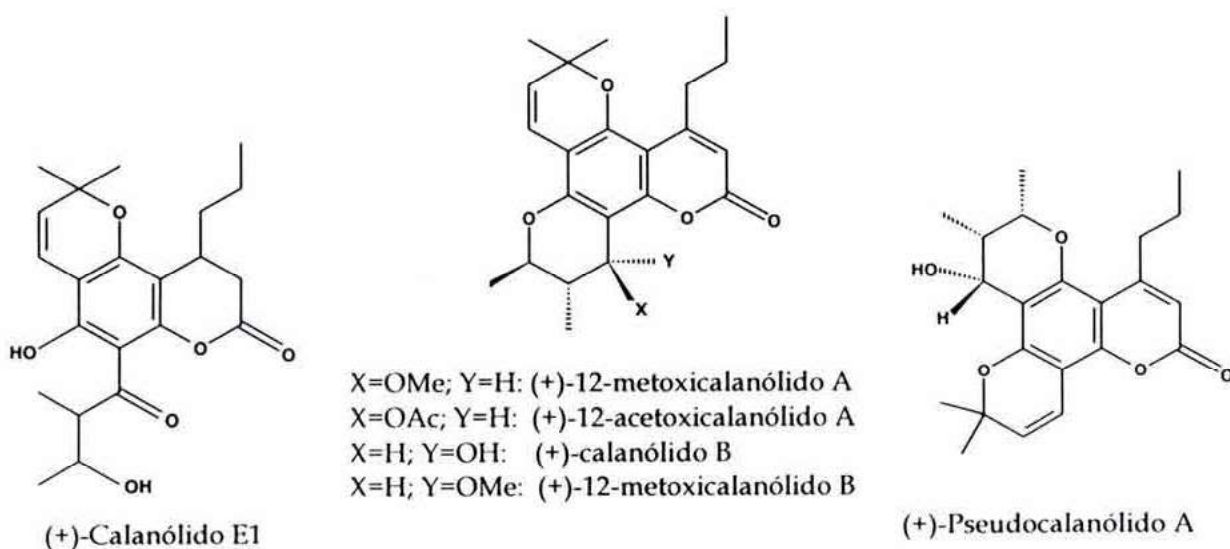
### 3.3.1 Calanólidos

En 1992 mediante un ensayo biodirigido de un extracto de los frutos y brotes de *Calophyllum lanigerum* var. *austrocoriaceum* colectado en Sarawak, Malasia, se aislaron y describieron las estructuras moleculares de 8 nuevas dipiranocumarinas tetracíclicas, denominadas calanólidos. Estos calanólidos aislados fueron: (+)-calanólido A, (+)-12-metoxicalanólido A, (+)-12-acetoxicalanólido A; (+)-calanólido B; (+)-12-metoxicalanólido B, (+)-calanólido C; (+)-calanólido D y (+)-calanólido E1 (Figura 16) (Kashman Y., *et al.*, 1992). En el mismo trabajo, se describieron por primera vez las propiedades anti VIH-1 de estos compuestos mediante ensayos *in vitro* de viabilidad celular con células linfoblásticas T humanas (CEM-SS) infectadas. Sin embargo, las estructuras propuestas para el (+)-calanólido C y (+)-calanólido D eran incorrectas y posteriormente fueron corregidas por McKee T. C. *et al.*, 1995, nombrándolos como (+)-pseudocalanólido C (que originalmente fue llamado (+)-calanólido C) y (+)-pseudocalanólido D (que originalmente fue llamado (+)-calanólido D).

El (+)-calanólido A detuvo la replicación del VIH-1 y confirió 100% de protección contra los efectos citopáticos del virus ( $EC_{50} = 0.1 \mu M$ ).

La citotoxicidad del compuesto se manifestó a concentraciones 200 veces mayores ( $IC_{50}= 20 \mu M$ ). Se demostró también que el (+)-calanólido A inhibe específicamente la actividad de la TR del VIH-1. No obstante, el (+)-calanólido A fue inactivo contra células infectadas con VIH-2, así como con la TR de este tipo de virus. El (-)-calanólido B, también presentó propiedades antivirales, pero requirió concentraciones 4 veces mayores para lograr niveles de citoprotección equivalentes a las del (+)-calanólido A. El 12-acetoxi-calanólido fue aún menos potente, pues presentó una  $EC_{50}= 2.7 \mu M$ , esto es una concentración 27 veces mayor comparada con la del compuesto líder. El (+)-12-metoxicalanólido A y el (+)-pseudocalanólido C mostraron una actividad antiviral no detectable, mientras que el (+)-pseudocalanólido D y el (+)-calanólido E1, fueron inactivos.

Un estudio posterior reportó el aislamiento del (-)-calanólido F de las hojas y brotes de *C. teysmanni* var. *inophylloide*, el cual mostró una actividad moderada ( $EC_{50}=ca. 2.8 \mu M$ ,  $IC_{50}=ca. 13 \mu M$ ,  $TI=4.5$ ), la cual fue comparable con la del (+)-12-acetoxicalanólido A.



**Figura 16.** Calanólidos aislados de *C. lanigerum* var. *austrocoriaceum*.

(Kashman Y., et al., 1992; McKee T., et al., 1995; Ishikawa T., 2000).

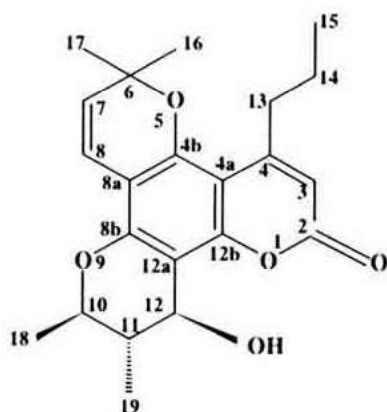
### 3.3.1.1 (+)-Calanólido A

El (+)-calanólido A se obtiene en cantidades muy reducidas (<1 mg/g extracto) de las hojas de *C. lanigerum* (Cardellina J. H., *et al.*, 1995). Otra manera de obtener un suministro adecuado de (+)-calanólido A que permitiese investigar sus propiedades farmacológicas, fue a través de la síntesis total de este compuesto. Actualmente se ha logrado sintetizar la mezcla racémica del calanólido A, logrando además la resolución de los enantiómeros (+) y (-) por métodos cromatográficos. El (+)-calanólido A sintético presentó una actividad antiVIH *in vitro* similar a la del producto natural mientras el (-)-calanólido A fue inactivo (Flavin M. T., *et al.*, 1996). Otros esfuerzos para lograr la síntesis del calanólido A, permitieron obtener la mezcla racémica del 12-oxocalanólido A (Khilevich A., *et al.*, 1996), logrando separar ambos enantiómeros (Xu Z. Q., *et al.*, 1998). Tanto el (+) como el (-), así como el (±)-12-oxocalanólido A, presentaron una alta actividad contra el VIH-1; la EC<sub>50</sub> de la mezcla racémica fue idéntica a la del (-)-calanólido B, lo cual es importante puesto que no se requeriría purificar los enantiómeros para su empleo. Los anteriores compuestos además resultaron activos contra el virus de inmunodeficiencia de simios (VIS); pero no así contra el VIH-2. El (+) y (±)-12-oxocalanólido A actúan específicamente sobre la TR (IC<sub>50</sub>= 10-40 μM), pero no inhiben la entrada/fusión, las enzima IN y PR (Xu Z. Q., *et al.*, 1998).

El (+)-calanólido A, fue administrado por vía oral, intravenosa e intraperitoneal a ratones. La biodisponibilidad, cuando se administró por vía oral, fue pobre, mientras que por vía intravenosa e intraperitoneal alcanzó aproximadamente el 95% en un período de 2.4 a 5.2 h (Newman R. A., Chen W., Madden T. L., 1998). También se ha determinado el perfil de seguridad del (+)-calanólido A en voluntarios sanos (VIH-1 negativos). El (+)-calanólido A es tolerado en dosis de hasta 800 mg, por lo que el INC inició los



estudios de fase clínica, ubicándolo actualmente en la fase II/III del período clínico (Sarawak MediChem Pharmaceuticals, Inc., 2004).



**Figura 17.** (+)-Calanólido A, ITRNN de origen natural.

(Kashman Y., *et al.*, 1992).

El (+)-calanólido A es el producto natural más importante en la terapia contra VIH, que se ha aislado hasta el momento (Figura 17). Por ello, se han realizado múltiples estudios que determinan su importancia en los campos de farmacología y cinética enzimática y que han demostrado algunas características del (+)-calanólido A, tales como:

- a) Presenta una actividad selectiva contra VIH-1, así como para subtipos de VIH-1. Sin embargo, no es activo contra VIH-2.
- b) Es completamente activo contra cepas de VIH-1 resistentes a AZT y 3TC, los cuales son 2 de los fármacos más comúnmente prescritos como ITRAN. Además, es activo contra cepas que contienen la mutación Y181C, que confiere resistencia a la mayoría de los ITRNN. Esta es una característica única e importante que distingue al (+)-

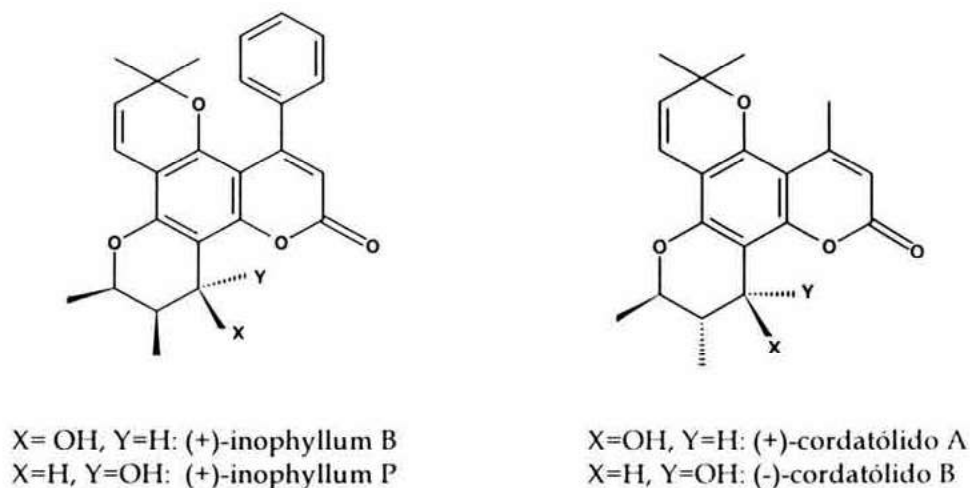
calanólido A de otros ITRNN, pues al parecer los residuos 100, 103, 188 y una región localizada entre los aminoácidos 225 y 427 son los sitios de unión de este compuesto. Adicionalmente, no se observaron cepas resistentes a ITRNN, después de una monoterapia de 14 días en la fase IB en pacientes infectados con VIH, sugiriendo que el (+)-calanólido A puede retardar la emergencia de mutaciones virales.

- c) En estudios preclínicos, el (+)-calanólido A mostró una interacción sinérgica en combinaciones dobles (con AZT, 3TC ó d4T). Estas interacciones se presentan también cuando el (+)-calanólido A es usado en un esquema de combinación triple que involucra IP + ITRAN como nelfinavir + 3TC. Esta cualidad de sinergismo, puede tener implicaciones terapéuticas muy importantes en un marco clínico debido a la terapia TARA.
- d) Debido a su naturaleza lipofílica se distribuye rápidamente en el sistema nervioso central y sistema linfático; por lo tanto penetra a los reservorios virales.
- e) Presenta una buena tolerabilidad en humanos, con los únicos efectos adversos de mal sabor de boca y mareo, que ubican a este compuesto como un candidato de una terapia a largo plazo.
- f) La tolerancia favorable y el perfil farmacocinético del (+)-calanólido A demostrados en las fases IA y IB, sugieren que puede ser desarrollado como un fármaco de ingesta de 1 ó 2 veces al día, lo cual favorecería el apego de los pacientes al tratamiento.
- g) El (+)-calanólido A es el único agente anti VIH que también presenta propiedades inhibitorias sobre *Mycobacterium tuberculosis*, que provoca una de las principales infecciones oportunistas en individuos con VIH (Sarawak MediChem Pharmaceuticals, Inc., 2004).

### 3.3.2 Inophyllums y Cordatólidos

Los inophyllum A, B, C, D, y E fueron aislados de *C. inophyllum* e inicialmente reportados con actividad piscicida (Kawazu K., Ohigashi H., Mitsui T., 1968).

El soulattrólido, que es el enantiómero de (+)-inophyllum P ha sido obtenido de 3 especies diferentes de *Calophyllum*: *C. inophyllum* (Patil A. D., et al., 1993), *C. soulattri* (Gunasekera S. P., et al., 1977) y *C. teysmannii* (Pengsuparp T., et al., 1996). Estos compuestos fueron evaluados respecto de sus actividades anti VIH. Entre ellos, (+)-inophyllum B y P (Figura 18) inhibieron TR VIH-1 con  $IC_{50}$ = 38 y 130 nM, respectivamente y ambos fueron activos contra VIH-1 en cultivo celular ( $IC_{50}$ = 1.4 y 1.6  $\mu$ M) (Taylor P. B., et al., 1994), mientras que el soulattrólido fue identificado como un potente inhibidor de TR VIH-1 ( $IC_{50}$ = 0.34  $\mu$ M) (Pengsuparp T., et al., 1996). Sin embargo, inophyllums D, A, C y E fueron menos activos o completamente inactivos (Taylor P. B., et al., 1994).



**Figura 18.** Inophyllums y cordatólidos con propiedades anti VIH.

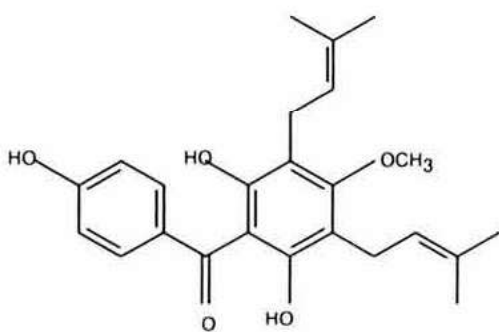
(Ishikawa T., 2000).



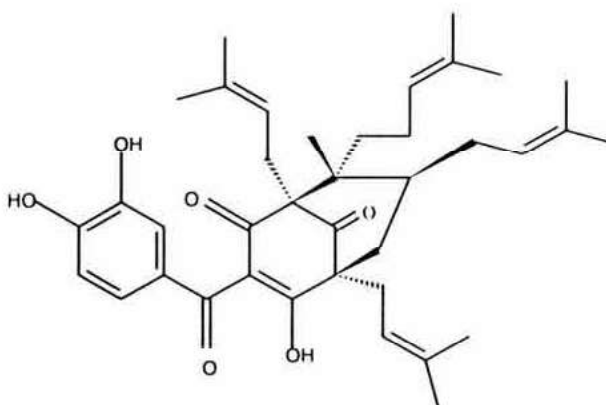
En cuanto a los cordatólidos, sólo 2 compuestos el (+)-cordatólido A y el (-)-cordatólido B (Figura 18) aislados de las hojas de *C. cordato oblongum* han sido evaluados respecto de sus actividades anti VIH. Ambos mostraron una inhibición sobre TR VIH-1 con  $IC_{50}$ = 12.3 y 19  $\mu$ M, respectivamente; sin embargo, en este caso no se ensayó el efecto de los compuestos sobre células infectadas (Dharmaratne H. R. W., *et al.*, 1998).

### 3.3.3 Benzofenonas y Xantonas

Diversas benzofenonas preniladas aisladas de especies de Clusiaceae, pertenecientes a los géneros *Allanblackia*, *Clusia*, *Garcinia*, *Symphonia* y *Vismia* han presentado actividad anti VIH-1. Las guttiferonas A, B, C y D (Figura 19) inhibieron parcialmente *in vitro* los efectos citopáticos en células linfoblastoides humanas infectadas con VIH-1 ( $EC_{50}$ = 1-10  $\mu$ g/ml), pero no presentaron indicios de que disminuyeran los índices de replicación viral, estimada por la producción de TR, p24 y formación de sincicio; la citotoxicidad de tales compuestos con células no infectadas, se manifestó a concentraciones mayores a 50  $\mu$ g/ml (Gustafson K. R., *et al.*, 1992). La guttiferona F y la vismiafenona D (Figura 19) presentaron propiedades similares a las ya descritas para las guttiferonas A-D, esto es, tampoco alcanzaron el 100% de citoprotección (Fuller R. W., *et al.*, 1999a; 1999b). Del mismo modo, recientemente, se reportó que una digeranilbenzofenona, la garciosafenona A aislada de *Garcinia speciosa* mostró actividad inhibitoria sobre TR VIH-1 ( $IC_{50}$ = 23.9  $\mu$ g/ml) pero fue tóxica en los ensayos de formación de sincicio (Rukachaisirikul V., *et al.*, 2003). En términos generales, se considera a las benzofenonas anti VIH, como compuestos tóxicos. Esta característica ha limitado también, estudios posteriores acerca de su mecanismos de acción que por el momento, se desconocen (Gustafson K. R., *et al.*, 1992; Fuller R. W., *et al.*, 1999a; 1999b).



Vismiafenona D

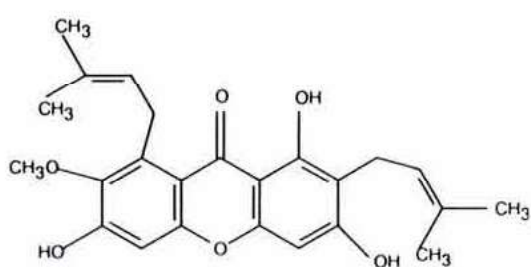


Guttiferona A

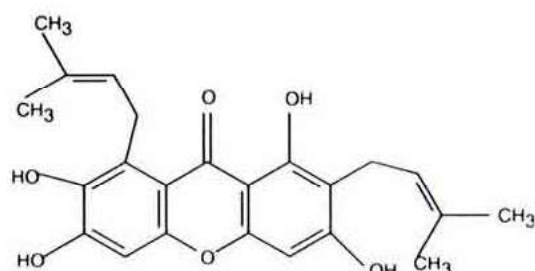
**Figura 19.** Benzofenonas preniladas con propiedades anti VIH.

(Gustafson K. R., *et al.*, 1992. Fuller R. W., *et al.*, 1999a; 1999b).

En cuanto a las xantonas, comúnmente se encuentran en la madera de Clusiaceae y especies de familias relacionadas taxonómicamente. La mangostina y la  $\gamma$ -mangostina (Figura 20), aisladas de *Garcinia mangostana* inhiben de manera no competitiva la actividad de la PR del VIH-1 (Chen S. X., Wan M., Loh B. N., 1996).



Mangostina



$\gamma$ -Mangostina

**Figura 20.** Xantonas aisladas de *Garcinia mangostana* colectada en Singapur y que presentan potente actividad inhibitoria sobre PR VIH-1.

(Chen S. X., Wan M., Loh B. N., 1996).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La epidemia de SIDA en nuestro país, hasta el primer trimestre del año 2004, ha reportado de manera acumulada 71,526 casos, ubicando a México en el lugar número 13 en cuanto a casos totales notificados mundialmente y en el tercer lugar en el continente americano, después de Estados Unidos y Brasil. Se estima que aproximadamente 150,000 personas están infectadas, con un incremento diario de 11 casos. El SIDA ocupa el lugar 16 como causa de muerte en nuestro país, pero constituye la cuarta causa de muerte en hombres y la séptima entre las mujeres de la población de 25 a 34 años de edad (Secretaría de Salud, México, 2004). El SIDA en México se ha definido como un problema de seguridad nacional, por lo cual es de suma importancia llevar a cabo investigaciones que puedan aportar nuevas sustancias inhibidoras de VIH con toxicidad diferente que pudieran ofrecer alternativas en la terapia contra el VIH/SIDA.

En vista de que las clasificaciones taxonómicas involucran las relaciones filogenéticas entre las especies de una familia, es de esperarse que los metabolitos secundarios que son producidos al interior de una familia y de un género, presenten similitudes estructurales y biológicas. Dados los antecedentes de la presencia de compuestos con actividad anti VIH, en especial contra TR, dentro de la familia Clusiaceae, es pertinente analizar si en las especies distribuidas en México existen este tipo de compuestos.

Con base en lo anterior, en este trabajo se planteó realizar un estudio bioprospectivo dirigido por un sondeo de las especies de la familia Clusiaceae presentes en México con la finalidad de evaluar sus propiedades inhibitorias sobre el VIH-1 y en particular sobre la enzima TR, determinar su efecto tóxico sobre linfocitos humanos y las propiedades inhibitorias sobre la replicación viral. Finalmente se propuso el aislamiento e identificación de los constituyentes activos.



## IV. HIPÓTESIS

Especies relacionadas taxonómicamente poseen compuestos químicos semejantes. Por tal motivo existe la posibilidad de que algunas de las especies de Clusiaceae mexicanas, presenten compuestos con actividad inhibitoria contra el VIH-1, y en particular sobre la TR.

## V. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Identificar las especies de la familia Clusiaceae distribuidas en México que presentan propiedades inhibitorias sobre el VIH-1 *in vitro* y en particular sobre la enzima TR, así como aislar y determinar las estructuras moleculares de los compuestos activos.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una revisión del número de especies de la familia Clusiaceae presentes en México.
- Evaluar *in vitro* las posibles propiedades inhibitorias de los extractos crudos de las hojas y otros órganos de las especies de Clusiaceae mexicanas sobre la TR del VIH-1.
- Realizar el estudio químico de los extractos de las especies con alta actividad inhibitoria sobre la TR del VIH-1.

- Evaluar el efecto tóxico de los extractos crudos y fracciones de especies de Clusiaceae mexicanas sobre líneas celulares linfocíticas.
- Evaluar en cultivos celulares, la capacidad de inhibición de la replicación viral de los extractos crudos y fracciones seleccionados.
- Elucidar las estructuras químicas de los compuestos puros activos.
- Evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de los compuestos puros aislados de las especies estudiadas sobre la enzima viral TR del VIH-1.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia general en este proyecto se inició con la realización de una revisión botánica de las especies de la familia Clusiaceae que crecen en México, seguida por estudios de actividad biológica donde se evaluaron las posibles propiedades inhibitorias de los extractos sobre TR VIH-1, VIH-1 y toxicidad. Posteriormente se llevó a cabo un estudio químico que constó de una parte cromatográfica para el aislamiento de los compuestos activos, así como una parte de espectroscopía que fue útil en la identificación de los compuestos químicos aislados (Figura 21).

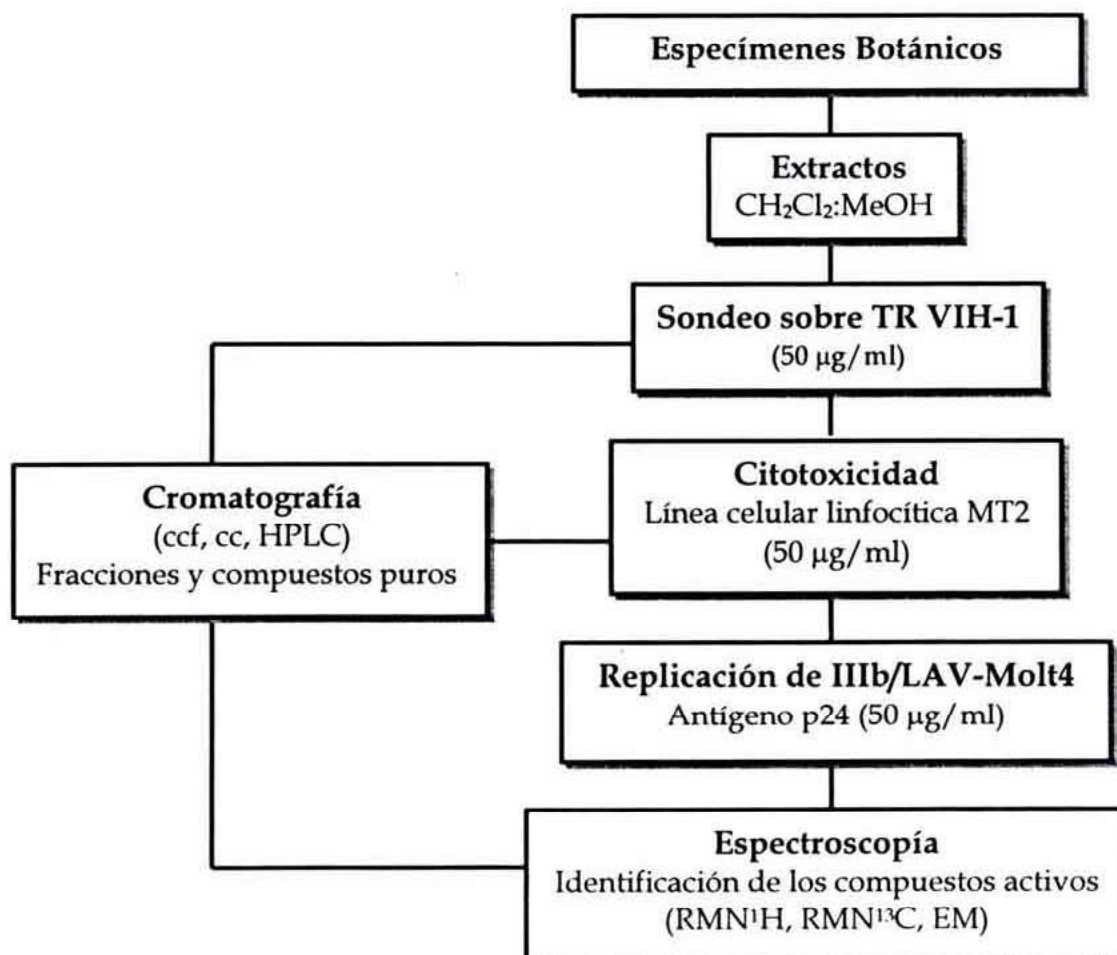


Figura 21. Estrategia general.



# 1. ESTUDIO BOTÁNICO

## 1.1 Obtención de los Especímenes Botánicos

Para la obtención del material biológico (hojas y otros órganos) de las 21 especies de Clusiaceae que crecen en México, se realizaron colectas directas en el campo y se recibieron donativos, tanto de herbarios como de colectores individuales. Las colectas se realizaron en los estados de Veracruz, Guerrero y Oaxaca. Los ejemplares de respaldo fueron depositados en los siguientes herbarios: Herbario Medicinal del IMSS (IMSSM), Herbario Nacional (MEXU) y Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME). La identificación taxonómica de las especies fue confirmada por el Biól. Lucio Lozada, taxónomo del Laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

A pesar de que *Marila laxiflora* es una especie que crece en nuestro país, su colecta no fue posible y los ensayos de actividad biológica fueron realizados con hojas de un ejemplar colectado en Perú y que fue donado por el Dr. Francisco Lorea, curador del Herbario del Instituto de Ecología A. C. (XAL) de Xalapa, Veracruz.

El material vegetal, especialmente las hojas, fue secado, triturado y se extrajo a temperatura ambiente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (1:1). El disolvente fue concentrado *in vacuo*. Para *Calophyllum brasiliense*, también se prepararon extractos con hexano, acetona y metanol. En el caso de los frutos, se realizó una extracción inicial con hexano y se continuó con los otros disolventes mencionados.

## 2. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 2.1 Evaluación de las Propiedades Anti VIH

Las actividades anti VIH de los extractos de las especies de Clusiaceae colectadas fueron evaluadas mediante tres ensayos sucesivos. En primer término, se evaluó la inhibición sobre la enzima TR VIH-1 y aquellos extractos que presentaron un alto porcentaje inhibitorio ( $\geq 70\%$ ) fueron seleccionados para el próximo bioensayo. Como segunda evaluación, se realizaron ensayos de citotoxicidad de los extractos en linfocitos humanos. Los extractos no tóxicos fueron seleccionados para el tercer y último tamizaje que consistió en la determinación de la inhibición de la replicación de VIH-1. Las curvas dosis-respuesta de los extractos más activos se realizaron en los tres ensayos de actividad biológica. Nevirapina, un ITRNN fue usado como control positivo. Una vez que los extractos más activos fueron seleccionados, se procedió a realizar un fraccionamiento biodirigido donde las fracciones resultantes también fueron tamizadas en los tres bioensayos y se continuó el fraccionamiento hasta la obtención de los compuestos puros, que también fueron evaluados respecto de sus propiedades anti VIH. A continuación se describen brevemente cada uno de los ensayos de actividad biológica. Para mayores detalles de los protocolos consultar el Apéndice I.

#### 2.1.1 Efecto Inhibitorio sobre TR VIH-1

La determinación de la actividad inhibitoria sobre la enzima TR VIH-1 de los extractos, fracciones y compuestos puros de Clusiaceae mexicanas se llevó a cabo mediante un ensayo inmunológico, no radioactivo y colorimétrico denominado Lenti RT (Cavidi Tech) (Shao X., *et al.*, 1997) (Figura 21). Dicho ensayo consiste en determinar la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdUtp) a un molde de poliadenina (PoliA) cuya reacción es catalizada por la



adición de una transcriptasa reversa recombinante de VIH-1, así como una secuencia iniciadora (*primer*). La bromodesoxiuridina unida al molde es reconocida por un anticuerpo monoclonal conjugado a fosfatasa alcalina. La adición del *para*-nitrofenilfosfato ocasiona que la fosfatasa realice su actividad hidrolítica obteniendo un cromóforo que absorbe a 405 nm. Los extractos y fracciones fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y probados a 50 µg/ml. Los compuestos puros fueron probados a 1mM.

### **2.1.2 Efecto Tóxico sobre Linfocitos Humanos**

El efecto citotóxico de los extractos y fracciones seleccionados con actividad sobre TR VIH-1, fue determinado sobre la línea celular linfocítica MT2 (Figura 21). El ensayo consistió en cultivar células MT2 no infectadas, agregando la sustancia a probar para determinar el efecto tóxico de éstas. Posteriormente, se cuantificó muerte celular mediante el conteo directo con un colorante vital (azul de tripano) y comparando con testigos libres de la sustancia. Los extractos y fracciones fueron disueltos en DMSO y probados a 50 µg/ml.

### **2.1.3 Efecto sobre la Inhibición de la Replicación de VIH-1 en Linfocitos Humanos**

La inhibición de la replicación viral de los extractos y fracciones fue determinada mediante un cocultivo de la línea celular linfocítica MT4 infectada con la cepa viral IIIb/LAV y células MT2 no infectadas en presencia de la sustancia a probar (Figura 21). Esta inhibición fue medida mediante la cuantificación del antígeno p24 en el sobrenadante del cultivo, utilizando un inmunoensayo denominado Genetic Systems HIV-1 Ag EIA (Bio-Rad). Dicho ensayo consiste en detectar la presencia de la proteína viral p24 mediante



anticuerpos monoclonales adheridos a los pozos de las placas, a los que se agrega un segundo anticuerpo monoclonal anti<sup>p24</sup> que tiene biotina conjugada. La reacción se completa con un segundo conjugado, avidina-peroxidasa y finalmente se agrega el sustrato de la enzima (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el cromógeno tetrametilbencideno. El producto de la reacción absorbe a 450 nm. Los extractos y fracciones fueron disueltos en DMSO y probados a 50 µg/ml.

### 3. ESTUDIO QUÍMICO

Una vez que los extractos hexánico, acetónico y metanólico de *Calophyllum brasiliense* fueron seleccionados mediante los ensayos de actividad biológica, se inició un fraccionamiento biodirigido de los mismos. Estos extractos fueron preparados con 945.5 g (peso seco) de hojas de *Calophyllum brasiliense*.

#### 3.1 Cromatografía e Instrumentación

Los extractos se separaron en sus diferentes componentes utilizando Cromatografía en Capa Fina (CCF), Cromatografía en Columna (CC) y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) (Figura 21). Para CCF se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel de 0.20 mm de espesor (Machery-Nagel) en el caso de fase normal; en el caso de fase reversa se emplearon cromatoplasmas de sílica gel C-18 de 0.15 mm de espesor (Machery-Nagel). En la separación por CC se utilizaron sílica gel (70-230) para fase normal y sílica gel YMC-gel (C-18) para fase reversa, así como Diaion (HP20); como eluyentes se emplearon diferentes disolventes orgánicos. Para la remoción de los taninos se empleó poliamida (C-200) (Wako). En el caso de HPLC, se utilizó una columna fase normal (Shiseido Sílica Gel AG 80 Å, 5µm, tamaño 10 mm d.i. x 250 mm). La pureza de los compuestos fue observada

por CCF. Como reveladores se emplearon  $\text{Ce}(\text{SO})_4$  al 1% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10%.

Los compuestos puros aislados fueron analizados mediante técnicas espectroscópicas de 1 dimensión: Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $\text{RMN}^1\text{H}$ ), Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 ( $\text{RMN}^{13}\text{C}$ ) y Acrecentamiento sin Distorsión por Transferencia de Polarización (DEPT); estos experimentos se realizaron en un espectrómetro JEOL JNM A-500 (500 MHz) para  $\text{RMN}^1\text{H}$  y 125 MHz en el caso de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ . También se llevaron a cabo experimentos de 2 dimensiones tanto homonucleares: Espectroscopía de Correlación Homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  bidimensional (COSY), como heteronucleares: Espectroscopía de Correlación Heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  bidimensional (HMQC) y Espectroscopía de Correlación Heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  bidimensional a larga distancia (HMBC). Adicionalmente se obtuvieron espectros de Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico (EM-IE) (espectrómetro Hewlett-Packard 5985-B) y Espectrometría de Masas mediante Bombardeo Rápido de Átomos de Alta Resolución (EM-HR-FAB) (espectrómetro JEOL HX-110). Finalmente, los puntos de fusión (p. f.) se determinaron en un aparato Fisher Johns y los valores de rotación óptica ( $[\alpha]$ ), se obtuvieron en un polarímetro JASCO DIP 360. Todos los datos obtenidos mediante este análisis, fueron comparados con la bibliografía correspondiente y en el caso, con estándares de laboratorio.

### 3.2 Extracto Hexánico de *Calophyllum brasiliense*

El extracto fue concentrado en rotavapor (32 g). Durante la evaporación del disolvente dos triterpenos, friedelina (**1**, 1.82 g) y canofilol (**2**, 1.64 g) precipitaron espontáneamente. Parte del extracto (16 g) fue fraccionado mediante cromatografía en columna (CC) fase normal eluída con hexano-acetato de etilo (1:0 a 0:1). Un total de 270 fracciones fueron colectadas y monitoreadas por

CCF. Las fracciones similares fueron combinadas para dar un total de 27 fracciones, las cuales fueron evaluadas respecto de sus propiedades inhibitorias sobre TR VIH-1. Las fracciones activas 51-73 y 74-85 fueron obtenidas en la elusión hexano-acetato de etilo (9:1). Ambas fracciones fueron monitoreadas en CCF fase reversa eluída con acetona-agua (8:2) donde se detectaron 2 manchas principales, una amarilla y una azul. La fracción 51-73 fue separada en sus componentes mediante CC fase reversa eluída con acetona-agua (75:25 a 1:0). El ácido apetalico (**3**, 520 mg) fue obtenido en las subfracciones 5-6 eluídas con acetona-agua (7:3 a 1:0). Este compuesto correspondió a la mancha amarilla. Las subfracciones restantes 7-8 fueron fraccionadas nuevamente mediante CC fase reversa eluída con acetonitrilo-agua (9:1 a 1:0). La purificación final fue llevada a cabo mediante HPLC usando una columna fase normal y eluyendo con una solución de hexano-acetato de etilo 1:1 (flujo 3 ml/min), de donde se obtuvieron sucesivamente soulatrolido (**9**, 10 mg), (-)-calanolido B (**7**, 90 mg), (+)-calanolido C (**8**, 30 mg) y (-)-calanolido A (**6**, 10 mg). Estos compuestos correspondieron a la mancha azul. La otra fracción activa, 74-85 fue separada en sus componentes mediante CC fase reversa usando acetona-agua (75:25 a 1:0). Las subfracciones 4-9 obtenidas eluyendo con acetona-agua (7:3) fueron combinadas y separadas mediante CC fase reversa eluída con metanol-agua, acidificada con ácido acético 1% (8:2), de donde se obtuvieron el isómero estructural del ácido isoapetalico (**5**, 20 mg) y el ácido isoapetalico (**4**, 20 mg). También en esta fracción se detectó una mancha azul mediante CCF fase reversa, que al ser sometida a separación por HPLC con las condiciones antes descritas, se separó, dando trazas de los compuestos **6**, **7** y **8**.

### 3.3 Extracto Acetónico de *C. brasiliense*

Después de concentrar el extracto (46 g), parte de él (19 g) fue fraccionado mediante cromatografía en columna (CC) fase normal eluída con



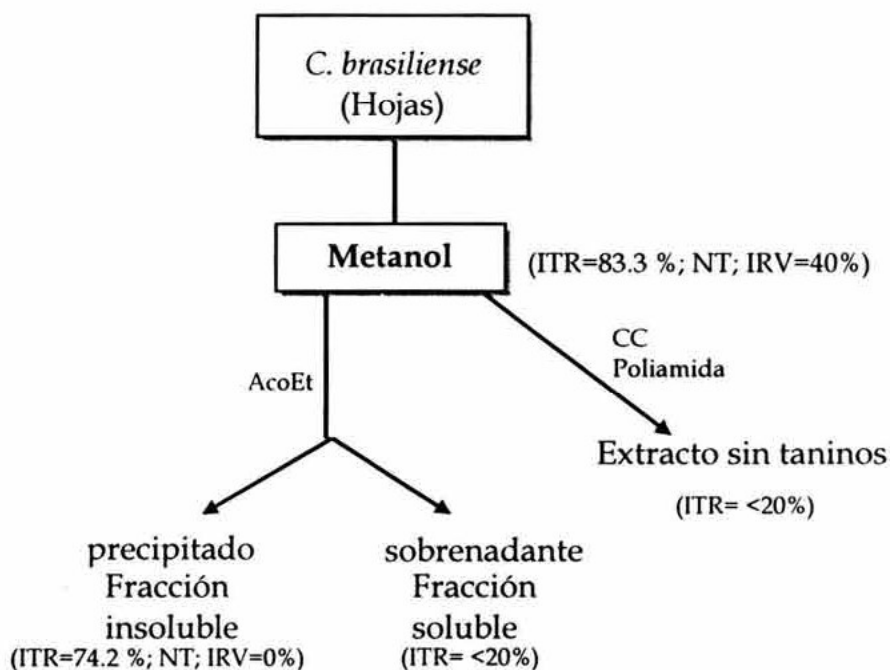
hexano-acetato de etilo (1:0 a 0:1). Un total de 320 fracciones fueron colectadas y analizadas por CCF. Las fracciones similares fueron combinadas para dar un total de 27 fracciones, las cuales fueron evaluadas respecto de sus propiedades inhibitorias sobre TR VIH-1. Únicamente la fracción 136-143 resultó activa y fue obtenida en la elusión hexano-acetato de etilo (7:3). Esta fracción fue monitoreada en CCF fase reversa y se sometió a CC fase reversa eluyendo con acetona-agua (75:25 a 1:0). Sin embargo no se logró la purificación de los compuestos, por lo cual se decidió plantear una nueva estrategia.

Parte del extracto acetónico (5 g) fue separado en sus componentes mediante CC utilizando Diaion (HP20) y eluyendo sucesivamente con metanol-agua 6:4 (fracción 1), metanol (fracción 2) y acetato de etilo (fracción 3). Las fracciones 1 y 3 fueron inactivas. De la fracción 2 (245 mg), precipitó espontáneamente el compuesto Amentoflavona (10, 30 mg) y el resto de la fracción inhibió la TR VIH-1. El análisis de este material por CCF fase reversa mostró la presencia de calanólidos ( $R_f=0.42$ ; eluida con acetona-agua (8:2); mancha azul; revelada con  $Ce(SO_4)_4$  al 1% en  $H_2SO_4$  2N, teniendo como referencia (-)-Calanólido B).

### **3.4 Extracto Metanólico de *C. brasiliense***

Parte del extracto (500 mg) se hizo pasar a través de una columna de poliamida (C-200) con la finalidad de retirar los posibles taninos (polifenoles) del eluato. La columna fue primero empapada con agua y se dejó toda la noche. La elusión comenzó al día siguiente primero con agua, seguida de metanol al 50% y finalmente con metanol. Los eluatos fueron colectados, combinados y evaporados a sequedad de acuerdo con Tan G. T., Pezzuto J. M. y Kinghorn A. D., 1991.

La otra parte del extracto metanólico fue macerado con acetato de etilo de donde se obtuvo una fracción soluble y otra insoluble (Figura 22). Esta última fue positiva en las pruebas de detección de taninos: gelatina 1%, gelatina + NaCl 1% y FeCl<sub>3</sub> 3%+ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30%.

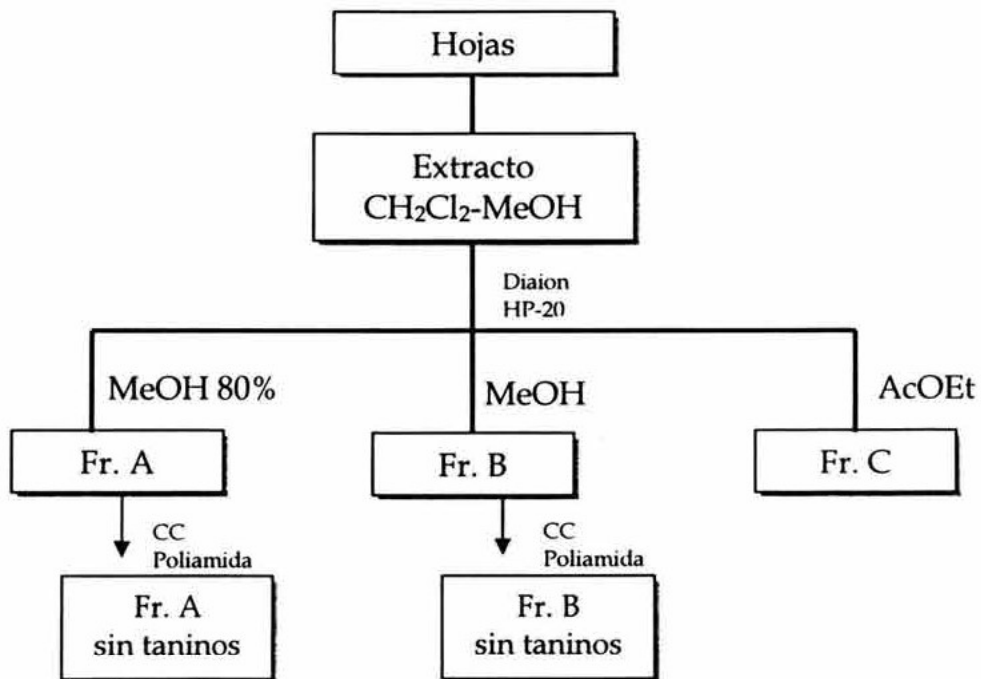


**Figura 22.** Fraccionamiento bioridigido del extracto metanólico de *C. brasiliense*.  
ITR= Inhibición de TR (%); NT= No Tóxico a MT2; IRV= Inhibición de la Replicación Viral (%).

### 3.5 Extractos de *Vismia mexicana* y *Clusia quadrangula*

Después de *C. brasiliense*, los extractos de *Vismia mexicana* y *Clusia quadrangula* mostraron la segunda mejor actividad anti VIH en los ensayos

realizados. El fraccionamiento de los extractos de estas especies se realizó mediante el siguiente procedimiento: una vez que se obtuvo el extracto único  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:MeOH}$ , se realizó una CC con Diaion (HP-20) de donde se obtuvieron 3 fracciones. La fracción A fue eluída con metanol 80%, la fracción B con metanol absoluto y la fracción C con acetato de etilo. Las fracciones A y B a su vez fueron sometidas a CC de poliamida (C-200) con la finalidad de retirar los posibles taninos (Figura 23). Esta columna se eluyó de la misma manera que la descrita para el extracto metanólico de *Calophyllum brasiliense*.



**Figura 23.** Fraccionamiento biodirigido de los extractos de *Clusia quadrangula* y *Vismia mexicana*.



## VII. RESULTADOS

### 1. ESTUDIO BOTÁNICO

#### 1.1 Obtención de los Especímenes Botánicos

La revisión taxonómica llevada a cabo, mostró la presencia de 8 géneros y 21 especies de Clusiaceae que crecen en México. Los datos de colecta de estas especies, así como los herbarios donde se depositaron los ejemplares aparecen la Tabla 5.

Dicha revisión, permitió también esbozar la distribución de estas especies, que se localizan principalmente en los estados de Chiapas, Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Tabasco y Veracruz. En la figura 24, se observan las especies que se trataron con mayor profundidad en el estudio químico.



**Figura 24.** Mapa de la República Mexicana que muestra los lugares de colecta de algunas especies de Clusiaceae.

Modificado de Missouri Botanical Garden ([www.mobot.org](http://www.mobot.org)).

**Tabla 5.** Sondeo de actividad inhibitoria sobre TR VIH-1 de los extractos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (50 µg/ml) de las Clusiaceae mexicanas.

Especies	Colector	Estado	Herbario	Parte usada	% inhibición de TR VIH-1
<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.	R. Reyes-Chilpa s/n 10 de septiembre de 1999	Veracruz (Los Tuxtlas)	IMSSM	hoja	70.3±3.1 77.9±0.5 <sup>a)</sup> 81.3±1.9 <sup>b)</sup> 83.3±1.0 <sup>c)</sup>
<i>Chrysochlamys guatemaltecana</i> Donn. Sm.	T. Went <i>et al.</i> 2642	Veracruz	MEXU	fruto hoja	69.9±2.4 60.4±1.0
<i>Chrysochlamys nicaraguensis</i> (Oerst., Planch. & Triana) Hemsl.	B. Ortiz y Martiniano 170	Veracruz	FCME	hoja flor	58.7±0.5 31.0±2.0
<i>Clusia flava</i> Jacq.	R. Reyes-Chilpa s/n	Veracruz	IMSSM	hoja	1.0±0.4
<i>Clusia guatemalensis</i> Hemsl.	A. Méndez 9593	Chiapas	MEXU	hoja	70.8±1.2
<i>Clusia lundellii</i> Standl.	L. Lozada 2424	Oaxaca	IMSSM	hoja cáscara fruto semilla tallos	48.0±1.5 59.4±1.6 50.0±1.0 27.8±3.4
<i>Clusia massoniana</i> Lundell	E. Ramírez 414	Oaxaca	FCME	hoja flor	72.9±1.4 53.6±2.4
<i>Clusia minor</i> L.	T.P. Ramamoorthy 2395	Oaxaca	FCME	hoja	56.1±1.1
<i>Clusia pringlei</i> Lundell	J. Panero 3923	Guerrero	MEXU	hoja	37.6±0.6
<i>Clusia quadrangula</i> Bartlett	L. Lozada 2428	Oaxaca	IMSSM	hoja cáscara fruto semilla tallos	65.6±1.2 51.9±1.2 56.6±0.6 59.7±1.9
<i>Clusia rosea</i> Jacq.	C. Beutelspacher 15 de marzo de 1969	Veracruz	MEXU	hoja	16.9±2.0
<i>Clusia salvinii</i> Donn. Sm.	L. Lozada 2427	Oaxaca	IMSSM	hoja cáscara fruto semilla tallos	43.6±1.5 53.2±1.6 47.3±1.9 52.4±2.4
<i>Clusia tetra-trianthera</i> Maguire	D. E. Breedlove 28177	Chiapas	MEXU	hoja	39.6±2.0
<i>Garcinia intermedia</i> (Pittier) Hammel	C. Gallardo 326	Guerrero	FCME	hoja	55.1±3.3
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	T. Wendt <i>et al.</i> 3304	Oaxaca	MEXU	hoja	22.2±6.7
<i>Mammea americana</i> L.	R. Reyes-Chilpa 27 de febrero de 1999	Veracruz	IMSSM	hoja	11.2±3.8
<i>Marila laxiflora</i> Rusby	J. Schunke 6389	Perú	XAL	hoja flor	64.7±1.3 64.1±1.6
<i>Symphonia globulifera</i> L. f.	M. A. Magaña and S. Zamudio 266	Tabasco	FCME	hoja	17.1±4.2
<i>Vismia baccifera</i> (L.) Triana & Planch.	L. Lozada 2435	Oaxaca	IMSSM	hoja tallos	57.8±1.9 62.4±0.2
<i>Vismia camparaguey</i> Sprague & Riley	A. Campos 2573	Oaxaca	MEXU	hoja	70.8±1.5
<i>Vismia mexicana</i> Schltld.	E. Martinez 18999	Chiapas	FCME	hoja flor	72.9±1.1 56.8±2.8

<sup>a)</sup> extracto hexánico; <sup>b)</sup> extracto acetónico; <sup>c)</sup> extracto metanólico. Los valores son las medias de ±D. E., n=3

## 2. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 2.1 Sondeo de Propiedades Anti VIH de los Extractos de Clusiaceae Mexicanas

Los extractos de las hojas de las 21 especies de Clusiaceae fueron evaluadas sobre TR VIH-1 (Figura 25). Cinco especies (23.8%) mostraron una alta actividad inhibitoria sobre TR VIH-1 ( $\geq 70\%$ ), mientras que 7 especies (33.3%) fueron moderadamente activas (50 al 70%) y 9 especies mostraron menos del 50% de inhibición (Figura 25). Los 3 extractos más activos correspondieron a la misma especie, *Calophyllum brasiliense*: hexánico (77.9%), acetónico (81.3%) y metanólico (83.3%). Estos extractos fueron seguidos por los extractos de *Clusia massoniana* y *Vismia mexicana*, que presentaron 72.9% de inhibición sobre la enzima, mientras que *Clusia guatemalensis* y *Vismia camparaguey* la inhibieron en 70.8%.

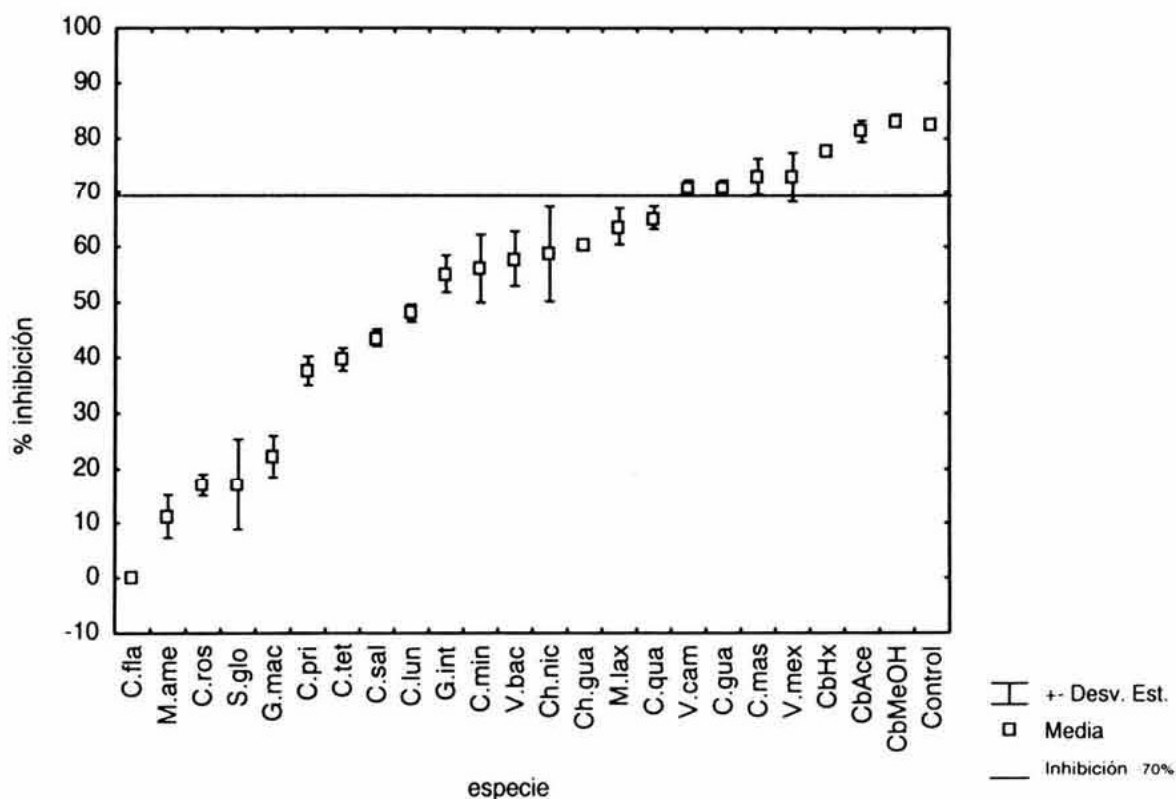


Figura 25. Inhibición sobre TR VIH-1 de los extractos de hojas de Clusiaceae mexicanas.



Los efectos de los extractos de otros órganos vegetales sobre TR VIH-1, también se muestran en la Tabla 5. En este caso la actividad máxima correspondió al fruto de *Calophyllum brasiliense* (69.9%), seguido por el extracto de flor de *Marila laxiflora* (64.1%). Sin embargo la carencia de material vegetal suficiente para la extracción, limitó estudios posteriores.

Las fracciones eluidas con MeOH 80%, MeOH y AcOEt de los extractos de *Vismia mexicana* y *Clusia quadrangula* fueron evaluadas en el ensayo de TR VIH-1. Las fracciones de MeOH 80% y MeOH de ambas especies presentaron un alto porcentaje inhibitorio ( $\geq 70\%$ ) sobre TR VIH-1: 70.9 y 70.7% respectivamente, para *Vismia mexicana* y 84.3 y 72.6% respectivamente, para *Clusia quadrangula*. Estas fracciones fueron eluidas a través de una columna de poliamida y los extractos obtenidos libres de taninos, fueron nuevamente evaluados en este ensayo. Sin embargo, las cuatro fracciones mostraron una baja inhibición sobre TR VIH-1 ( $< 25\%$ ), indicando que se trataba de taninos y compuestos polifenólicos, por lo cual no se realizaron estudios posteriores de toxicidad e inhibición de la replicación viral.

## **2.2 Sondeo de Propiedades Anti VIH de los Extractos de *C. brasiliense***

Con base en los porcentajes de inhibición obtenidos en este ensayo, los extractos hexánico, acetónico y metanólico de *Calophyllum brasiliense* fueron seleccionados para el fraccionamiento biodirigido.

*Extracto Hexánico.* La mayoría de las fracciones obtenidas del extracto hexánico de *C. brasiliense* mostraron baja inhibición ( $< 40\%$ ) sobre la TR VIH-1. Sólo las fracciones 51-73 y 74-85 exhibieron una alta inhibición sobre la enzima ( $\geq 70\%$ ) (Tabla 6). Ambas fracciones resultaron no tóxicas a linfocitos MT2

(Figura 26A) y adicionalmente inhibieron la replicación viral de IIIb/LAV (Figura 26B), por lo tanto, estas fracciones fueron sometidas nuevamente a cromatografía a fin de obtener los compuestos activos puros.

**Tabla 6.** Evaluación de las propiedades inhibitorias sobre TR VIH-1 de las fracciones de los extractos de hoja de *Calophyllum brasiliense*

Fracción/Extracto	Inhibición de TR VIH-1(%)
<b>Hexano</b>	
1-50	<40
51-73	74.8±3.3
74-85	75.5±3.7
86-270	<40
<b>Acetona</b>	
1	12.7±3.1
2	59.5±3.5
3	28.2±1.7
<b>Metanol</b>	
Fracción insoluble en AcOEt	74.2±1.6
Extracto después de la columna de poliamida	38.6±4.9

Los valores son las medias ±D. E., n=3

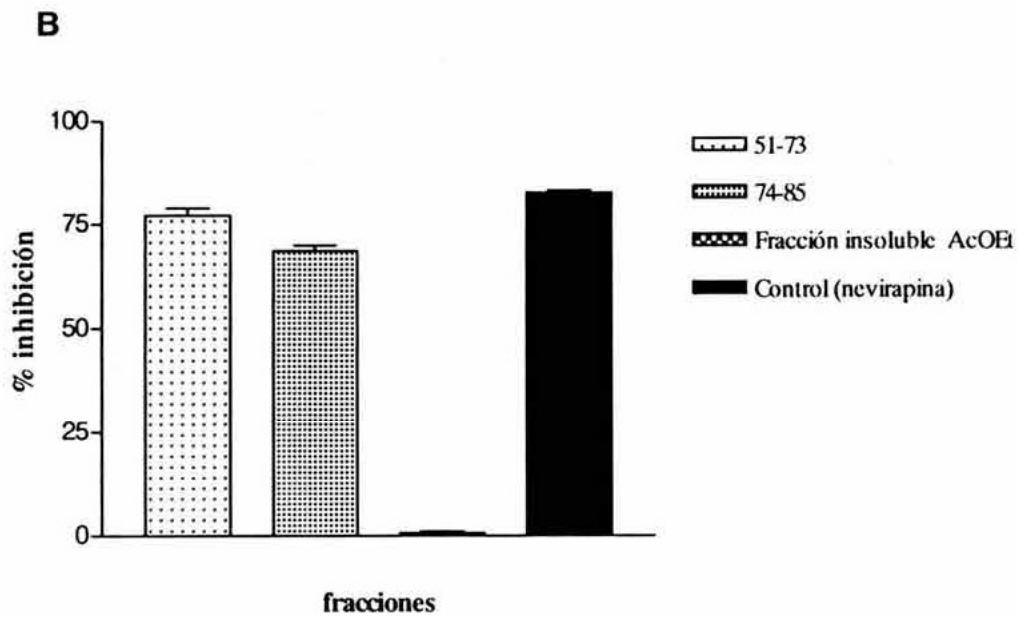
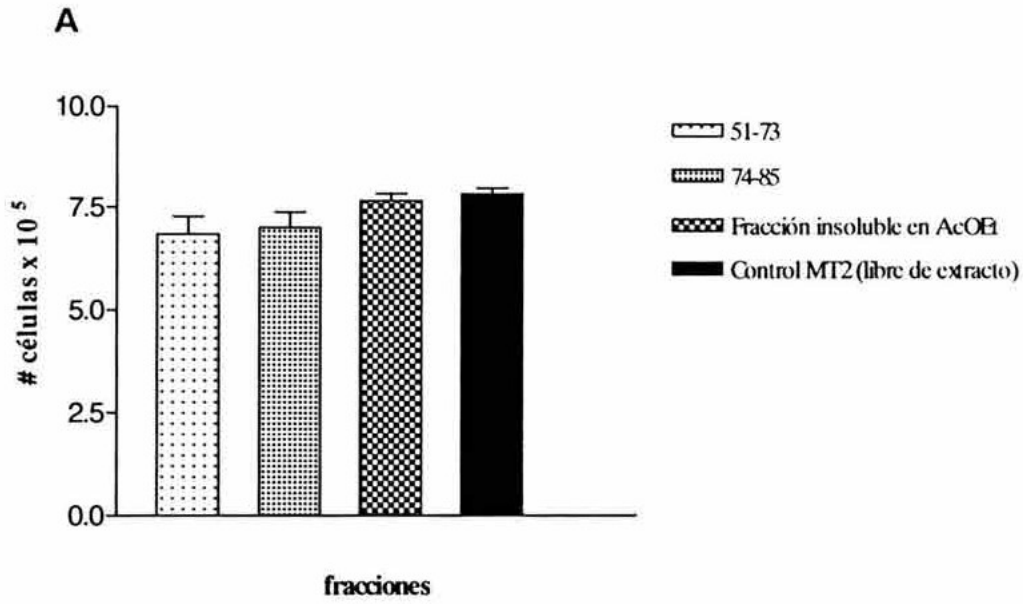
*Extracto Acetónico.* Las fracciones 1, 2 y 3 fueron evaluadas respecto de sus propiedades inhibitorias sobre TR VIH-1, pero únicamente la fracción 2 mostró una actividad moderada (59.5%) (Tabla 6), por lo cual se prosiguió su estudio químico.

*Extracto Metanólico.* El extracto metanólico de *C. brasiliense* mostró la mayor actividad inhibitoria sobre TR VIH-1 (83.3%) del total de 39 extractos evaluados en este trabajo (Tabla 5). Sin embargo, este valor de inhibición disminuyó a 38.6% después de la remoción de taninos (Tabla 6). La fracción insoluble en acetato de etilo del extracto metanólico inhibió la TR VIH-1 y mostró baja citotoxicidad (Figura 26A), sin embargo, no mostró inhibición sobre la replicación viral de IIIb/LAV (Figura 26B).

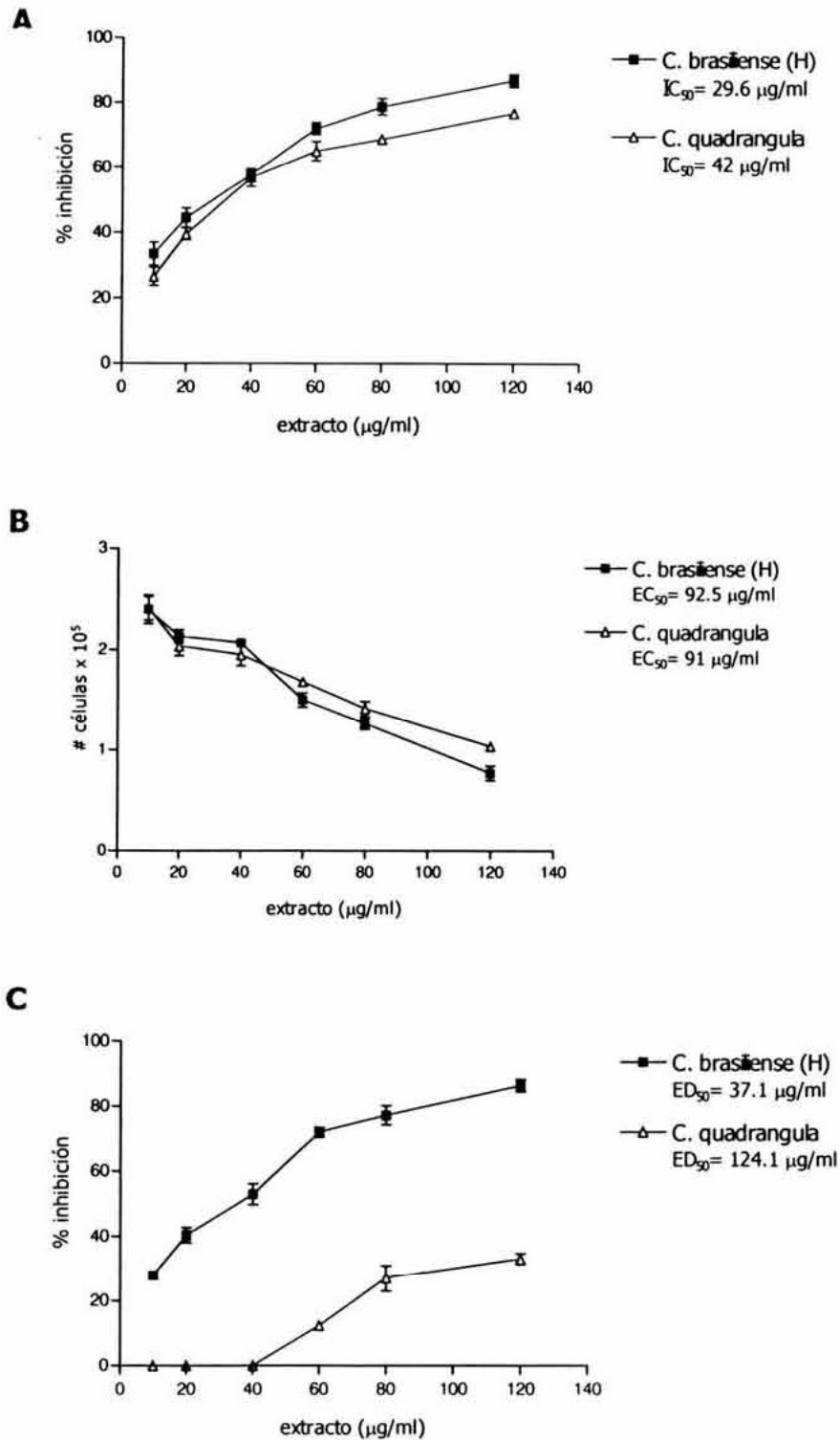
### 2.3 Curva Dosis-Respuesta de los Extractos Activos

Dado que el extracto hexánico de *Calophyllum brasiliense* fue el único que cubrió los requerimientos en los 3 ensayos de actividad biológica, se determinó su efecto en función de la concentración. La concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) fue de 29  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la dosis efectiva 50 ( $ED_{50}$ ) determinada para la inhibición de la replicación de IIIb/LAV fue 37.1  $\mu\text{g/ml}$ . La concentración efectiva 50 ( $EC_{50}$ ) sobre linfocitos MT2 fue de 92.5  $\mu\text{g/ml}$ . Para efectos comparativos con este extracto, las curvas dosis-respuesta también fueron realizadas para el extracto de *Clusia quadrangula*. La  $IC_{50}$  (42  $\mu\text{g/ml}$ ) y la  $EC_{50}$  (91  $\mu\text{g/ml}$ ) fueron similares a los del extracto hexánico de *C. brasiliense*, pero el valor calculado para la  $ED_{50}$  fue 3 veces menor ( $ED_{50} = 124 \mu\text{g/ml}$ ) (Figura 27).





**Figura 26.** Efectos tóxico y antiviral de las fracciones activas de los extractos hexánico y metanólico de las hojas de *Calophyllum brasiliense*. A) Viabilidad celular de linfocitos MT2. B) Inhibición de la replicación de IIIb/LAV.



**Figura 27.** Curvas concentración-respuesta de los extractos hexánico de *Calophyllum brasiliense* y *Clusia quadrangula*. A) Actividad inhibitoria sobre TR VIH-1. B) Citotoxicidad a linfocitos MT2. C) Inhibición de la replicación de HIV-1/LAV. Cada punto de las gráficas representa la media de los cuadruplicados.  $\pm$  D. E. de las medias respectivas.

## 2.4 Propiedades Anti VIH de los Compuestos Aislados de *C. brasiliense*

Las fracciones 51-73 y 74-85 provenientes del extracto hexánico de *C. brasiliense* fueron seleccionadas para continuar su estudio químico y la evaluación de las posibles propiedades anti VIH. Los compuestos puros obtenidos de estas fracciones fueron: ácido apetalico (3), ácido isoapetalico (4), isómero estructural del ácido isoapetalico (5), (+)-calanólido A (6), (-)-calanólido B (7), (+)-calanólido C (8) y soulattrólido (9) (Figura 28). Todos ellos fueron evaluados sobre TR VIH-1 pero sólo los compuestos 6, 7 y 9 mostraron una potente actividad inhibitoria (Tabla 7). Los valores de IC<sub>50</sub> fueron calculados para los tres últimos compuestos, siendo estos 0.34, 0.5 y 0.66 µM/ml, respectivamente. El compuesto 8 fue moderadamente activo (50 a 70% de inhibición), mientras que los compuestos 4 y 5 exhibieron una baja inhibición. El compuesto 3 fue inactivo. Los compuestos 1 y 2 fueron aislados también de este extracto, pero ninguno de ellos fue activo contra TR VIH-1.

**Tabla 7.** Evaluación de los compuestos aislados de las hojas de *Calophyllum brasiliense* sobre TR VIH-1.

Compuestos	Inhibición sobre TR VIH-1 (%)
1	20.2±1.6
2	7.6±2.1
3	2.0±0.6
4	20.6±3.2
5	29.7±1.7
6	81.5±0.9
7	76.2±2.2
8	50.7±2.0
9	77.7±1.6
10	17.5±2.4
Control (nevirapina)	82.6±3.1

Los valores representan las medias ±D. E., n=3



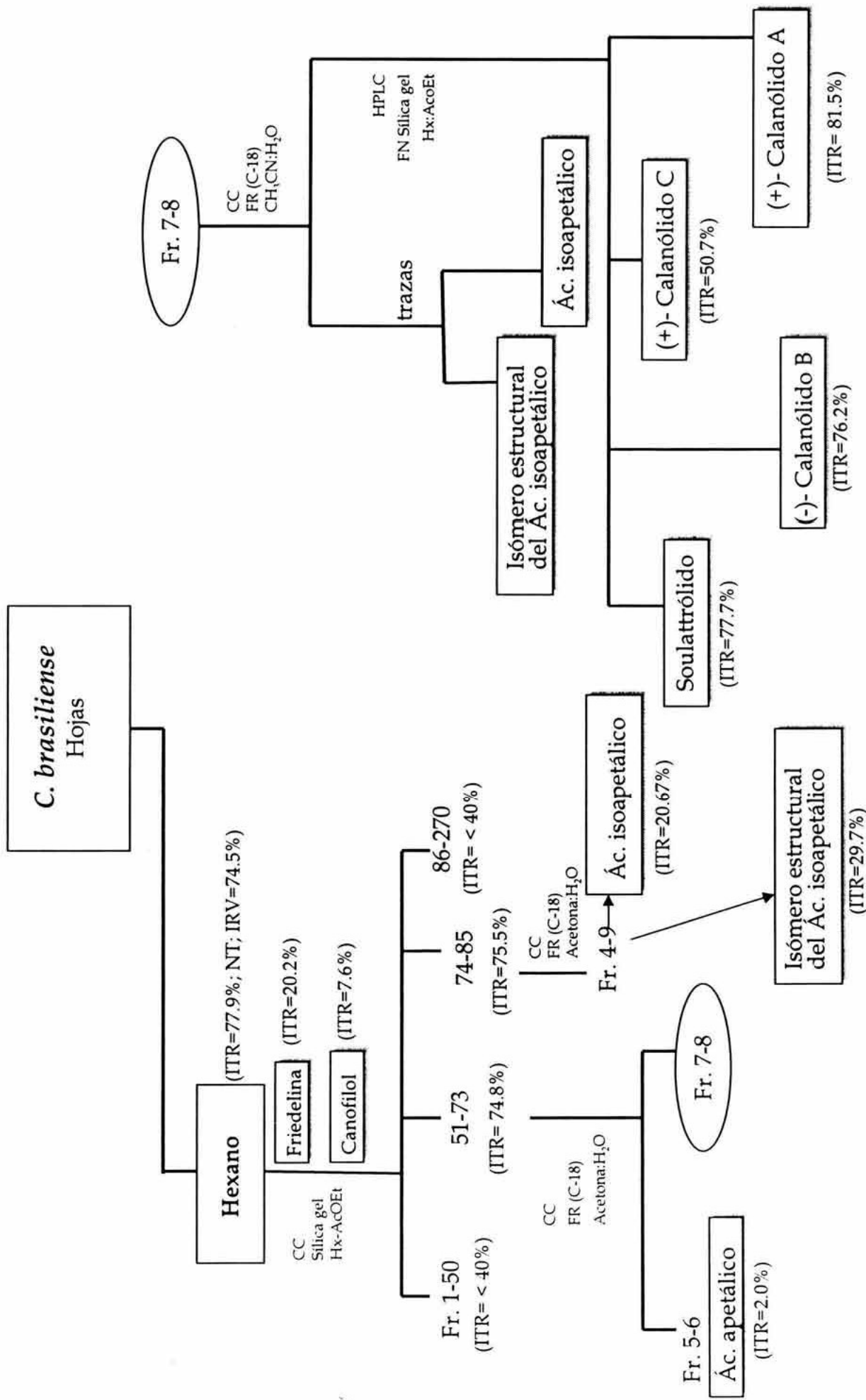
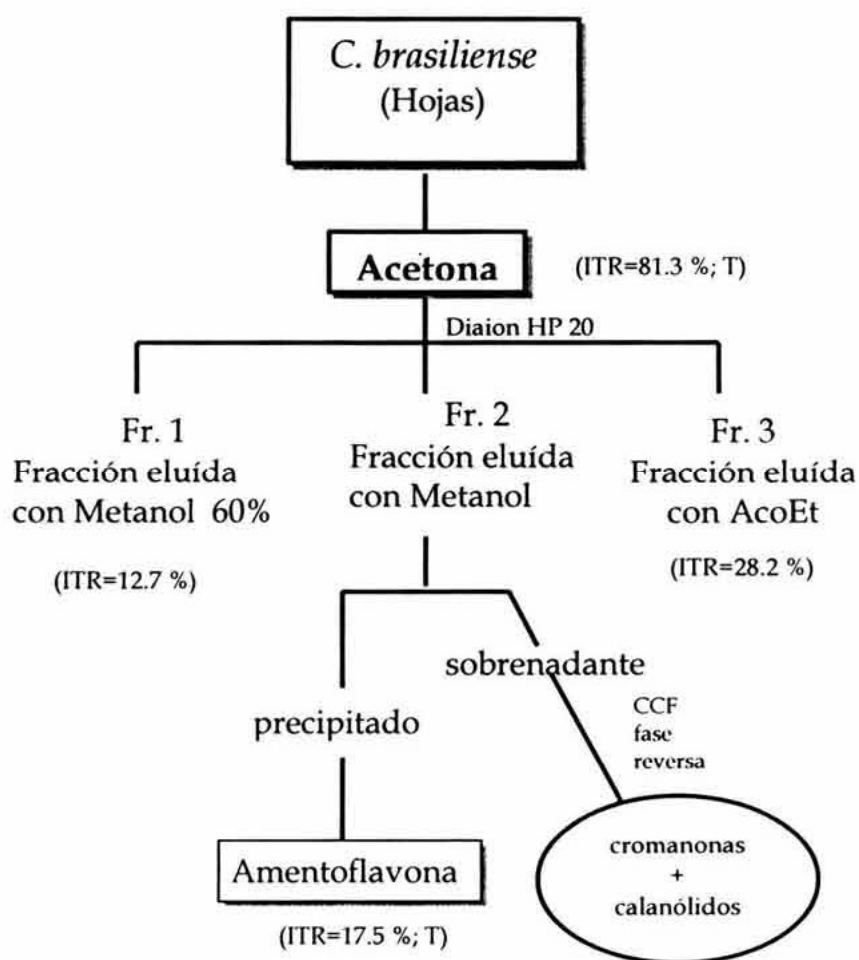


Figura 28. Fraccionamiento biodirigido del extracto hexánico de *C. brasiliense*.  
ITR= Inhibición de TR (%); NT= No Tóxico a MT2; IRV= Inhibición de la  
Replicación Viral (%).

De la fracción 2 del extracto de acetona, se obtuvo un biflavonoide, la amentoflavona (**10**) (Figura 29). Este compuesto fue evaluado en el ensayo de TR-VIH-1 (Tabla 7) y sobre linfocitos MT2; sin embargo, fue tóxico a éstos y no mostró actividad inhibitoria sobre TR VIH-1. El resto de la fracción, fue analizada por CCF, detectando la presencia de calanólidos, lo cual explica su actividad inhibitoria sobre TR VIH-1.



**Figura 29.** Fraccionamiento biodirigido del extracto acetónico de *C. brasiliense*. ITR= Inhibición de TR (%); T= Tóxico a MT2.

### 3. ESTUDIO QUÍMICO

#### 3.1 Composición Química de las Fracciones Activas de *C. brasiliense*

Como resultado del fraccionamiento biodirigido anti VIH, se aislaron e identificaron 10 compuestos químicos de las hojas de *Calophyllum brasiliense*, de los cuales las cromanonas, ácido apetélico (3), ácido isoapetélico (4) y el isómero estructural del ácido isoapetélico (5), así como los triterpenos, friedelina (1) y canofilol (2) y un biflavonoide, amentoflavona (10), fueron inactivos contra TR VIH-1 (Figura 30).

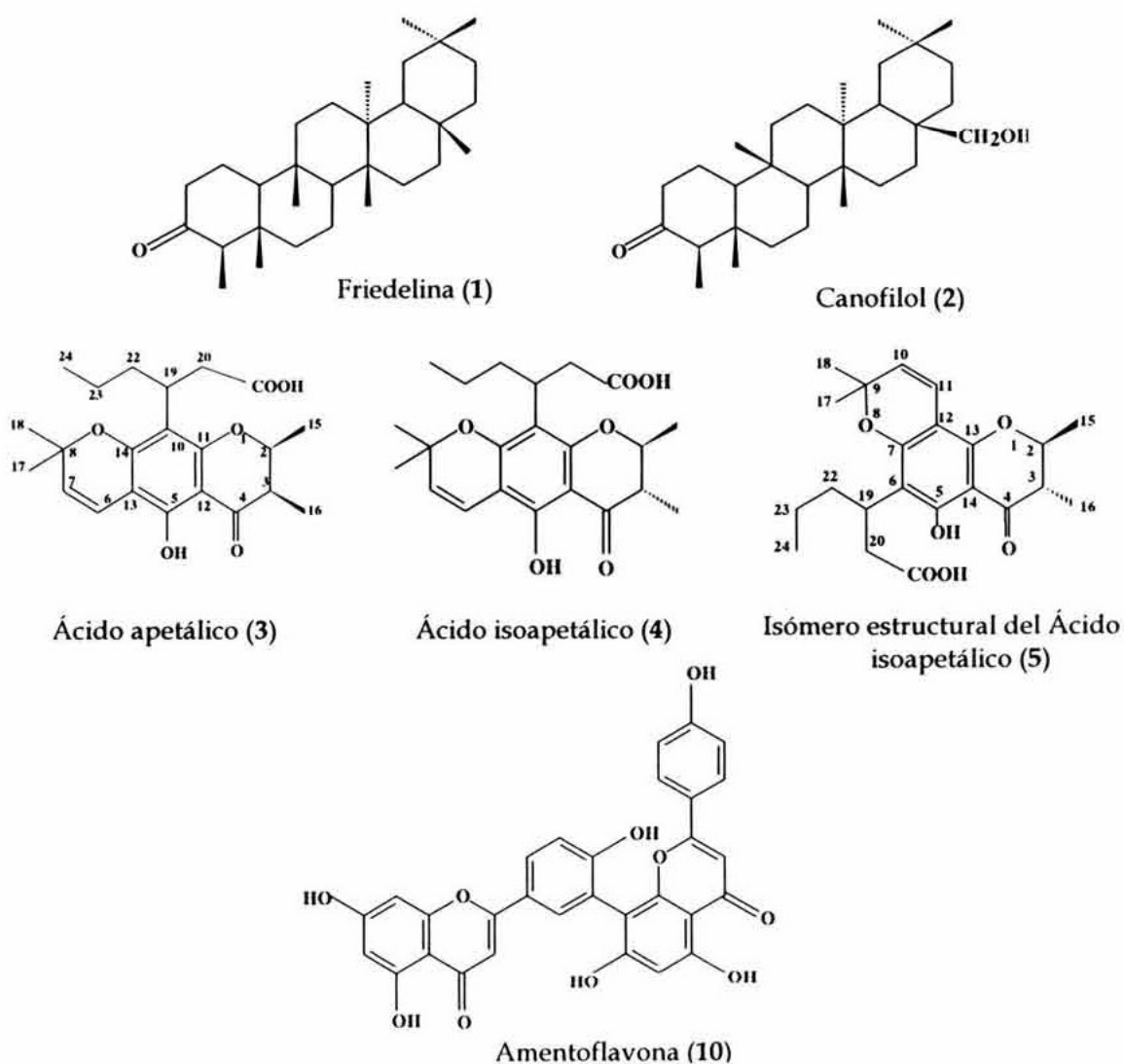
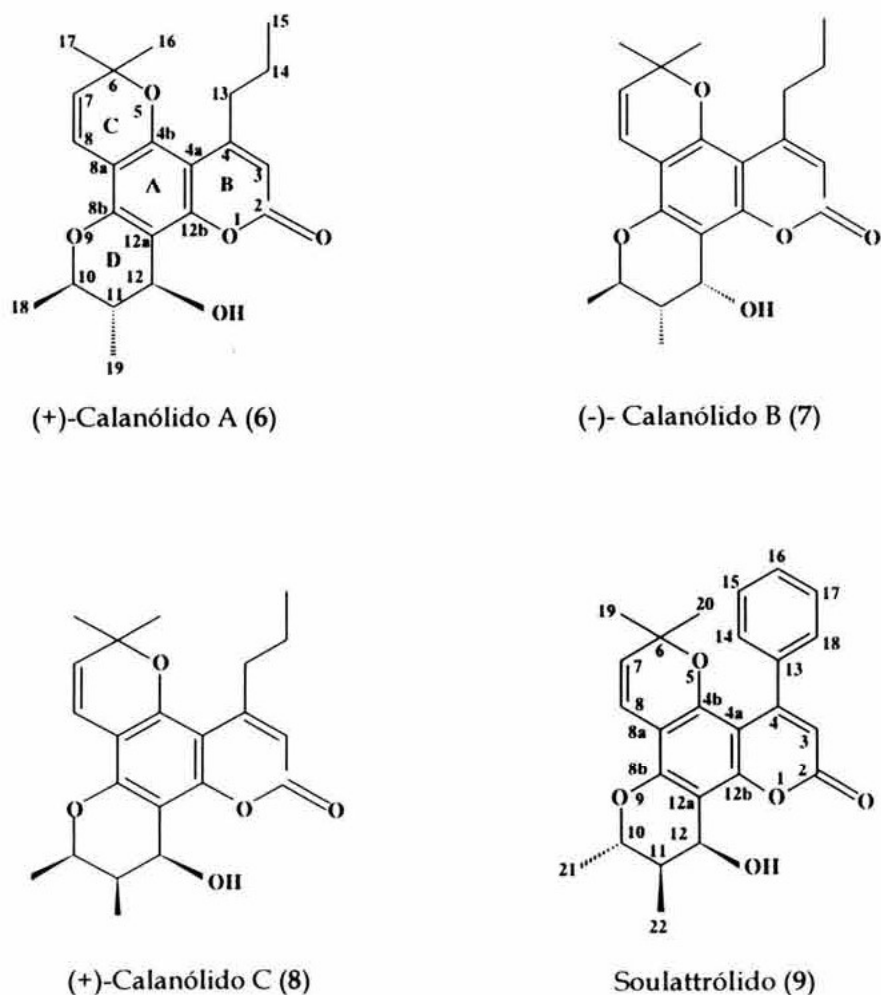


Figura 30. Metabolitos secundarios aislados de las hojas de *C. brasiliense* inactivos contra TR VIH-1.

Por otra parte, las dipiranocumarinas (+)-calanólido A (6), (-)-calanólido B (7), y soulattrólido (9) fueron identificados como los compuestos responsables de las propiedades anti VIH evaluadas, mientras que el (+)-calanólido C (8) mostró una actividad inhibitoria moderada sobre TR VIH-1 (Figura 31). En esta sección se describen los datos espectroscópicos y constantes físicas que permitieron proponer las estructuras respectivas de los compuestos aislados. Para mayores detalles, consultar el Apéndice II.



**Figura 31.** Dipiranocumarinas aisladas de las hojas de *C. brasiliense* con propiedades anti VIH.



### 3.1.1 (+)-Calanólido A

El (+)-calanólido A (6) fue aislado como un aceite amarillo, ópticamente activo  $[\alpha]^{25}_D +48.2^\circ$ , el cual mostró en espectrometría de masas (FAB) el ión ( $M^+ + 1$ ) en 371  $m/z$  congruente con la fórmula  $C_{22}H_{26}O_5$ . El espectro de RMN $^{13}C$  mostró señales en el experimento DEPT para 5 metilos (C-15, C-19, C-18, C-16 y C-17), 2 metilenos (C-14 y C-13) y 6 metinos. Tres de estos metinos son de tipo vinílico (C-3, C-8 y C-7) y dos están unidos a oxígeno (C-12 y C-10) (Figura 32). En el espectro de RMN $^{13}C$  se observaron señales para 9 carbonos cuaternarios. Las señales  $\delta=160.4$  y  $110.1$  fueron asignadas al carbonilo (C-2) y el carbono vinílico (C-3) del núcleo de la cumarina (anillo B), la cual está sustituida en C-4 ( $\delta=158.8$ ) por un grupo propilo (Figura 33). Las señales de los metilenos del sustituyente se observaron en el espectro de RMN $^1H$  como multipletes que integran para dos hidrógenos,  $\delta=1.65$  y  $2.89$  para  $CH_2-14, 14'$  y  $CH_2-13, 13'$ , respectivamente; el metilo 15 se observó como una señal triple  $\delta=1.03$  (Figura 34). Los acoplamientos a 1 enlace de distancia  $^{13}C-^1H$  fueron establecidos por HMQC. La presencia de seis carbonos cuaternarios indican que el anillo aromático (A) de la cumarina está completamente sustituido:  $\delta=104.0$  (C-4a),  $106.3$  (C-12a),  $106.4$  (C-8a),  $151.1$  (C-4b),  $153.1$  (C-8b) y  $154.5$  (C-12b) (Figura 32). Uno de los sustituyentes es un anillo *gem* dimetilpirano (anillo C), con base en las señales dobles de RMN $^1H$   $\delta=5.53$  ( $J=9.7$  Hz) y  $6.61$  ( $J=9.7$  Hz) para los protones vinílicos acoplados H-7 y H-8, así como las señales simples que integran para tres protones cada una  $\delta=1.45$  y  $1.50$  para los metilos geminales 16 y 17, respectivamente (Figura 34).

Otro conjunto de señales diagnósticas en los espectros de RMN $^1H$  y que fueron apoyadas por el espectro COSY (Figura 35), indicaron la presencia del otro sustituyente de la cumarina, un anillo dimetildihidropirano (anillo D). Dichas señales son: un doble de cuartetos  $\delta=3.92$  ( $J=9.1, 6.4$  Hz) para el H-10, el cual está acoplado con el metilo 18 cuya señal se

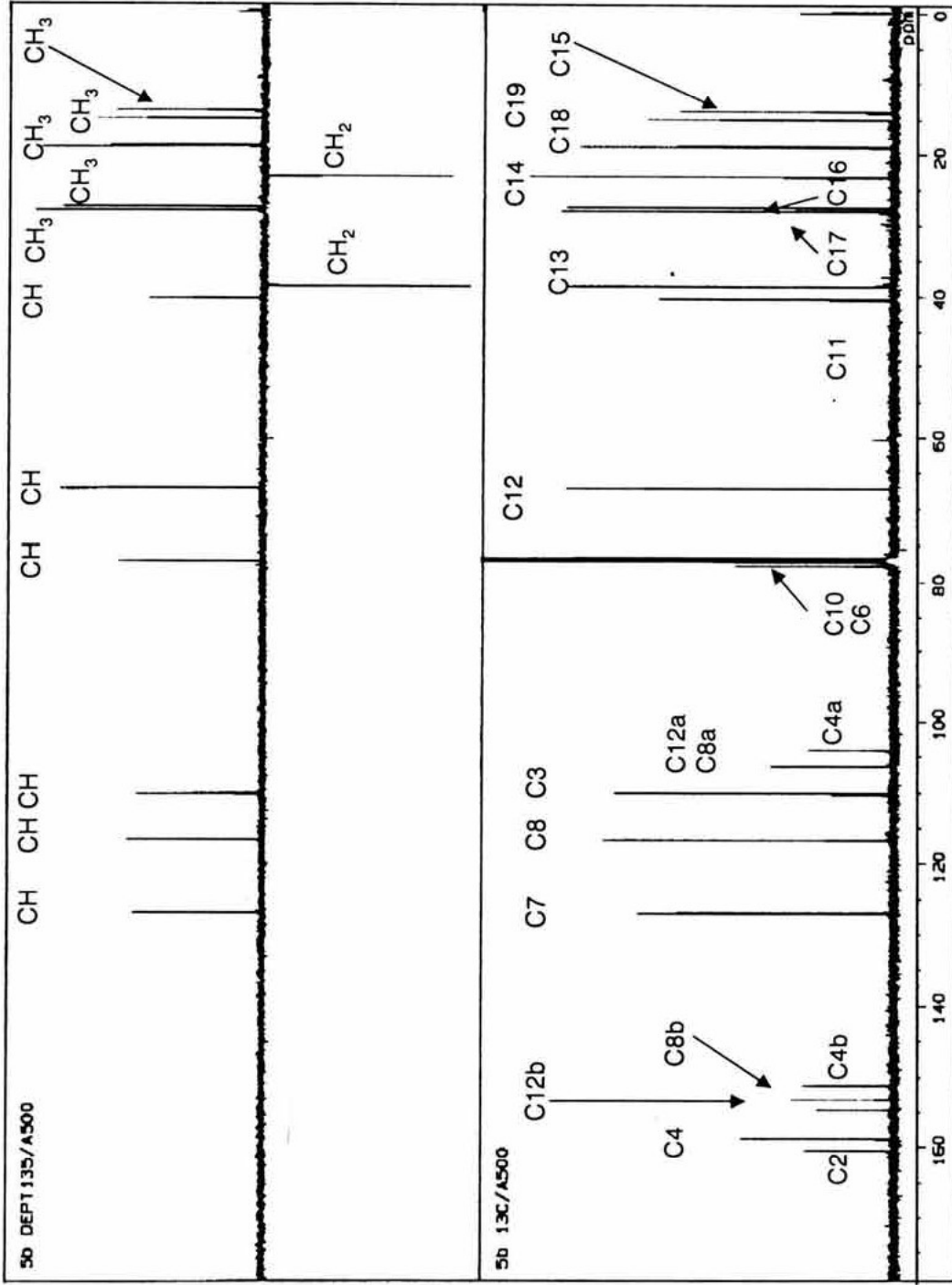
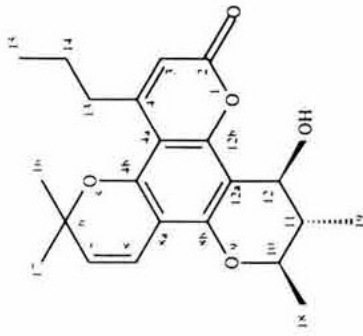


Figura 32. Espectro DEPT del calanolido A.



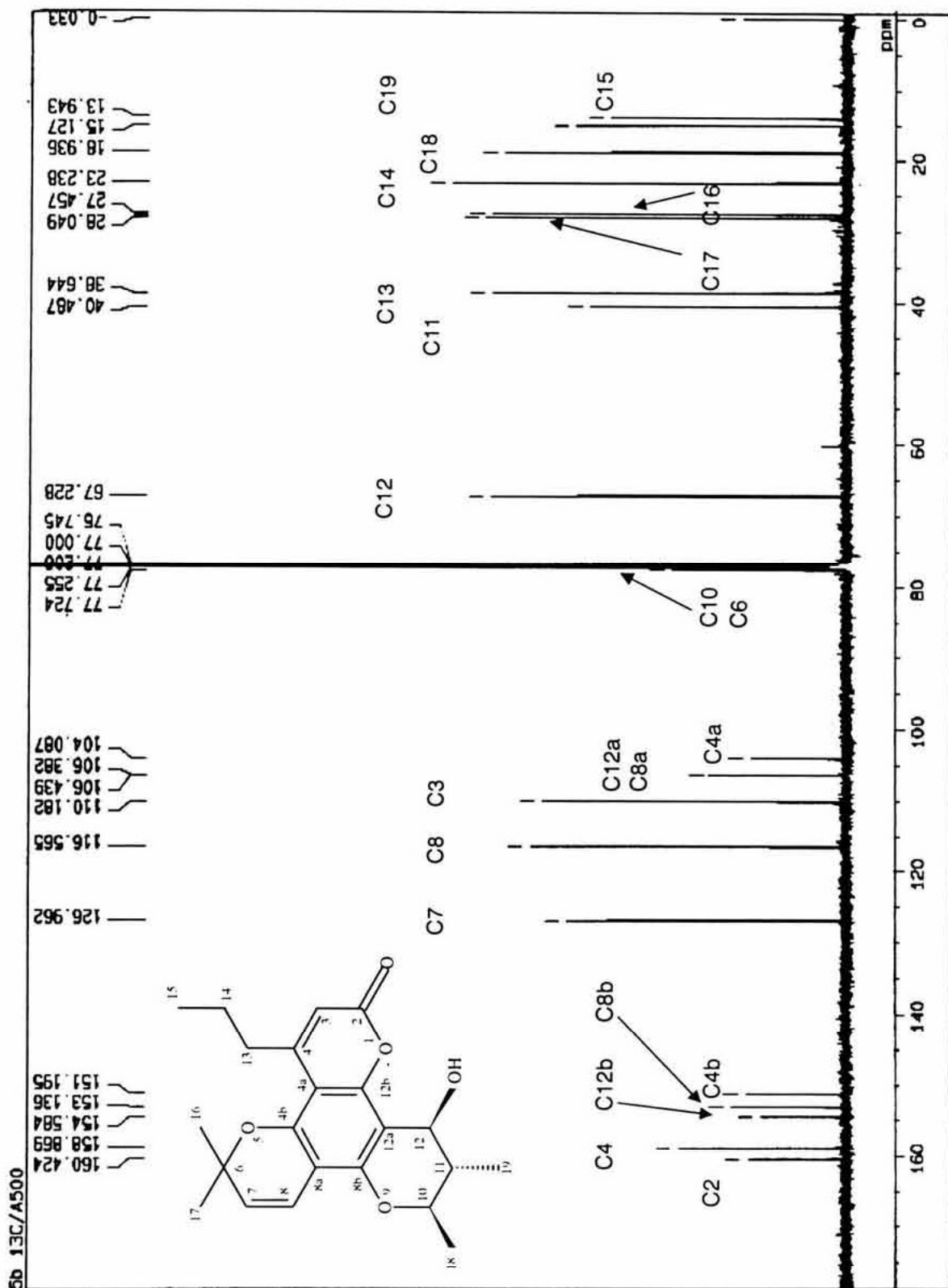


Figura 33. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$  del calanolido A.

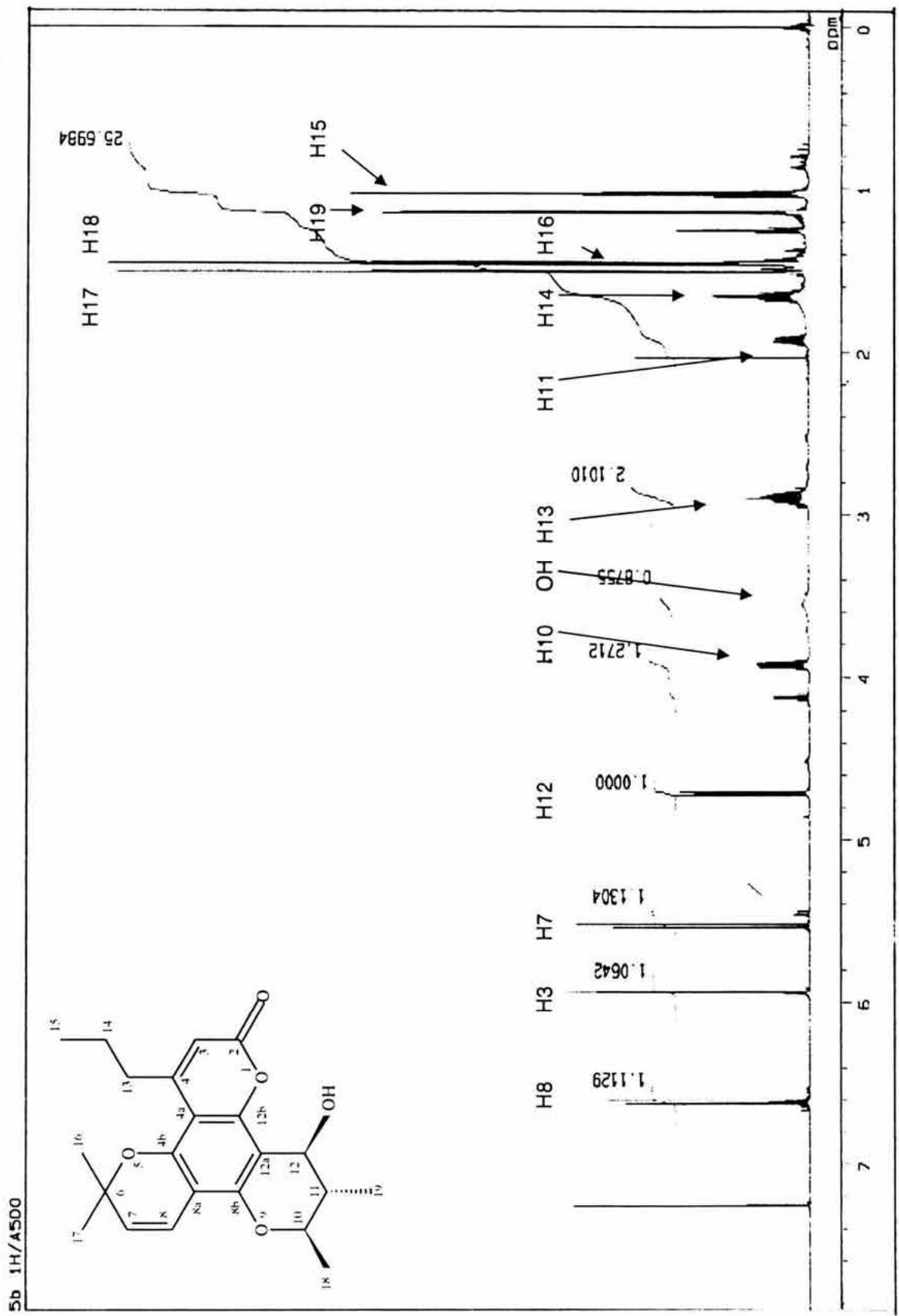


Figura 34. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del calanólido A.



observó como doble  $\delta=1.45$  ( $J_{10,18} = 6.4$  Hz), y con el H-11, a su vez, éste aparece como una señal doble de doble cuartetos ( $J_{10,11}= 9.1$ ,  $J_{11,12}= 7.6$ ,  $J_{11,19}= 6.7$  Hz). El metino 11 también está acoplado con el metilo 19, el cual mostró su señal de resonancia como doblete  $\delta=1.14$  ( $J_{11,19}= 6.7$  Hz) y con el H-12 ( $J_{11,12}= 7.6$  Hz). El metino H-12 se registró como un doblete en 4.71.

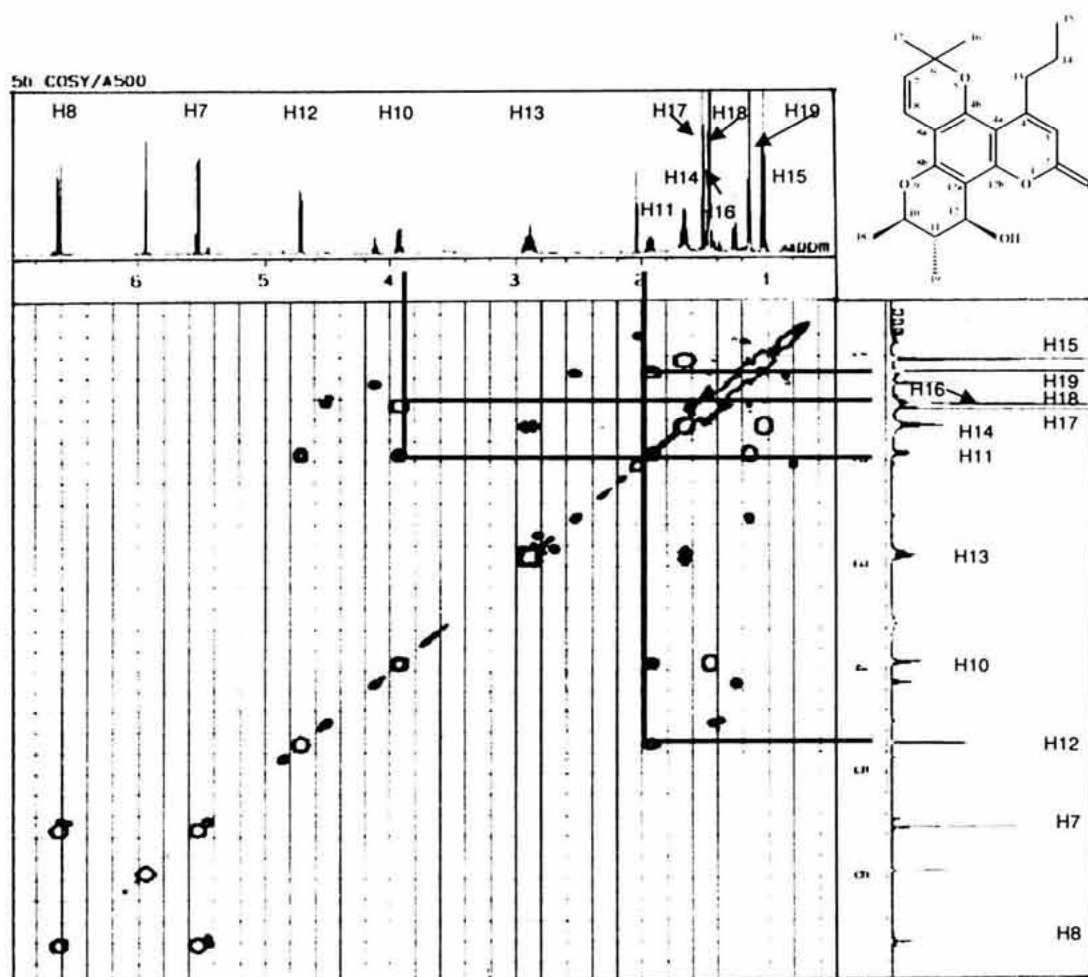


Figura 35. Espectro COSY del calanólido A.

Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de estos protones son fundamentales para distinguir los diferentes calanólidos y se resumen en la Tabla 8. Estos datos observados concuerdan con los publicados (Kashman Y., *et al.*, 1992). En el caso de los carbonos, las diferencias de

desplazamiento químico son <0.5 ppm y no son consideradas como relevantes para la diferenciación entre calanólidos (Kashman Y., *et al.*, 1992).

**Tabla 8.** Desplazamientos químicos de los protones del anillo D de los calanólidos

	Protón	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	$J$ (Hz)
(+) -calanólido A	H-10	3.92	dc	9.1, 6.4
	H-11	1.92	ddc	9.1, 7.6, 6.7
	H-12	4.71	d	7.6
	CH <sub>3</sub> -18	1.45	d	6.4
	CH <sub>3</sub> -19	1.14	d	6.7
(-) -calanólido B	H-10	4.25	dc	10.6, 6.4
	H-11	1.75	dc	10.6, 7.0, 3.6
	H-12	4.96	t	3.6
	CH <sub>3</sub> -18	1.42	d	6.4
	CH <sub>3</sub> -19	1.13	d	7.0
(+) -calanólido C	H-10	4.38	dc	6.7, 3.3
	H-11	2.26	m	-
	H-12	5.07	d	5.1
	CH <sub>3</sub> -18	1.41	d	6.7
	CH <sub>3</sub> -19	1.14	d	7.0

Finalmente, las correlaciones establecidas en el experimento HMBC permitieron establecer la posición angular del anillo C, por los acoplamientos a dos enlaces de distancia entre H-8 con C-8a, así como con C-4b y C8b a tres enlaces de distancia (Figura 36).

Compuesto 6 ((+) -calanólido A), aceite de color amarillo. RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.03 (3H, t,  $J$ = 7.3 Hz, CH<sub>3</sub>-15), 1.14 (3H, d,  $J$ = 6.7 Hz, CH<sub>3</sub>-19), 1.45 (3H, d,  $J$ = 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>-18), 1.45 (3H, s, CH<sub>3</sub>-16), 1.50 (3H, s, CH<sub>3</sub>-17),

1.65 (2H, m, CH<sub>2</sub>-14, 14'), 1.92 (1H, ddc, *J* = 9.1, 7.6, 6.7 Hz, H-11), 2.89 (2H, m, CH<sub>2</sub>-13, 13'), 3.55 (1H, s ancho, OH-12), 3.92 (1H, dc, *J* = 9.1, 6.4 Hz, H-10), 4.71 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-12), 5.53 (1H, d, *J* = 9.7 Hz, H-7), 5.93 (1H, s, H-3), 6.61 (1H, d, *J* = 9.7 Hz, H-8). RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ: 13.9 (C-15), 15.1 (C-19), 18.9 (C-18), 23.2 (C-14), 27.4 (C-16), 28 (C-17), 38.6 (C-13), 40.4 (C-11), 67.2 (C-12), 77.2 (C-10), 77.7 (C-6), 104.0 (C-4a), 106.3 (C-12a), 106.4 (C-8a), 110.1 (C-3), 116.5 (C-8), 126.9 (C-7), 151.1 (C-4b), 153.1 (C-8b), 154.5 (C-12b), 158.8 (C-4), 160.4 (C-2). EM-HR-FAB+Na *m/z*: 393.1680 (Calculado para C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>Na: 393.1678). EM-FAB *m/z*: 371 (M<sup>+</sup>+1), 353, 299. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +48.2° (*c*=0.5, CHCl<sub>3</sub>).

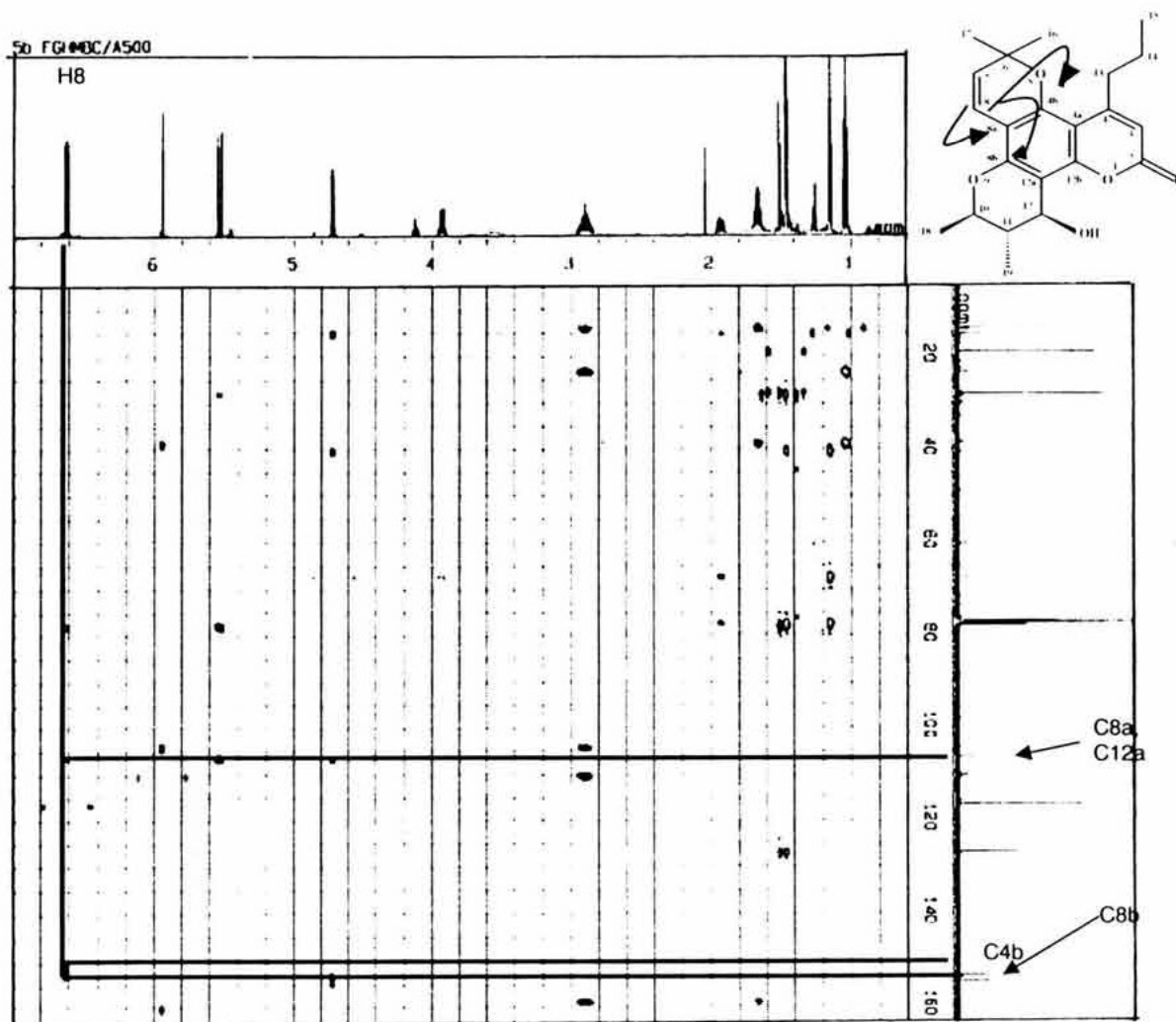


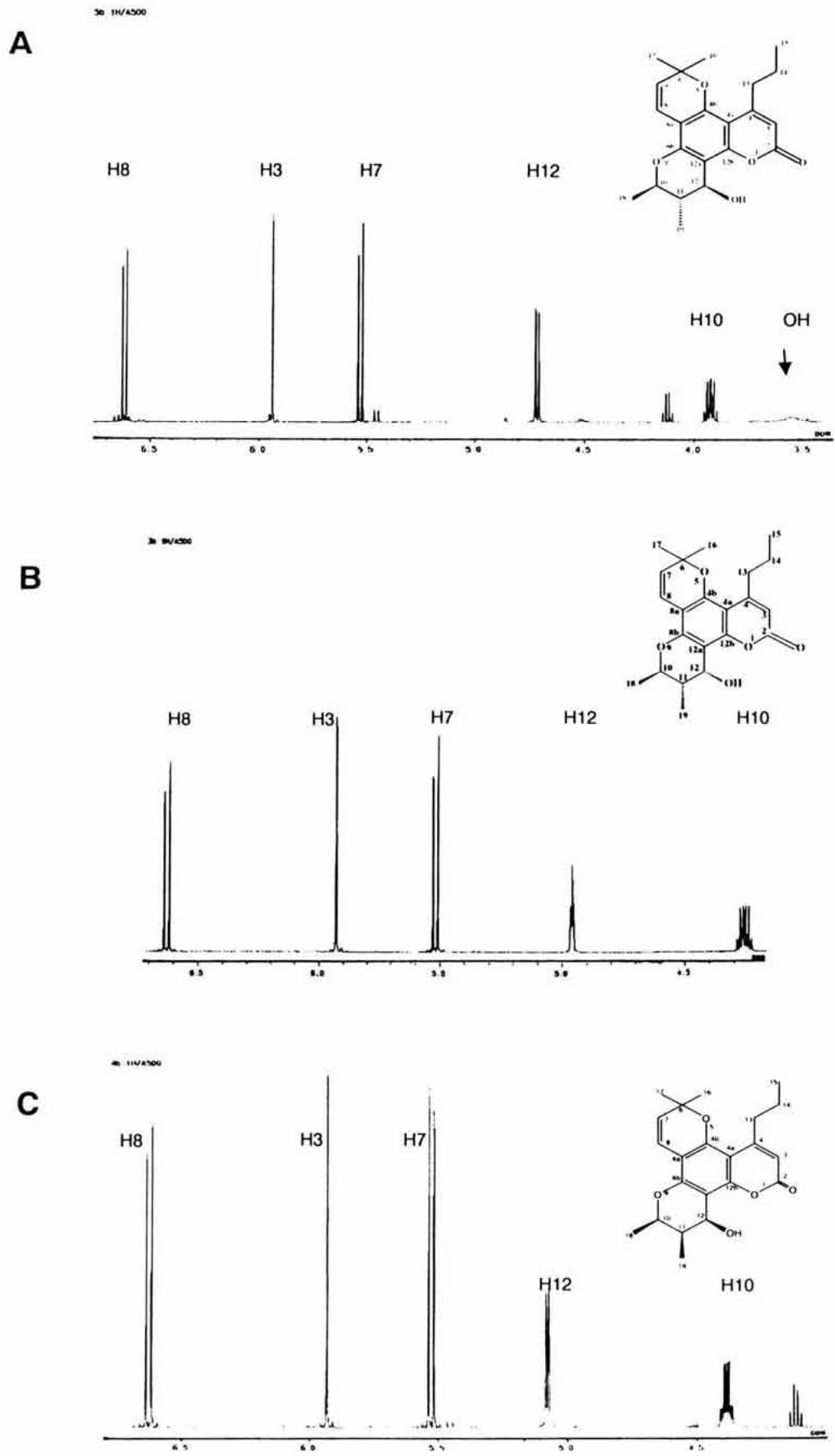
Figura 36. Espectro HMBC del calanólido A. Acoplamientos a 2 y 3 enlaces de distancia

### 3.1.2 (-)-Calanólido B

El (-)-calanólido B (7) es un isómero del (+)-calanólido A como se muestra en el análisis de espectrometría de masas EM-FAB+Na  $m/z$ : 393.1680 (Calculado para  $C_{22}H_{26}O_5Na$ : 393.1678). Los espectros de RMN tanto de  $^1H$  como de  $^{13}C$  son casi iguales a los del (+)-calanólido A en cuanto al esqueleto de dipiranocumarina tetracíclica, sin embargo, las señales diagnósticas del (-)-calanólido B son aquellas observadas en RMN $^1H$  asociadas al anillo D (Figura 37). El H-10 y H-12 aparecen desplazados +0.33 y +0.25 ppm, respectivamente en comparación con las del (+)-calanólido A. En cambio, las señales para H-11, y los metilos 18 y 19 aparecen ligeramente desplazadas a campo bajo (-0.17, -0.03 y -0.01 ppm, respectivamente) y se presentan en la Tabla 8. Adicionalmente, otro dato relevante para la identificación de este compuesto fue el valor de rotación óptica  $[\alpha]^{25}_D$  -38.6°, dato que está acorde con la literatura (Kashman Y., *et al.*, 1992).

Compuesto 7 ((-)-calanólido B), agujas blancas, p. f. 176-179 °C. RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.02 (3H, t,  $J$ = 7.3 Hz,  $CH_3$ -15), 1.13 (3H, d,  $J$ = 7.0 Hz,  $CH_3$ -19), 1.42 (3H, d,  $J$ = 6.4 Hz,  $CH_3$ -18), 1.47 (3H, s,  $CH_3$ -16), 1.48 (3H, s,  $CH_3$ -17), 1.65 (2H, sex,  $J$ = 7.3 Hz,  $CH_2$ -14, 14'), 1.75 (1H, ddc,  $J$ = 10.6, 3.6, 7 Hz, H-11), 2.71 (1H, d,  $J$ = 3.6 Hz, OH-12), 2.89 (2H, m,  $CH_2$ -13-13'), 4.25 (1H, dc,  $J$ = 10.6, 6.4 Hz, H-10), 4.96 (1H, t,  $J$ = 3.6 Hz, H-12), 5.51 (1H, d,  $J$ = 9.7 Hz, H-7), 5.93 (1H, s, 3-H), 6.62 (1H, d,  $J$ = 9.7 Hz, H-8). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 12.4 (C-19), 13.9 (C-15), 18.8 (C-18), 23.2 (C-14), 27.6 (C-17), 27.8 (C-16), 38.3 (C-13), 38.5 (C-11), 61.8 (C-12), 72.9 (C-10), 77.6 (C-6), 103.5 (C-4a), 106.1 (C-8a), 106.4 (C-12a), 110.3 (C-3), 116.5 (C-8), 126.7 (C-7), 151.3 (C-4b), 153.1 (C-12b), 153.9 (C-8b), 158.6 (C-4), 160.9 (C-2). EM-HR-FAB+Na  $m/z$ : 393.1680 (Calculado para  $C_{22}H_{26}O_5Na$ : 393.1678). EM-FAB  $m/z$ : 371 ( $M^+$ +1), 353, 299.  $[\alpha]^{25}_D$ -38.6° ( $c$ =0.5, acetona).



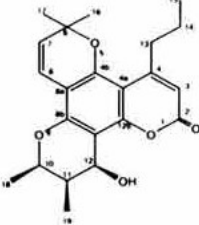
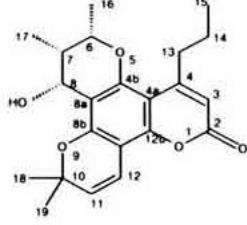


**Figura 37.** Comparación de las ampliaciones de los espectros de RMN<sup>1</sup>H (3-7 ppm). A) (+)-calanolido A. B) (-)-calanolido B. C) (+)-calanolido C.

### 3.1.3 (+)-Calanólido C

El (+)-calanólido C (**8**) fue obtenido como un aceite de color amarillo que al igual que el (-)-calanólido B, es un isómero del (+)-calanólido A. Kashman *et al.*, (1992) reportaron el aislamiento del (+)-calanólido C del fruto y brotes de *C. lanigerum*. Sin embargo, la estructura propuesta fue revisada y corregida por McKee *et al.*, (1995) después de obtener el producto por síntesis. Las asignaciones originales para el (+)-calanólido C propuestas por Kashman *et al.*, (1992) son actualmente reconocidos para el pseudocalanólido C. Los desplazamientos observados en RMN<sup>1</sup>H para el compuesto **8** aislado en este trabajo llevaron a la identificación del (+)-calanólido C de acuerdo con los datos reportados por McKee *et al.*, (1995) (Tabla 9). Las señales diagnósticas fueron,  $\delta=6.62$  para H-8 y 5.07 para H-12 (Figura 37), así como  $\delta=116.6$  para C-8, 106.5 para C-8a, 62.9 para C-12 y 105.8 para 12a (Figura 38).

**Tabla 9.** Desplazamientos químicos comparativos entre calanólido C y pseudocalanólido C.

		Calanólido C*	Pseudocalanólido C**
			
Protón		$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
	8	6.62	5.06
	10	4.38	-----
	11	2.26	5.56
	12	5.07	6.83
Carbono			
	8	116.6	65.9
	8a	106.5	109.2
	12	62.9	115.7
	12a	105.8	102.9

\*Datos observados; \*\*McKee T., *et al.*, 1995.

4b 13C/A500

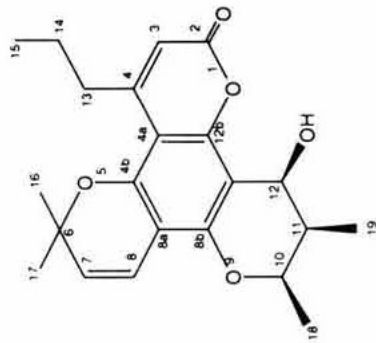
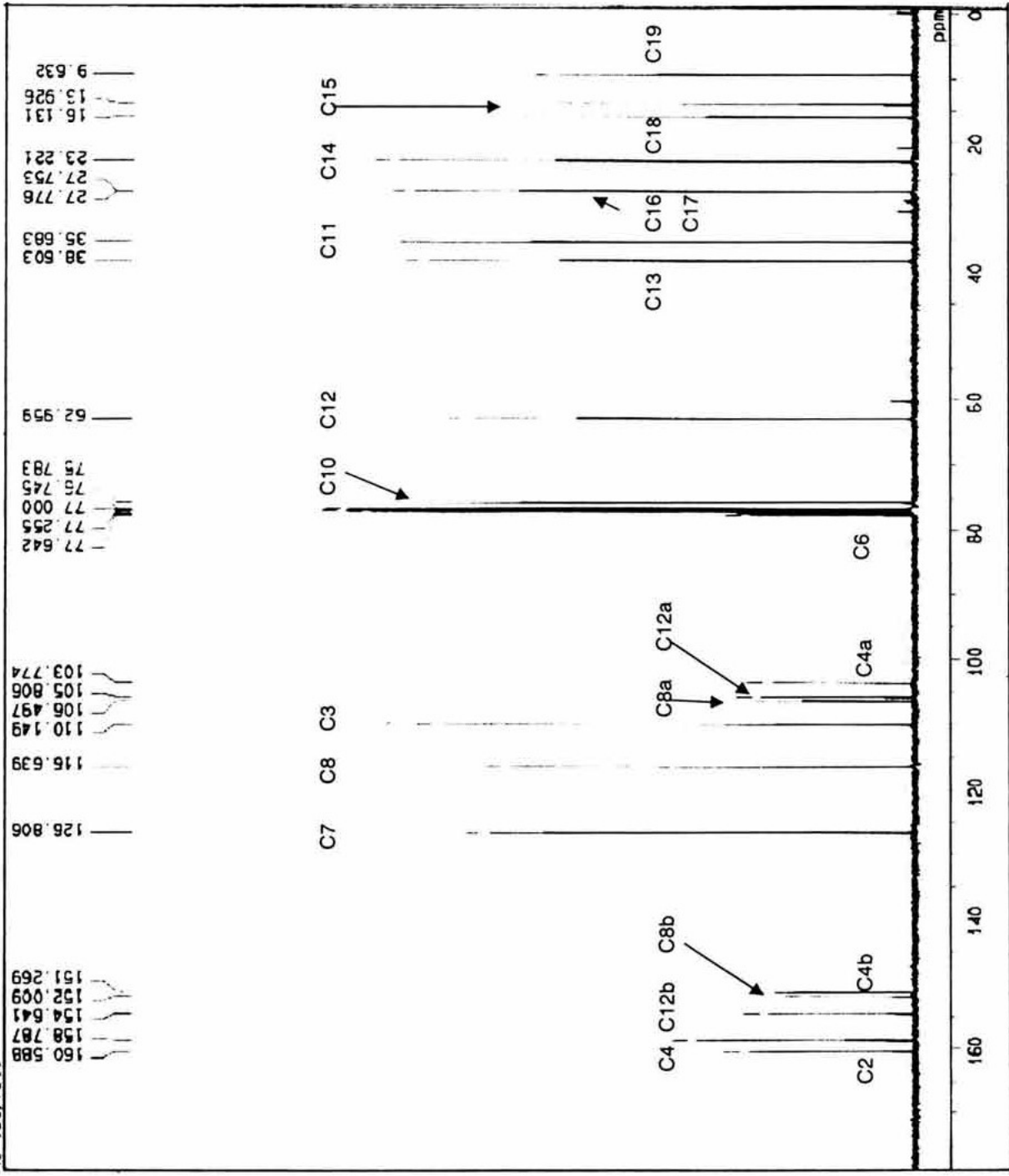


Figura 38. Espectro de RMN<sup>13</sup>C del calanolido C.

El espectro HMBC permitió determinar la posición angular del anillo *gem*-dimetilpirano sobre los carbonos 8a y 4b del esqueleto de la cumarina, con base en el acoplamiento a tres enlaces de distancia entre H-8 ( $\delta=6.62$ ) y C-8b ( $\delta=152.0$ ). También se observaron los acoplamientos entre H-7 ( $\delta=5.52$ ) y C-8a ( $\delta=106.5$ ), H-8 ( $\delta=6.62$ ) y C-4b ( $\delta=151.2$ ), H-10 ( $\delta=4.38$ ) y C-8b ( $\delta=152.0$ ), H-12 ( $\delta=5.07$ ) y C-12a ( $\delta=105.8$ ), H-12 ( $\delta=5.07$ ) y C-8b ( $\delta=152.0$ ), H-12 ( $\delta=5.07$ ) y C-12b ( $\delta=154.6$ ) (Figura 39).

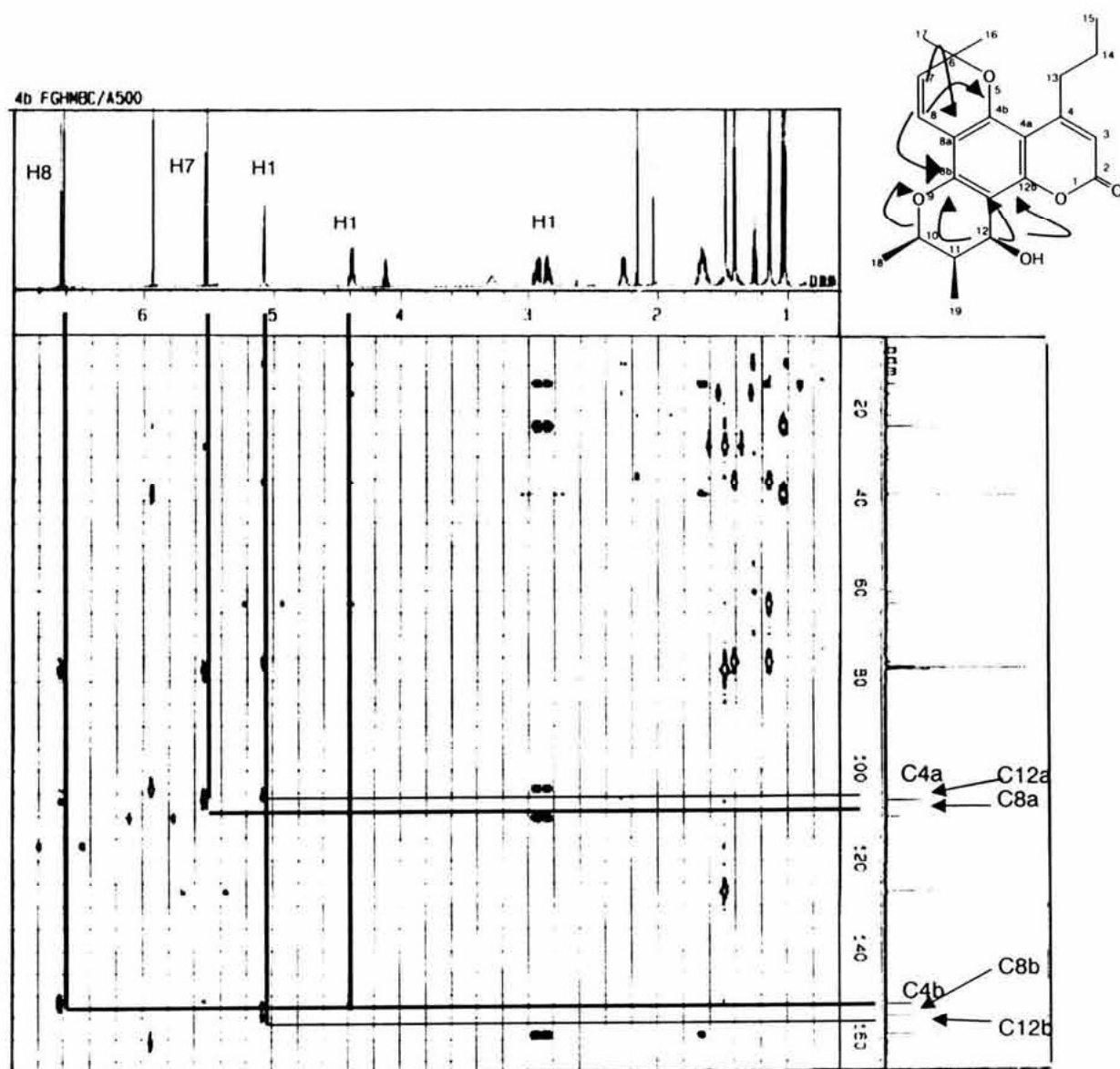


Figura 39. Espectro HMBC del calanólido C. Acoplamiento a tres enlaces de distancia para el establecimiento del anillo *gem* dimetilpirano.



Estas señales son similares a las reportadas por McKee T. C. *et al.*, (1995). Esta es la primera vez que el (+)-calanólido C (8) es obtenido como un producto natural y evaluado contra la TR VIH-1.

Compuesto 8 ((+)-calanólido C), aceite amarillo. RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.03 (3H, t, *J*= 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-15), 1.14 (3H, d, *J*= 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-19), 1.41 (3H, d, *J*= 6.7 Hz, CH<sub>3</sub>-18), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>-16), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>-17), 1.65 (2H, m, CH<sub>2</sub>-14, 14'), 2.26 (1H, m, H-11), 2.84 (1H, m, H-13), 2.93 (1H, m, H-13'), 3.28 (1H, s ancho, OH-12), 4.38 (1H, dc, *J*= 3.3, 6.7 Hz, H-10), 5.07 (1H, d, *J*= 5.1 Hz, H-12), 5.52 (1H, d, *J*= 9.7 Hz, H-7), 5.93 (1H, s, H-3), 6.62 (1H, d, *J*= 9.7 Hz, H-8). RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.6 (C-19), 13.9 (C-15), 16.1 (C-18), 23.2 (C-14), 27.7 (C-16), 27.7 (C-17), 35.6 (C-11), 38.6 (C-13), 62.9 (C-12), 75.7 (C-10), 77.6 (C-6), 103.7 (C-4a), 105.8 (C-12a), 106.5 (C-8a), 110.1 (C-3), 116.6 (C-8), 126.8 (C-7), 151.2 (C-4b), 152.0 (C-8b), 154.6 (C-12b), 158.7 (C-4), 160.5 (C-2). EM-HR-FAB+Na *m/z*: 393.1685 (Calculado para C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>Na: 393.1678). EM-FAB *m/z*: 371 (M<sup>+</sup>+1), 353, 299. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>+96.3° (*c*=1.0, CHCl<sub>3</sub>).

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

### 3.1.4 Soulattrólido

El soulattrólido (9) fue obtenido como agujas de color amarillo pálido. Pertenece al grupo de dipiranocumarinas tetracíclicas, conocidas como inophyllums, las cuales difieren con los calanólidos por presentar un sustituyente fenilo en lugar de propilo en la posición 4 (Figura 31). El anillo aromático fue evidenciado en el espectro de RMN<sup>1</sup>H por: una señal múltiple en 7.23 que integra para tres protones y que fue asignada a H-15, H-16, y H-17 y otra señal múltiple en 7.36 que integra para dos protones y que fue asignada a H-14 y H-18 (Figura 40), mientras que en los espectros de RMN<sup>13</sup>C aparecieron dos señales, una en 127.3 para los carbonos C-15, C-16 y C-17 y otra señal en 127.6 para los carbonos C-14 y 18 (Figura 41). En el espectro HMQC pudieron observarse y asignarse los carbonos de este anillo aromático (Figura 42).

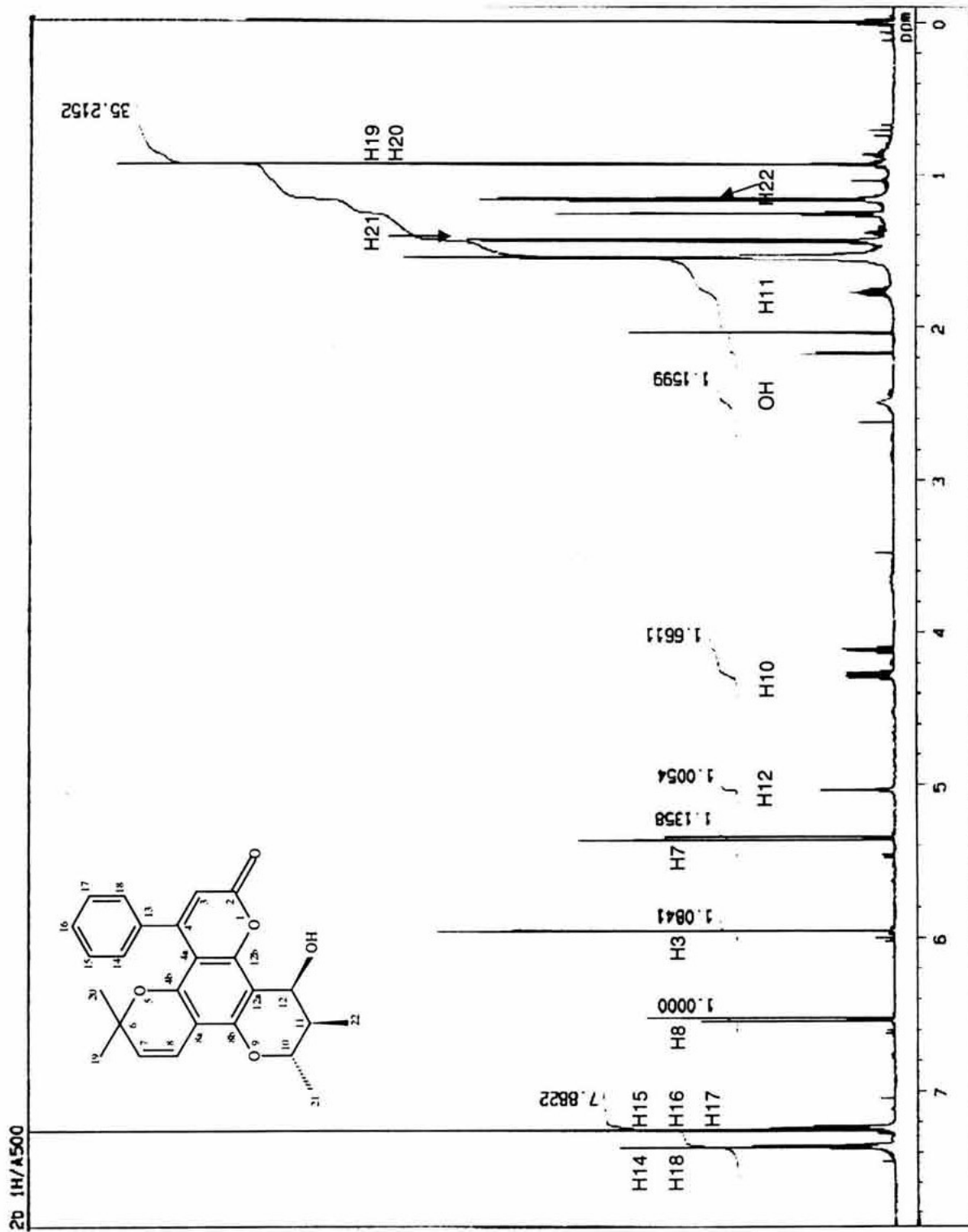


Figura 40. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del soulatrólido.

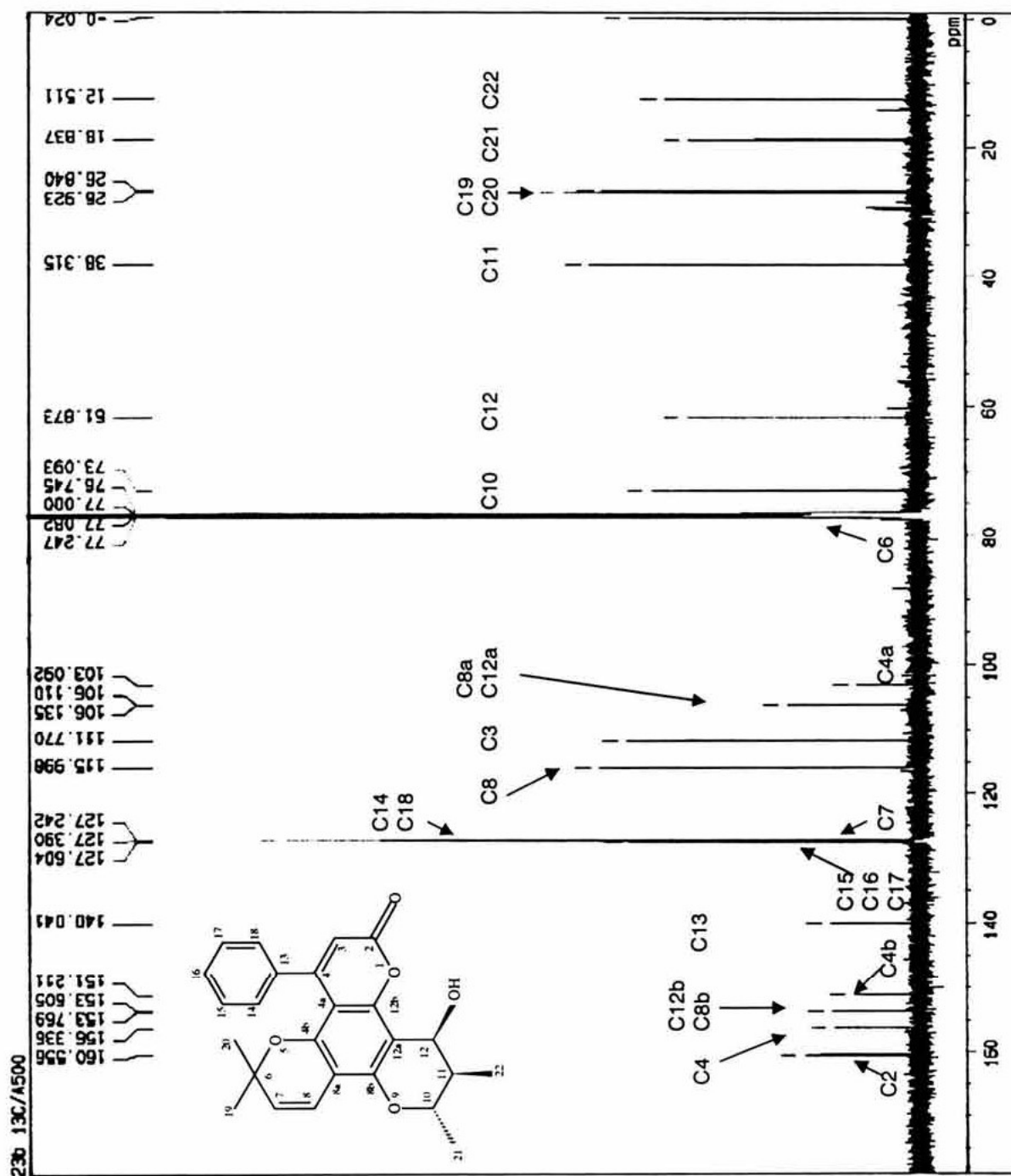
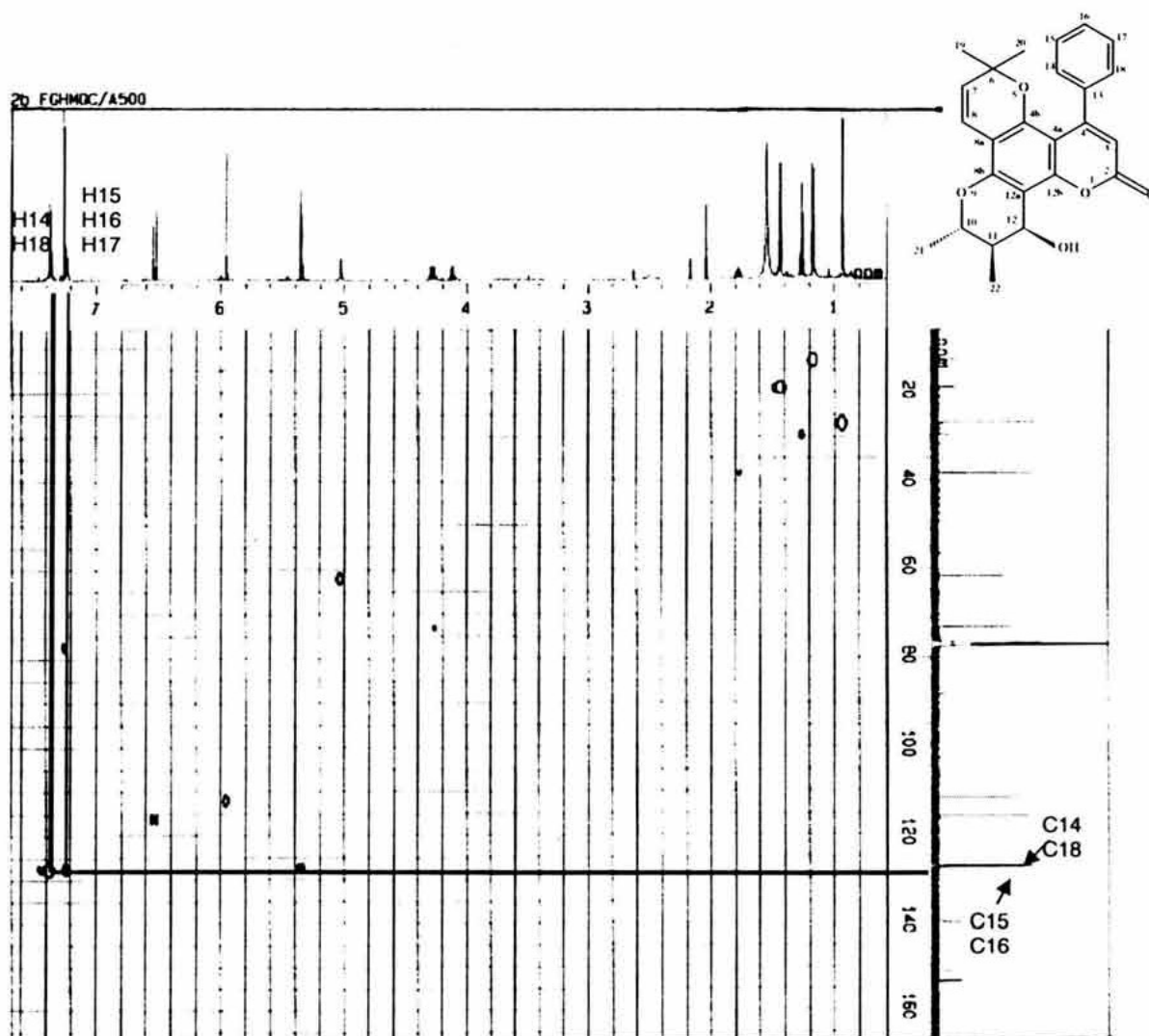


Figura 41. Espectro de RMN<sup>13</sup>C del soulatrolidol.



**Figura 42.** Espectro HMQC del soulatrolido. Asignaciones de los protones y carbonos del sustituyente aromático en C-4.

Compuesto **9** (soulatrolido), agujas de color amarillo pálido, p. f. 177-181°C. RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.93 (6H, s, 19, CH<sub>3</sub>-20), 1.16 (3H, d, *J*= 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-22), 1.43 (3H, d, *J*= 6.1 Hz, CH<sub>3</sub>-21), 1.77 (1H, ddc, *J*= 10.9, 3.3, 7.0 Hz, H-11), 2.5 (1H, s, OH-12), 4.28 (1H, d, *J*= 10.9, 6.1 Hz, H-10), 5.03 (1H, d, *J*= 3.3 Hz, H-12), 5.35 (1H, d, *J*= 9.7 Hz, H-7), 5.95 (1H, s, H-3), 6.53 (1H, d, *J*= 9.7 Hz, H-8), 7.23 (3H, m, 15, 16, H-17), 7.36 (2H, m, 14, H-18). RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ: 12.5 (C-



22), 18.8 (C-21), 26.8, 26.9 (C-19, 20), 38.3 (C-11), 61.8 (C-12), 73.0 (C-10), 77.2 (C-6), 103.0 (C-4a), 106.1 (C-8a, 12a), 111.7 (C-3), 115.9 (C-8), 127.2 (C-7), 127.3 (C-14, 18), 127.6 (C-15, 16, 17), 140.0 (C-13), 151.2 (C-4b), 153.6 (C-12b), 153.7 (C-8b), 156.3 (C-4), 160.5 (C-2). EM-HR-FAB+Na  $m/z$ : 427.1526 (Calculado para  $C_{25}H_{24}O_5Na$ : 427.1521). EM-FAB  $m/z$ : 405 ( $M^{+1}$ ), 387, 371.  $[\alpha]^{25}_D -14^\circ$  ( $c=0.25$ ,  $CHCl_3$ ).

### 3.1.5 Ácido apetalico

El ácido apetalico (**3**) se obtuvo como un aceite de color amarillo. El espectro de masas (FAB) mostró el ión ( $M^{+1}$ ) en 389  $m/z$ , congruente con la fórmula  $C_{22}H_{29}O_6$ . El espectro de RMN<sup>13</sup>C mostró señales en el experimento DEPT para 5 metilos (C-15, C-16, C-24, C-17 y C-18), 3 metilenos (C-23, C-22 y C-20) y 5 metinos (C-6 y C-7 -vinílicos-, C-2, C-3 y C-19) (Figura 43). En el espectro de RMN<sup>13</sup>C se observaron señales para 8 carbonos cuaternarios. La presencia de un anillo de dimetil cromanona fue determinada por las siguientes señales. La señal en 201.2 ppm fue asignada al carbonilo del anillo de lactona en C-4 (Figura 44). Los protones de un metilo y un metino acoplados, localizados en las posiciones 15 y 2, fueron indicados por una señal doble en 1.35 ppm (3H,  $J=6.7$  Hz) y una señal múltiple,  $\delta=4.44$  (1H), respectivamente (Figura 45). Otro sistema similar para el metilo ( $CH_3$ -16) y el hidrógeno (H-3) acoplados se observó mediante las señales en 1.13 ppm ( $J=7.3$  Hz) y un cuádruple de dobles en 2.51 ppm ( $J=7.3, 3.0$ , Hz), respectivamente. Las constantes de acoplamiento entre los protones 2 y 3 ( $J_{2,3}=3.0$  Hz), indicaron que presentan orientación *cis*. Los valores de las constantes de acoplamiento y desplazamientos químicos concuerdan con los reportados previamente en la literatura (Govindachari T. R., Prakash D., Viswanathan N., 1968; Shen Y. C., *et al.*, 2004).

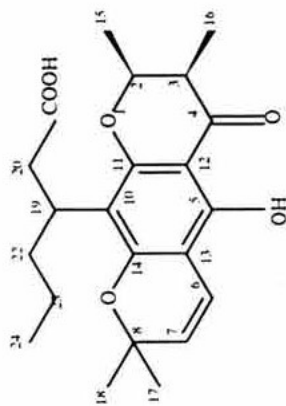
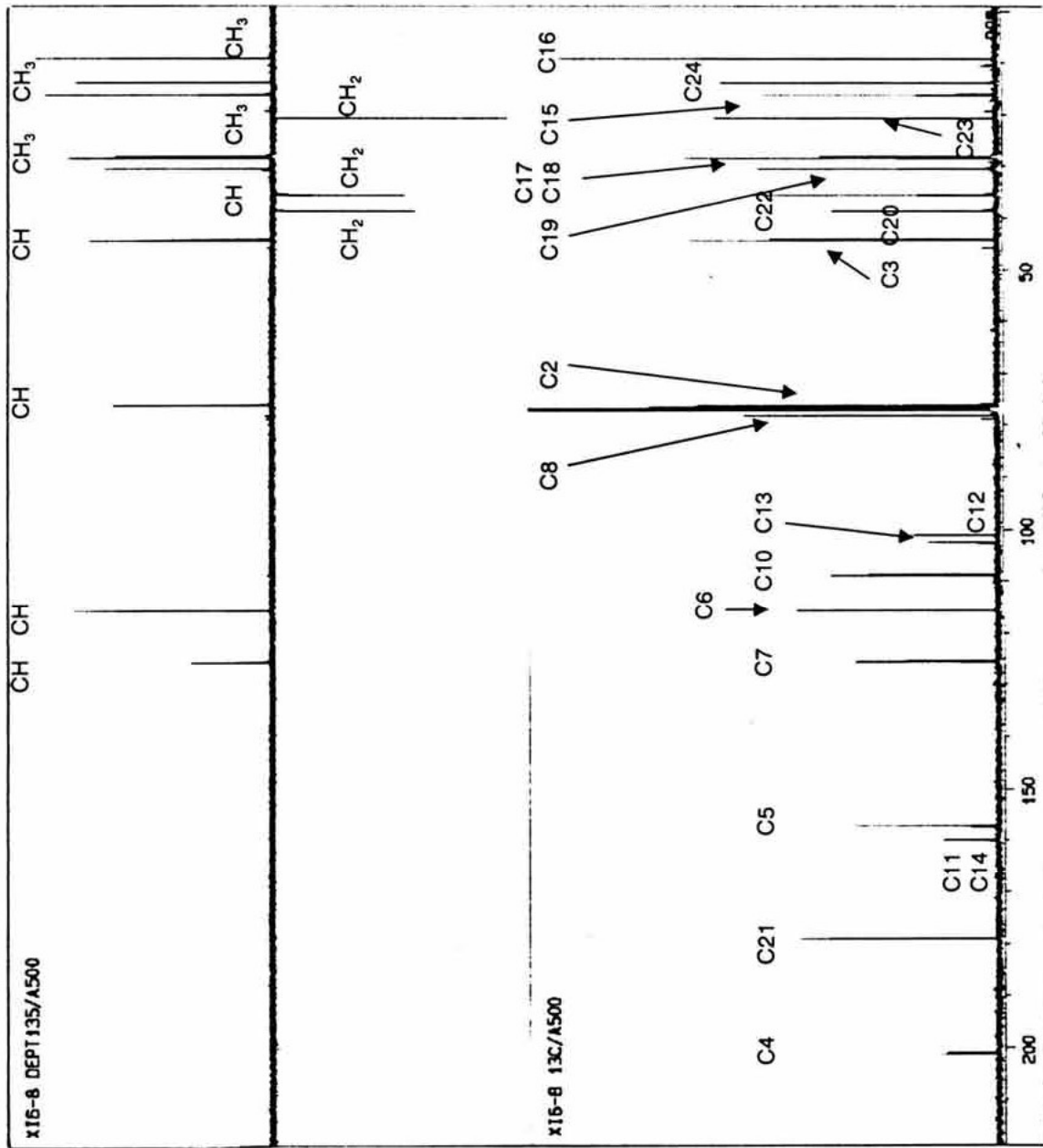


Figura 43. Espectro DEPT del ácido apigénico.

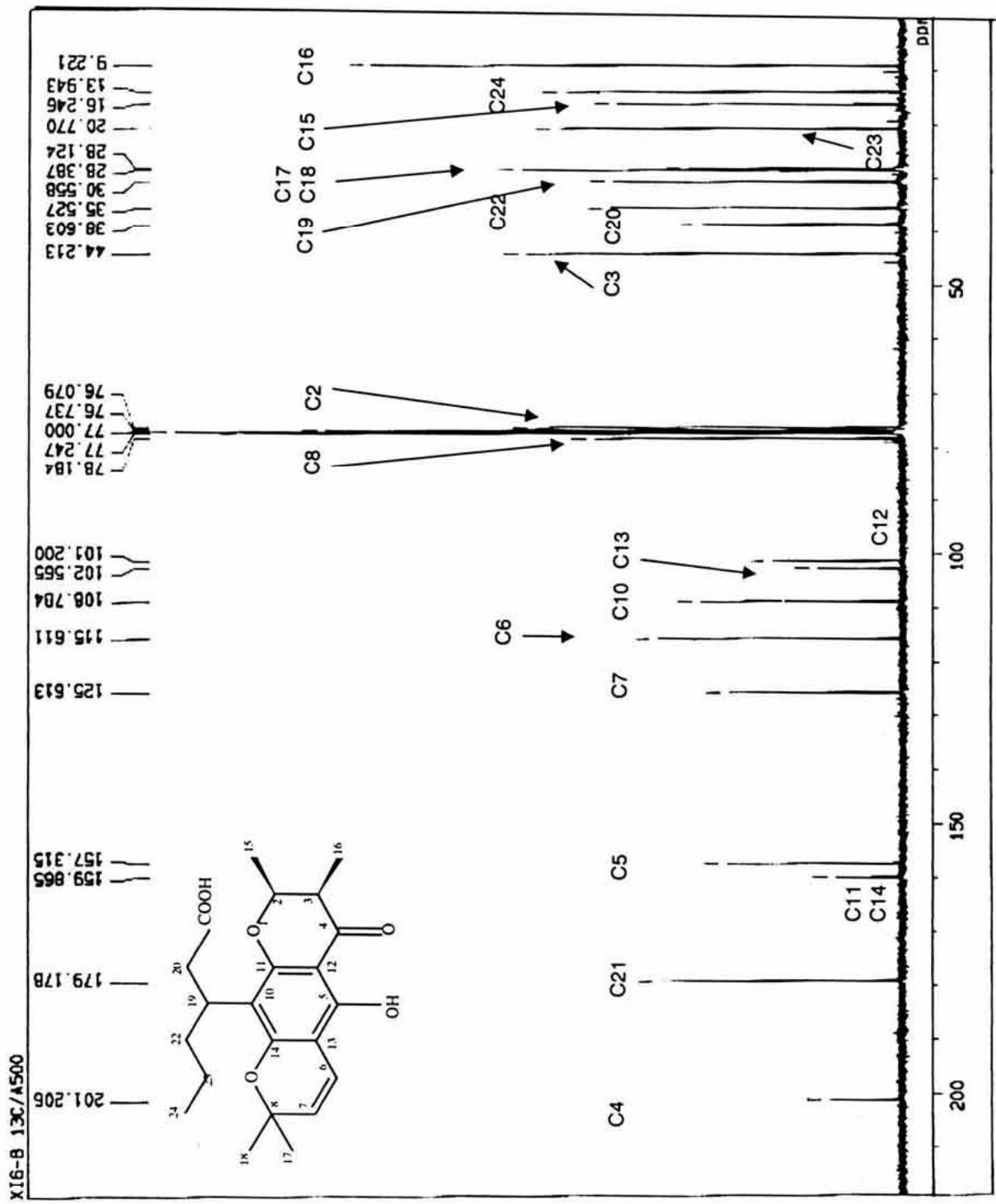


Figura 44. Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  del ácido apético.

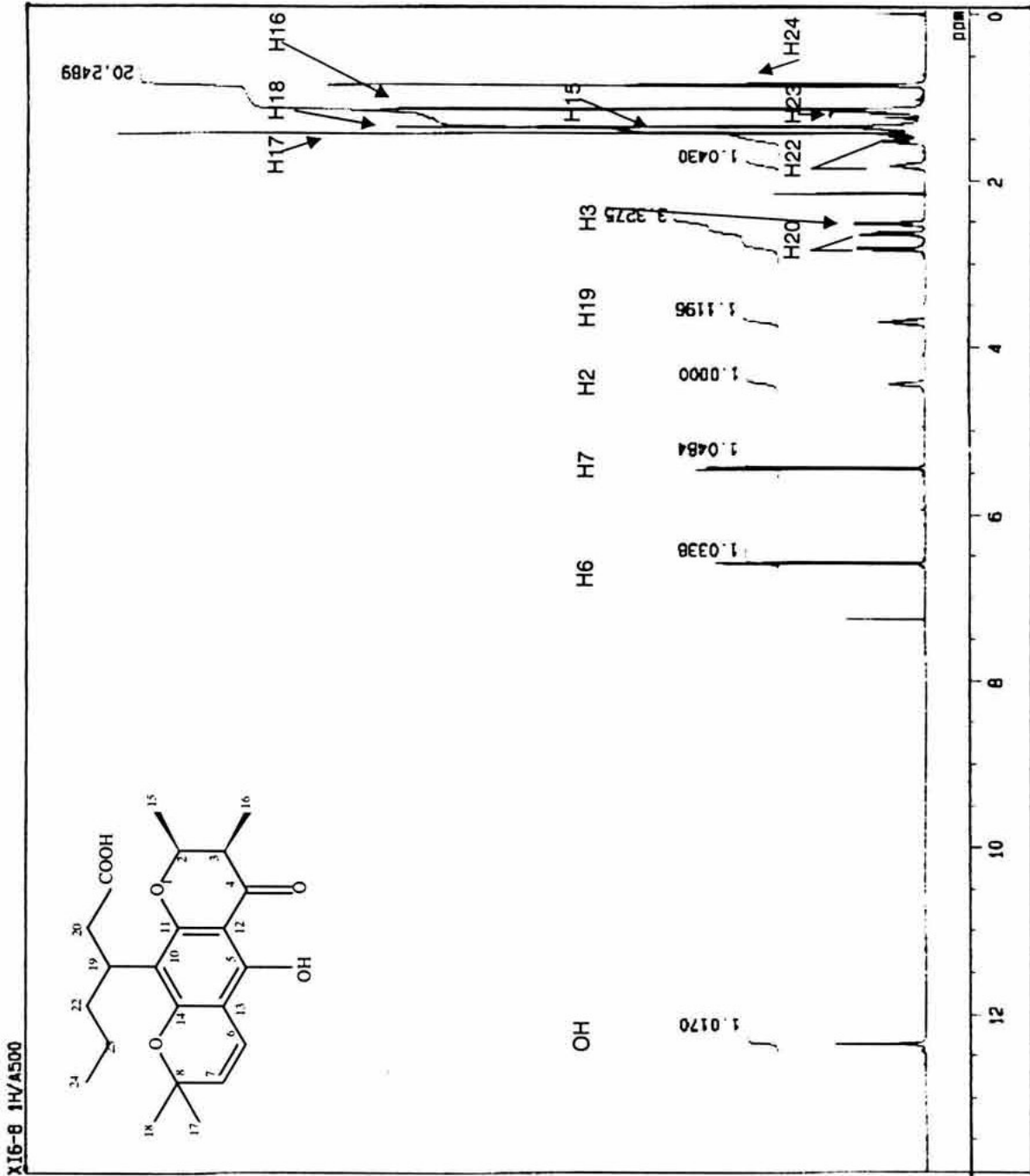


Figura 45. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido apético.



La presencia de un sustituyente dimetilpirano fue indicada por dos señales dobles en 6.59 y 5.44 ppm con  $J_{6,7}=10$  Hz características de protones olefínicos H-6 y H-7 con orientación *cis*, así como por dos señales simples (1.35 y 1.43 ppm) para los metilos geminales 18 y 19.

Por otra parte, se observaron un conjunto de señales que permitieron asignarlas a una cadena alifática similar al ácido hexanoico unido a través del carbono 19 como sustituyente en la posición 10. Estas señales fueron multipletes para los metilenos en 1.16 ppm asignado al CH<sub>2</sub>-23, 1.54 y 1.80 ppm para H-22 y H-22'. Una señal triple que integra para tres protones, fue asignada al metilo 24. Las señales observadas como dobles de dobles  $\delta=2.64$  y  $2.83$  fueron asignadas al metileno H-20 y H-20' con una  $J_{20,20'}=15.1$  Hz, mientras que el multiplete observado en 3.71 ppm correspondió al metino en posición 19. La señal en  $\delta=179.1$  se asignó al carbonilo de un ácido carboxílico (C-21) (Figura 44). Finalmente, se observó un singulete en 12.36 ppm, correspondiente al protón de un sustituyente hidroxilo en C-5. Los acoplamiento a 1 enlace de distancia <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H fueron establecidos por HMQC. Estos desplazamientos se encontraron acordes con la literatura (Shen Y. C., *et al.*, 2004).

Compuesto 3 (ácido apetalico), aceite amarillo. RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.85 (3H, t,  $J=7.3$  Hz, CH<sub>3</sub>-24), 1.13 (3H, d,  $J=7.3$  Hz, CH<sub>3</sub>-16), 1.16 (2H, m, CH<sub>2</sub>-23), 1.35 (3H, d,  $J=6.7$  Hz, CH<sub>3</sub>-15), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 1.43 (3H, s, CH<sub>3</sub>-17), 1.54 (1H, m, H-22), 1.80 (1H, m, H-22'), 2.51 (1H, cd,  $J=7.3, 3.0$  Hz, H-3), 2.64 (1H, dd,  $J=15.1, 6.4$  Hz, H-20), 2.83 (1H, dd,  $J=15.1, 8.5$  Hz, H-20'), 3.71 (1H, m, H-19), 4.44 (1H, m, H-2), 5.44 (1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-7), 6.59 (1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-6), 12.36 (1H, s, OH-5). RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 9.2 (C-16), 13.9 (C-24), 16.2 (C-15), 20.7 (C-23), 28.1 (C-18), 28.3 (C-17), 30.5 (C-19), 35.5 (C-22), 38.6 (C-20), 44.2 (C-3), 76.0 (C-2), 78.1 (C-8), 101.2 (C-12), 102.5 (C-13), 108.7 (C-10), 115.6 (C-6), 125.6 (C-7), 157.3 (C-5), 159.8 (C-11, 14), 179.1 (C-21), 201.2 (C-4). EM-HR-FAB  $m/z$ : 389.1963 (Calculado

para  $C_{22}H_{29}O_6$ : 389.1965). EM-FAB  $m/z$ : 389 ( $M^{+1}$ ), 373, 329.  $[\alpha]^{25}_D +53^\circ$  ( $c=1.5$ ,  $CHCl_3$ ).

### 3.1.6 Ácido isopetálico

El ácido isoapetálico (**4**) fue obtenido como un aceite de color amarillo. El espectro de masas de alta resolución (EM-FAB) mostró el ión  $M^{+1}$  de  $m/z$ : 389.1963 (Calculado para  $C_{22}H_{29}O_6$ : 389.1965). Sus espectros de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C fueron similares a los previamente descritos para su isómero *cis*, el ácido apetálico. Empero, algunas señales observadas fueron diagnósticas para indicar que este isómero presentaba los metilos 15 y 16 con orientación *trans* y son similares a las reportadas por Shen Y. C., *et al.*, 2004. Las señales para el metilo en 15 y el hidrógeno en 2 se encontraron desplazadas +0.13 y -0.32 ppm respectivamente, en comparación con las del ácido apetálico. De igual forma, se mostraron desplazamientos de +0.06 y +0.01 ppm, para las señales del metilo en 16 y el H-3 (Figura 46). La constante de acoplamiento,  $J_{2-3}=10.2$  Hz indicó que estos protones presentan orientación *trans*. Finalmente el OH se observó en 12.46 ppm. Estos datos se encontraron acordes con la literatura (Shen Y. C., *et al.*, 2004).

Compuesto **4** (ácido isoapetálico), aceite amarillo.

RMN-<sup>1</sup>H ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.86 (3H, t,  $J=7.4$  Hz,  $CH_3$ -24), 1.17 (2H, m,  $CH_2$ -23), 1.19 (3H, dd,  $J=1.5, 7.0$  Hz,  $CH_3$ -16), 1.40 (3H, s,  $CH_3$ -17), 1.42 (3H, s,  $CH_3$ -18), 1.48 (3H, dd,  $J=1.2, 6.1$  Hz,  $CH_3$ -15), 1.55 (2H, m,  $CH_2$ -22), 2.52 (1H, cd,  $J=7.3, 10.2$  Hz, H-3), 2.7 (1H, dd,  $J=6.7, 8.5$  Hz, H-20), 2.83 (1H, dd,  $J=6.7, 8.5$  Hz, H-20'), 3.71 (1H, m, H-19), 4.12 (1H, m, H-2), 5.45 (1H, d,  $J=9.7$  Hz, H-7), 6.61 (1H, d,  $J=9.7$  Hz, H-6), 12.46 (1H, s, OH-5). RMN-<sup>13</sup>C ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 10.4 (C-16), 14.0 (C-24), 19.6 (C-15), 20.8 (C-23), 28.2 (C-18), 28.3 (C-17), 30.4 (C-19), 35.5 (C-22), 38.7 (C-20), 45.7 (C-3), 78.1 (C-8), 78.8 (C-2), 101.8 (C-12), 102.6 (C-13), 109.1 (C-10), 115.7 (C-6), 125.5 (C-7), 157.0, 157.1 (C-5, C-11), 159.8 (C-14), 199.3 (C-4). EM-HR-FAB  $m/z$ : 389.1963 (Calculado para  $C_{22}H_{29}O_6$ : 389.1965). EM-FAB  $m/z$ : 389 ( $M^{+1}$ ), 373, 329.  $[\alpha]^{25}_D -16.1^\circ$  ( $c=1.0$ ,  $CHCl_3$ ).

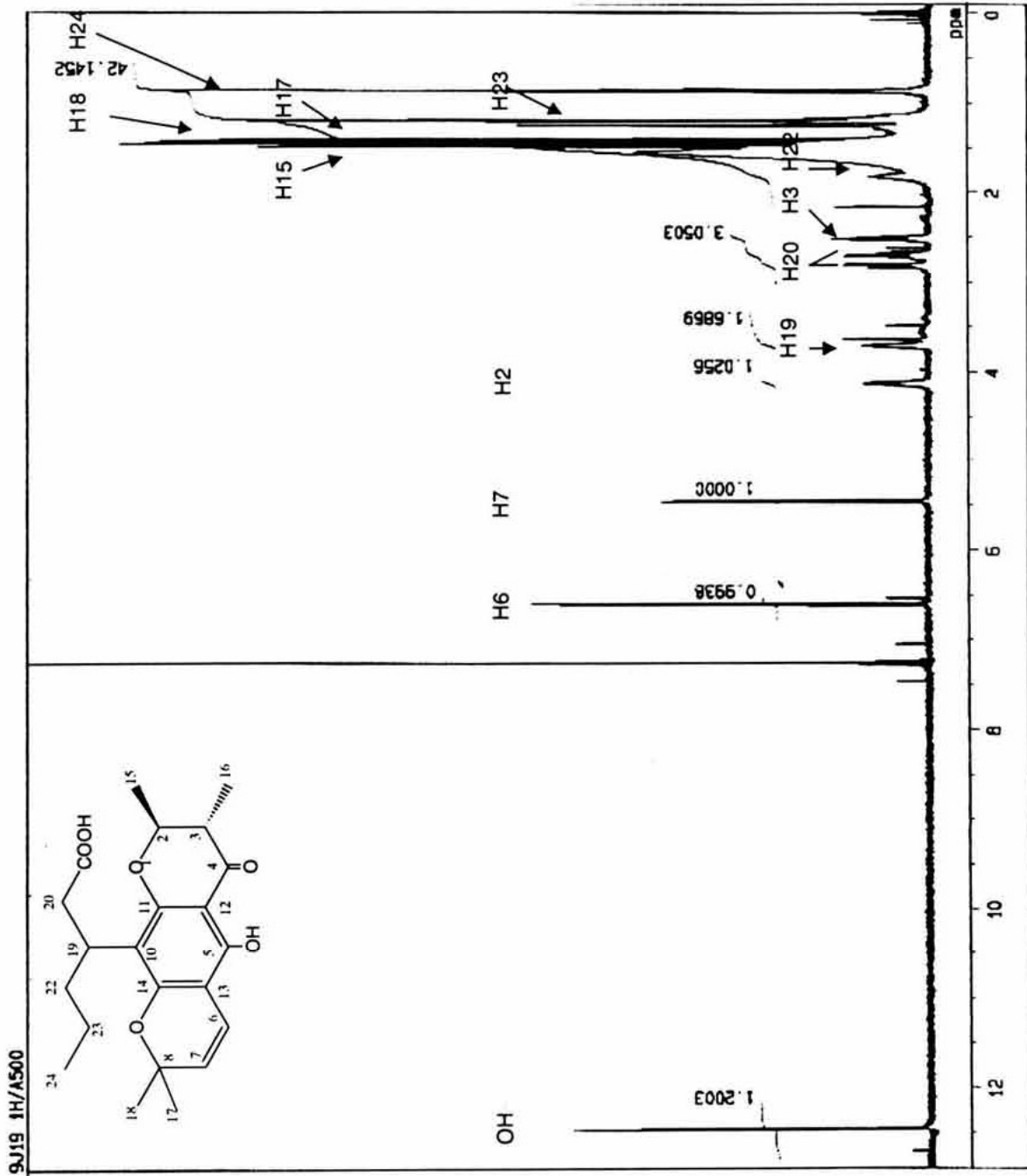


Figura 46. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido isoquetálico.

### 3.1.7 Isómero estructural del ácido isoapetálico

El isómero estructural del ácido isoapetálico (5) se aisló como un aceite de color amarillo. Su espectro de RMN<sup>1</sup>H permitió establecer diferencias en desplazamientos químicos respecto al ácido isoapetálico: el protón olefínico aparece desplazado a campo alto en 6.53 ppm para el H-11 y el OH que aparece en 12.70 ppm (Figura 47). Estos datos fueron similares a los previamente descritos para este compuesto (Samaraweera U., Sotheeswaran S., Sultanbawa M. U. S., 1983). A pesar de que el ión molecular presenta el mismo valor en los compuestos 3, 4 y 5, el patrón de fragmentación es diferente, siendo el pico base el fragmento de 271 *m/z*.

Compuesto 5 (isómero estructural del ácido isoapetálico), aceite amarillo. RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.86 (3H, t, *J*= 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-24), 1.14 (2H, m, CH<sub>2</sub>-23), 1.2 (3H, d, *J*= 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-16), 1.44 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 1.44 (3H, s, CH<sub>3</sub>-17), 1.49 (3H, d, *J*= 6.1 Hz, CH<sub>3</sub>-15), 1.88 (2H, m, CH<sub>2</sub>-22), 2.54 (1H, dc, *J*= 11, 7.0 Hz, H-3), 2.76 (1H, dd, *J*= 15.0, 7.0 Hz, H-20), 2.86 (1H, dd, *J*= 15.0, 8.0 Hz, H-20'), 3.74 (1H, m, H-19), 4.16 (1H, m, H-2), 5.45 (1H, d, *J*= 10.0 Hz, H-10), 6.53 (1H, d, *J*= 10.0 Hz, H-11), 12.70 (1H, s, OH-5). RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.1 (C-16), 14.0 (C-24), 19.6 (C-15), 20.9 (C-23), 28.2 (C-17), 28.3 (C-18), 30.3 (C-19), 35.3 (C-22), 45.7 (C-3), 78.0 (C-9), 78.8 (C-2), 101.0 (C-12), 101.6 (C-14), 115.8 (C-11), 125.7 (C-10), 155.1 (C-7, C-13), 198.7 (C-4). EM-IE *m/z*: 389 (M<sup>+</sup>+1), 373, 271. [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> -28° (*c*=1.0, CHCl<sub>3</sub>).



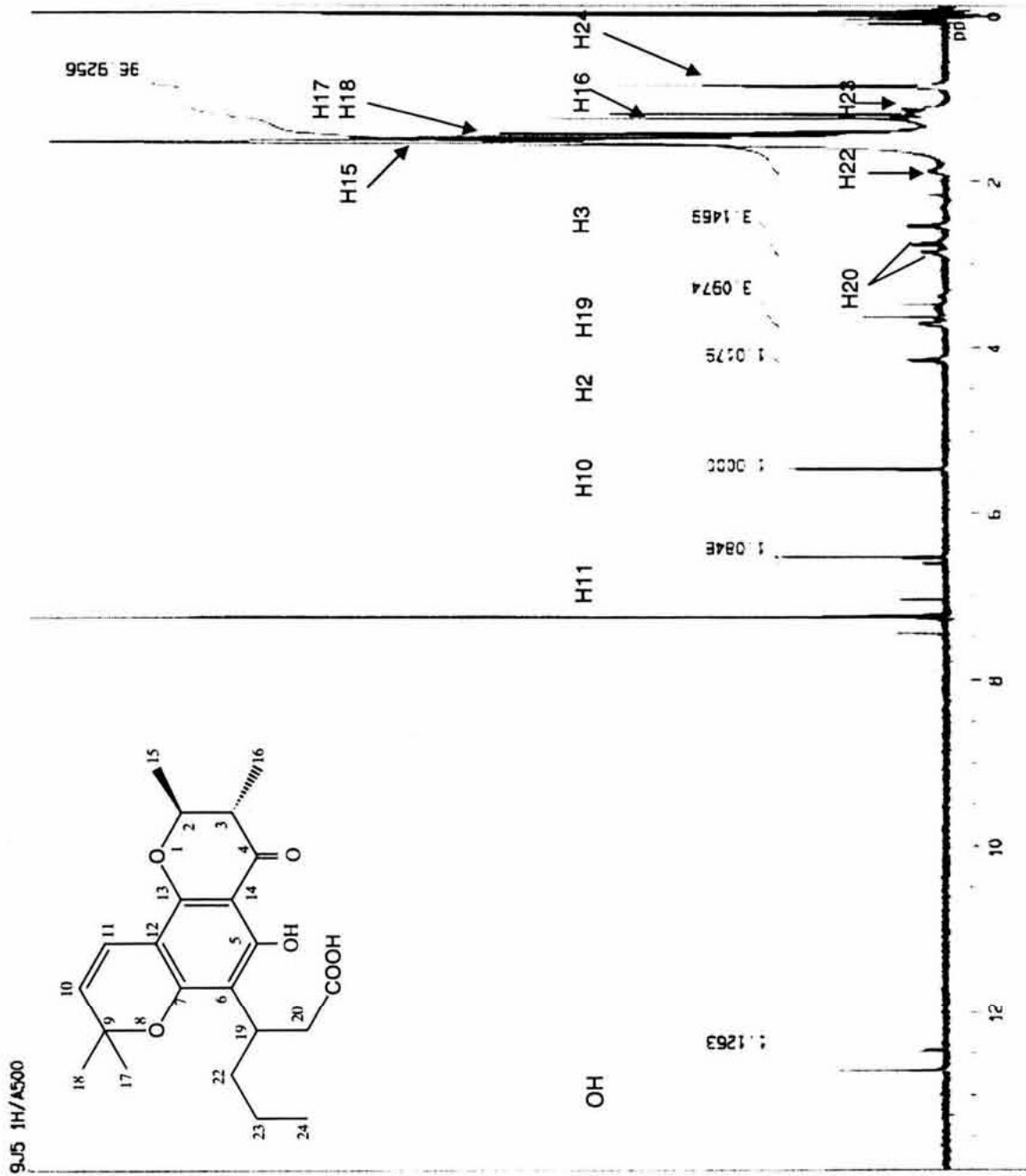


Figura 47. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del isómero estructural del ácido isoapetácico.

### **3.1.8 Friedelina, canofilol y amentoflavona**

Del extracto hexánico precipitó una mezcla de 2 triterpenos, los cuales fueron aislados e identificados como friedelina (**1**) y canofilol (**2**); mientras que de la fracción 2 del extracto acetónico precipitó un sólido de color amarillo que fue identificado como amentoflavona (**10**). Esta identificación se basó en la comparación de datos espectroscópicos y constantes físicas con los de muestras auténticas, así como por CCF. Estos compuestos también se obtuvieron de varias fracciones cromatográficas.

## VIII. DISCUSIÓN

En los últimos años, se han realizado diversos estudios que evalúan las propiedades anti VIH-1 de extractos de plantas, de las que han sido aislados metabolitos secundarios activos sobre blancos enzimáticos específicos del VIH-1 (Yang S. S., *et al.*, 2001; Cos P., *et al.*, 2004). Algunos de estos sondeos incluyen inhibición sobre TR y citotoxicidad, pero pocos involucran la inhibición de la replicación viral en sistemas celulares (Hnatyszyn O., *et al.*, 1999; Min B. S., *et al.*, 2001). El presente trabajo ofrece una evaluación de estos 3 parámetros para los extractos seleccionados.

Este estudio abarcó la totalidad de especies pertenecientes a la familia Clusiaceae que crecen en México. Doce especies (57.1%) mostraron inhibición de alta a moderada sobre la TR VIH-1, lo cual apoya la hipótesis de que la familia Clusiaceae es una fuente potencial de productos naturales con propiedades anti VIH (Fuller R. W., *et al.*, 1999a). En nuestro estudio, el extracto de *Calophyllum brasiliense* fue el mejor en los tres ensayos de actividad biológica. Otro extracto interesante fue *Clusia quadrangula*, que mostró alta actividad en los dos primeros ensayos.

Algunos autores consideran que para extractos de plantas, valores de  $IC_{50} \leq 50$   $\mu\text{g/ml}$  sobre TR VIH-1 pueden considerarse como potentes (El-Mekkawy S., *et al.*, 1995; Min B. S., *et al.*, 2001). Por lo tanto, el extracto hexánico de *Calophyllum brasiliense* ( $IC_{50} = 29.6$   $\mu\text{g/ml}$ ) y *Clusia quadrangula* ( $IC_{50} = 42$   $\mu\text{g/ml}$ ) están incluidos en esta categoría. Respecto de la inhibición de la replicación de VIH por extractos de plantas en un sistema celular, ha sido reportado que *Crinum asiaticum* var. *japonicum* (Amaryllidaceae) mostró alta actividad anti VIH con una  $ED_{50} = 12.5$   $\mu\text{g/ml}$  (Min B. S., *et al.*, 2001). En contraste, *Clusia quadrangula* requirió una concentración casi 10 veces mayor ( $ED_{50} = 124$   $\mu\text{g/ml}$ ), mientras que el extracto hexánico de *Calophyllum brasiliense* mostró una  $ED_{50} = 37.1$   $\mu\text{g/ml}$ , por lo cual aún

puede ser considerado como de inhibición significativa. En cuanto a citotoxicidad, ha sido indicado que una  $EC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$  sobre linfocitos, se considera como de baja citotoxicidad (Min B. S., *et al.*, 2001). En nuestro estudio, el extracto hexánico de *Calophyllum brasiliense* y el extracto de *Clusia quadrangula* presentaron un  $EC_{50} = 92.5 \mu\text{g/ml}$  y  $91 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente. En consecuencia, estos extractos pueden considerarse como medianamente tóxicos. Sin embargo los resultados globales sugirieron que el extracto hexánico de *Calophyllum brasiliense* posee alta actividad anti VIH y por lo tanto se realizó el fraccionamiento biodirigido para el aislamiento e identificación de los compuestos activos.

El análisis químico indicó que los compuestos minoritarios del extracto hexánico de las hojas de *Calophyllum brasiliense* fueron cuatro dipiranocumarinas, (+)-calanólido A, (-)-calanólido B, soulattrólido y (+)-calanólido C. Los tres primeros mostraron alta actividad inhibitoria sobre TR VIH-1, y el último inhibición moderada. Por otra parte, los compuestos mayoritarios fueron dos triterpenos, friedelina y canofilol, tres cromanonas, ácido apetalico, ácido isoapetalico y un isómero estructural del ácido isoapetalico. Estos compuestos fueron inactivos o mostraron baja inhibición sobre TR VIH-1.

Tanto el (+)-calanólido A como el (-)-calanólido B, son considerados como inhibidores no nucleósidos de TR VIH-1 (Kashman Y., *et al.*, 1992). La importancia del anillo D (10,11-dimetilcroman-12-ol) para las propiedades inhibitorias de los calanólidos, inophyllums y cordatólidos fue descrita previamente por McKee T. C. *et al.*, 1996 e Ishikawa T., Oku Y., Kotake K., 1997. La estereoquímica relativa de este anillo fue deducida con base en las constantes de acoplamiento ( $J$ ) entre los protones del anillo en los espectros de RMN<sup>1</sup>H (Ishikawa T., 2000) y la preparación de los ésteres de Mosher (Kashman Y., *et al.*, 2004).

El espectro de RMN<sup>1</sup>H del (+)-calanólido A presenta una constante de acoplamiento entre H-10 y H-11 que fue de  $J = 9.1 \text{ Hz}$ , lo cual permitió el establecimiento de H-10 como  $\alpha$  axial, mientras que los protones H-11 y H-12 acoplados, mostraron una  $J = 7.6 \text{ Hz}$ , lo cual revela que estos dos protones poseen



una orientación *trans* diaxial (Kashman Y., *et al.*, 1992). Con ello, se estableció que el anillo D del (+)-calanólido A presenta una estereoquímica 10,11-*trans*-11,12-*trans* (Tabla 10).

El (-)-calanólido B es un estereoisómero del (+)-calanólido A, el primero, mostró una  $J=10.6$  Hz entre los protones H-10 y H-11 y  $J=3.6$  Hz entre H-11 y H-12, es decir una estereoquímica 10,11-*trans*-11,12-*cis* (Tabla 10). El soulattrólido, que es una cumarina del tipo de los inophyllum (con un grupo fenilo en C-4), presentó esta misma configuración 10,11-*trans*-11,12-*cis*, deducida de  $J_{10,11}=10.9$  Hz y  $J_{11,12}=3.3$  Hz (Tabla 10). Las constantes de acoplamiento registradas fueron similares a los reportados por otros autores previamente (Gunasekera S. *et al.*, 1977; Kashman Y., *et al.*, 1992).

**Tabla 10.** Comparación del anillo D (10,11-dimetilcroman-12-ol) de las dipiranocumarinas con actividades inhibitorias sobre TR VIH-1 aisladas de las hojas de *C. brasiliense*.

Configuración	Calanólidos	Inophyllums	J (Hz)	
			Datos observados	Datos reportados
10,11- <i>trans</i> -11,12- <i>trans</i> (10 $\beta$ -CH <sub>3</sub> , 11 $\alpha$ -CH <sub>3</sub> , 12 $\beta$ -OH)	(+)-Calanólido A (10R, 11S, 12S) <sup>a)</sup>	-	H <sub>10-11</sub> = 9.1 H <sub>11-12</sub> = 7.6	H <sub>10-11</sub> = 9.0 <sup>a)</sup> H <sub>11-12</sub> = 8 <sup>a)</sup>
10,11- <i>trans</i> -11,12- <i>cis</i> (10 $\beta$ -CH <sub>3</sub> , 11 $\alpha$ -CH <sub>3</sub> , 12 $\alpha$ -OH)	(-)-Calanólido B (10S, 11R, 12S) <sup>a)</sup>	-	H <sub>10-11</sub> = 10.6 H <sub>11-12</sub> = 3.6	H <sub>10-11</sub> = 10.5 <sup>a)</sup> H <sub>11-12</sub> = 3.5 <sup>a)</sup>
10,11- <i>cis</i> -11,12- <i>cis</i> (10 $\beta$ -CH <sub>3</sub> , 11 $\beta$ -CH <sub>3</sub> , 12 $\beta$ -OH)	(+)-Calanólido C (10R, 11S, 12R) <sup>a)</sup>	-	H <sub>10-11</sub> = 3.3 H <sub>11-12</sub> = 5.1	H <sub>10-11</sub> = 2.5 <sup>a)</sup> H <sub>11-12</sub> = 6.0 <sup>a)</sup>
10,11- <i>trans</i> -11,12- <i>cis</i> (10 $\alpha$ -CH <sub>3</sub> , 11 $\beta$ -CH <sub>3</sub> , 12 $\beta$ -OH)	-	Soulattrólido (10S, 11R, 12S)	H <sub>10-11</sub> = 10.9 H <sub>11-12</sub> = 3.3	H <sub>10-11</sub> = 7.2 <sup>b)</sup> H <sub>11-12</sub> = 3.2 <sup>b)</sup>

<sup>a)</sup> Kashman Y., *et al.*, 1992; <sup>b)</sup> Gunasekera S., *et al.*, 1977; <sup>c)</sup> Ishikawa T., 2000.

En cuanto al (+)-calanólido C, en la corrección realizada por McKee *et al.*, 1995, se indica que la estereoquímica del anillo D es la misma reportada

originalmente para el pseudocalanólido C. Sin embargo, las constantes de acoplamiento entre H-10 y H-11, así como entre H-11 y H-12 no son claras en nuestro espectro, pues H-11 aparece como una señal múltiple. A pesar de esto, las  $J_{10,11} = 3.3$  Hz y  $J_{11,12} = 5.1$  Hz observadas en nuestros espectros, están acordes con la literatura y pueden interpretarse como *cis* en ambos casos; es decir, que el anillo D del (+)-calanólido C exhibe una configuración 10,11-*cis*-11,12-*cis* (Tabla 10).

La actividad inhibitoria más alta de TR VIH-1 ha sido observada en el (+)-calanólido A que presenta una configuración *trans* entre los grupos metilo en C-10 y C-11, mientras que las otras configuraciones presentan una reducción en potencia. Una función oxigenada en C-12 y en particular un grupo hidroxilo (Galiniš D. K., *et al.*, 1996), así como los sustituyentes en C-4 son también relevantes para la actividad inhibitoria sobre TR VIH-1. En este último caso, la potencia de la actividad anti TR VIH sigue la serie propilo>fenilo>metilo (Ishikawa T., 2000). Por estas razones, posiblemente el compuesto 8 a pesar del mostrar el farmacóforo anillo D y un grupo propilo en C-4, no mostró inhibición potente sobre TR VIH-1. Nuestros resultados concuerdan con las relaciones de estructura-actividad (SAR) propuestas para las dipiranocumarinas aisladas de *Calophyllum* (Kashman Y., *et al.*, 1992; Flavin M. T., *et al.*, 1996; Ishikawa T., 2000).

Respecto al extracto acetónico de *C. brasiliense*, éste presentó un efecto inhibitorio sobre TR VIH-1, pero fue citotóxico a linfocitos humanos MT2. La primera de estas actividades, fue debida propiamente a la presencia de calanólidos. Mientras que el biflavonoide, amentoflavona, el cual careció de actividad inhibitoria sobre TR VIH-1, fue citotóxica a linfocitos MT2 ( $<2.0 \times 10^5$  células) y posiblemente es el responsable de la toxicidad observada en el extracto total.

En cuanto al extracto metanólico, es conocido que los extractos polares pueden contener taninos y otros compuestos polifenólicos capaces de

inhibir la TR de VIH-1 (Nishizawa M., *et al.*, 1989; Tan G. T., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D., 1991), la ADN polimerasa (Nakane H., Fukushima M., Ono K., 1990), ADN topoisomerasa I y II (Kashiwada Y., *et al.*, 1993) y la unión de la gp120 de VIH-1 con el receptor CD4<sup>+</sup> de la célula hospedera (Tan G. T., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D., 1991; Collins R. A., *et al.*, 1997). Dado que los taninos han mostrado alta actividad por proteínas y afectan varias reacciones bioquímicas, son considerados generalmente como inhibidores no selectivos (Au T. K., 2001). En nuestro caso, el extracto de metanol de las hojas de *C. brasiliense* mostró inhibición sobre la TR VIH-1, dicha actividad puede ser atribuida a los taninos. Los extractos de *Clusia quadrangula* y *Vismia mexicana* fueron similares en sus comportamientos contra TR VIH-1 respecto del extracto metanólico de *C. brasiliense*, es decir, que después de retirar los taninos de las fracciones polares, éstas perdieron su actividad. Las actividades inhibitorias observadas inicialmente, pudieron deberse a la presencia de taninos.

Como se mencionó con anterioridad, los compuestos mayoritarios aislados del extracto hexánico de *C. brasiliense* fueron, ácido apetalico, ácido isoapetalico y un isómero estructural del ácido isoapetalico, así como friedelina y canofilol. El aislamiento de estas cromononas ha sido reportado previamente de *Calophyllum* principalmente de la corteza y semillas de especies asiáticas. El ácido apetalico fue aislado de la corteza de *C. apetalum* por Govindachari T. R., Prakash D., Viswanathan N., en 1968. Posteriormente, el éster metílico de este compuesto fue preparado a partir del producto natural aislado de las semillas de *C. chapelieri* y *C. brasiliense* (Guerreiro E., Kunesch G., Polonsky J., 1971; Plattner R. D., *et al.*, 1974). Recientemente también se reportó la presencia de ácido apetalico de las semillas de *C. blancoi* (Shen Y. C., *et al.*, 2004). Mientras que el éster metílico del ácido isoapetalico fue preparado con el extracto de las semillas de *C. chapelieri* y *C. brasiliense* (Guerreiro E., Kunesch G., Polonsky J., 1971; Plattner R. D., *et al.*, 1974) y la corteza de *C. bractetaum*, *C. calaba*, *C. moonii* y *C. trapezifolium* (Samaraweera U., Sotheeswaran S., Sultanbawa M. U. S., 1983). Al igual que su isómero, el ácido

apetálico, recientemente se obtuvo de las semillas de *C. blancoi* (Shen Y. C., *et al.*, 2004). El aislamiento del isómero estructural (5) fue reportado por Samaraweera U., Sotheeswaran S., Sultanbawa M. U. S., en 1983. Se obtuvo de la corteza de *C. bracteatum*, *C. calaba*, *C. moonii* y *C. trapezifolium*. El presente trabajo es el primer reporte del aislamiento de las cromanonas 3, 4 y 5 de las hojas de *C. brasiliense*, así como de la evaluación de las propiedades anti VIH.

En el caso de las dipiranocumarinas, (+)-calanólido A, (-)-calanólido B, (+)-calanólido C y soulattrólido, éstas han sido previamente aislados de los frutos, brotes (Kashman Y., *et al.*, 1992), corteza (Gunasekera S. P., *et al.*, 1977) y látex (Pengsuparp T., *et al.*, 1996) de diferentes especies asiáticas de *Calophyllum*. Recientemente, los compuestos (+)-calanólido A y (-)-calanólido B fueron aislados de la corteza de *C. brasiliense* colectado en Brasil (Ito C., *et al.*, 2003c), sin embargo, esta es la primera vez que estas dipiranocumarinas son encontradas en las hojas. Curiosamente, esta especie fue omitida en estudios previos de evaluación de propiedades anti VIH llevados a cabo por McKee *et al.*, 1998. Estos autores realizaron un estudio quimitaxonómico de especies de *Calophyllum* colectadas principalmente en Malasia (Asia), con la finalidad de buscar dipiranocumarinas con propiedades anti TR VIH. Su método incluyó un sondeo por CCF para la detección de dipiranocumarinas mediante una mancha azul característica, utilizando (-)-calanólido B y soulattrólido como muestras de referencia y vainillina- $H_2SO_4$  como revelador. Los extractos positivos fueron posteriormente sometidos a cromatografía, pero *C. brasiliense* no fue incluido por la ausencia de dipiranocumarinas en CCF. Dicha omisión puede deberse a la existencia de 2 quimiotipos de *C. brasiliense* en México. Uno de ellos, colectado en la Sierra de Santa Martha, Veracruz presenta como constituyentes mayoritarios cumarinas del tipo de las mammeas (Reyes-Chilpa R., *et al.*, 2004). Estas ocho cumarinas (Figura 6) han sido previamente reportadas para las semillas de *Mammea americana* y *M. africana* (Crombie L., Games D. E., 1966; Crombie L., Jones R. C. F., Palmer C. J., 1985; Carpenter I., McGarry E. J., Scheinmann F., 1970), así como *Mesua racemosa*



(Morel C., *et al.*, 1999), todas ellas especies pertenecientes a la misma familia Clusiaceae. El otro quimiotipo, fue tratado en el presente estudio y presenta como compuestos mayoritarios, cromanonas, así como dipiranocumarinas activas contra TR VIH-1. Las cumarinas del tipo de las mammeas encontradas en el primer quimiotipo fueron inactivas contra TR VIH-1. Ello puede deberse a que estas sustancias no contienen el anillo D (10,11-dimetilcroman-12-ol).

Las dipiranocumarinas tetracíclicas calanólidos A y C, inophyllum A, C, D y E (Ito C., *et al.*, 2003), así como las ocho cumarinas del tipo de las mammeas antes descritas (Reyes-Chilpa R., *et al.*, 2004) (Figura 6) fueron aisladas de la misma especie, *C. brasiliense* de distribución Neotropical. El hecho de que en nuestro país sea reconocida solo una especie de *Calophyllum*, *C. brasiliense* (Pennington T. D., Sarukhán J., 1998), pudiera ser producto de la falta de un estudio taxonómico a fondo, que agotara primeramente las características estrictamente morfológicas de la especie. Nuestros resultados, que indican la presencia de dos quimiotipos, han sido basados en los metabolitos secundarios presentes en las hojas. Estudios de histología, genética, ecología y evolución pudieran ser herramientas que ofrecieran la información necesaria para resolver la situación de este género y en particular de la especie en México y quizás también, podría ser punto de referencia con otras especies del Continente Americano, como las que crecen en Brasil. Finalmente, se podría compararlas con las especies de distribución en Asia, lugar que ha sido considerado como el centro de diversificación del género (Hammel B. E., 1986; Kearns D. M., *et al.*, 1998). En particular, las cumarinas del tipo de las mammeas han sido descritas solamente en 2 especies del género *Calophyllum* (Reyes-Chilpa R., *et al.*, 2004). Estas cumarinas del tipo de las mammeas que presentan un sustituyente acilo saturado en C-6 ó C-8 son importantes en quimiotaxonomía dado que representan un pequeño grupo de especies de *Calophyllum* compuesto por *C. dispar* y ahora *C. brasiliense* y con los géneros *Mammea* y *Mesua*, todos ellos incluidos en la subfamilia Calophylloideae, una subfamilia de Clusiaceae (Guilet D., *et al.*, 2001).

Entre los calanólidos e inophyllum aislados en el presente trabajo, destaca el (+)-calanólido A dadas sus características como ITRNN que ya se han discutido con anterioridad. En este estudio se destaca el hecho de que estas sustancias han sido obtenidas de la hojas de *C. brasiliense*. Estos órganos vegetales son considerados modulares y para su obtención no es necesario sacrificar al organismo. Esto es, que podría proponerse un modelo de cultivo vegetal con la finalidad de explotar este recurso como fuente de fármacos antiretrovirales a partir de un recurso natural nacional. Sin embargo, una limitante es el bajo rendimiento del (+)-calanólido A (<1mg/gr de extracto). Este valor coincide con el rendimiento reportado para la especie asiática *C. lanigerum* var. *austrocoriaceum* (Cardellina, J. H., *et al.*, 1995).

Por otra parte, el presente trabajo busca también ofrecer información sobre una alternativa al creciente problema de SIDA en México, pues como ya se mencionó anteriormente, el SIDA afecta mayoritariamente en nuestro país a la población en edad productiva de ambos sexos (79.1% de los casos corresponden al grupo de 15-44 años). Adicionalmente, el alto costo de los medicamentos de acuerdo con el régimen propuesto por la OMS (Organización Mundial de la Salud) en el año 2000, costaba para un paciente entre 10, 000 y 12, 000 dólares (E. E. U. U.) en el mercado mundial, lo cual representaba restricciones en el acceso a la terapia antiretroviral para la mayoría de los pacientes. Dada la competencia de los fármacos genéricos y los precios diferenciales de algunas compañías farmacéuticas, la ADPIC (Consejo de los Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual de la Organización Mundial de Comercio) puso en práctica medidas que ofrecen una solución a este problema, reduciendo el precio del tratamiento para cubrir exclusivamente los costos de fabricación y distribución. Esto se llevó a cabo recientemente en una serie de países gravemente afectados por la crisis (entre los que se considera México) donde los precios de las combinaciones más usadas bajaron a 600 y hasta 300 dólares (E. E. U. U.) por persona por año (Moore M.,

2001). Aún con estas medidas, en México, los fármacos que integran los esquemas contemplados tienen un costo mensual (precios de gobierno) que fluctúa entre los 3000 y 4500 pesos, y cuyo promedio anual es de 6000 dólares (E. E. U. U.) (Secretaría de Salud, México, 2004), pero siguen estando por encima de los ingresos anuales por habitante (Moore M., 2001). Ello tiene graves repercusiones en el bienestar económico de miles de familias.

Según la Secretaría de Salud (2004) en México, al igual que en otros países, el SIDA se ha convertido en un problema de salud pública complejo, con múltiples repercusiones psicológicas, sociales, éticas, económicas y políticas que rebasan el ámbito de la salud, por lo que es clara la necesidad de la participación de diversos sectores de la sociedad y la coordinación entre las instituciones, sectores y país para poder combatirla.

## IX. CONCLUSIONES

- Cinco de las 21 especies de Clusiaceae estudiadas presentan un alto porcentaje de inhibición sobre la TR VIH-1 ( $\geq 70\%$ ), mientras que 2 especies presentan un porcentaje moderado de inhibición ( $< 68\%$  pero  $> 64\%$ ).
- Doce especies (57.1%) mostraron alta o moderada actividad inhibitoria sobre la TR VIH-1, lo cual apoya la propuesta de que la familia Clusiaceae podría ser una fuente de productos naturales con actividad anti VIH.
- Los extractos con mayor actividad inhibitoria sobre TR VIH-1 fueron los extractos hexánico, acetónico y metanólico de *Calophyllum brasiliense*, colectado en Los Tuxtlas, Veracruz.
- Los compuestos mayoritarios en el extracto hexánico de *C. brasiliense* son triterpenos (friedelina y canofilol) y cromanonas (ác. apetalico, ácido isoapetalico y un isómero estructural del ácido isoapetalico). Los compuestos minoritarios son dipiranocumarinas del tipo de los calanólidos (calanólido A, B y C), e inophyllum (soulattrólido) y han sido identificados como los compuestos activos contra TR VIH-1.
- El extracto acetónico de *C. brasiliense* contiene un compuesto del tipo de los biflavonoides (amentoflavona). Este compuesto podría ser el responsable de la actividad tóxica del extracto total a las células MT2. El extracto acetónico contiene trazas de calanólidos y quizás a ello debe su actividad inhibitoria sobre la TR VIH-1.



- El extracto metanólico de *C. brasiliense* debe su actividad inhibitoria sobre TR VIH-1 principalmente a los taninos.
- Los extractos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *Vismia mexicana* y *Clusia quadrangula* deben su actividad inhibitoria sobre TR VIH-1 principalmente a taninos.

## X. PERSPECTIVAS

- Evaluar los posibles efectos inhibitorios de las piranocumarinas aisladas, sobre microorganismos causantes de infecciones oportunistas asociadas a SIDA.
- Proponer un modelo económico de explotación redituable y sustentable de las hojas de *Calophyllum brasiliense* como fuente de fármacos antiretrovirales a partir de un recurso natural nacional.
- Analizar otros órganos de *Calophyllum brasiliense* como posible fuente de nuevas piranocumarinas con actividad anti TR VIH-1.
- Realizar un estudio taxonómico, ecológico y genético del género *Calophyllum* en México.
- Proponer un plan de conservación de *Calophyllum brasiliense* como fuente de antiretrovirales.
- Evaluar las posibles propiedades inhibitorias de las piranocumarinas sobre otros blancos de VIH.
- Realizar un estudio de las cepas de VIH circulantes en México y evaluar si presentan diferente sensibilidad a las piranocumarinas estudiadas.

## XI. REFERENCIAS

Abe F. Nagafuji S., Okabe H., Higo H., Akahane H. Trypanocidal constituents in plants 2. Xanthonones from the stem bark of *Garcinia subelliptica*. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1730-1733 (2003).

Abe F. Nagafuji S., Okabe H., Akahane H., Estrada-Muñiz E., Huerta-Reyes M., Reyes-Chilpa R. Trypanocidal constituents in plants. 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 141-143 (2004).

Arnold E., Jacobo-Molina A., Nanni R. G., Williams R. L., Lu X., Ding J., Clark A. D. Jr. Zhang A., Ferris A. L., Clark P., Hizi A., Hughes S. H. Structure of HIV-1 reverse/transcriptase/DNA complex at 7 Å resolution showing active site locations. *Nature* 357, 85-89 (1992).

Au, T. K., Lam T. L., Ng T. B., Fong W. P., Wan D. C. C. A comparison of HIV-1 integrase inhibition by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci.* 68, 1687-1694 (2001).

Banskota A. H., Tezuka Y., Prasain J. K., Matsushige K., Kadota S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* 61, 896-900 (1998).

Barré-Sinoussi F., Cherman J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vézinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871 (1983).

Berman P. W., Nunes W. M., Haffar O. K. Expression of membrane-associated and secreted variants of gp160 of human immunodeficiency virus type in vitro and in continuous cell lines. *J. Virol.* 62, 3135-3142 (1988).

Bilia A. R., Yusuf A. W., Braca A., Keita A., Morelli I. New prenylated anthraquinones and xanthonones from *Vismia guineensis*. *J. Nat. Prod.* 63, 16-21 (2000).

Cardellina J. H. II, Bokesch H. R., McKee T. C., Boyd M. R. Resolution & comparative anti-HIV evaluation of the enantiomers of calanolides A and B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 1011-1014 (1995).

Carpenter I., McGarry E. J., Scheinmann F. The neoflavonoids and 4-alkylcoumarins from *Mammea africana* G. Don. *Tetrahedron lett.* 11, 3983-3986 (1970).

Chen S. X., Wan M., Loh B. N. Active constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Med.* 62, 381-382 (1996).

Chiang Y. M., Kuo Y. H., Oota S., Fukuyama Y. Xanthonenes and benzophenones from the stems of *Garcinia multiflora*. *J. Nat. Prod.* 66, 1070-1073 (2003).

Christian O. E., Henry G. E., Jacobs H., McLean S., Reynolds W. F. Prenylated benzophenones derivatives from *Clusia havetiodes* var. *stenocarpa*. *J. Nat. Prod.* 64, 23-25 (2001).

Coffin J., Haase A., Levy J. A., Montagnier L., Oroszlan S., Teich N., Temin H., Toyoshima K., Varmus H., Vogt P., Weiss R. Human Immunodeficiency Viruses. *Science* 232, 697 (1986).

Coffin J. M. HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267, 483-489 (1995).

Collins R. A., Ng T. B., Fong W. P., Wan C. C., Yeung H. W. A comparison of Human Immunodeficiency Virus type 1 inhibition by partially purified aqueous extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci.* 60, 345-351 (1997).

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

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

Creagh T., Ruckle J. L., Tolbert D. T., Giltner J., Eiznhamer D. A., Dutta B., Flavin M. T., Xu Z. Q. Safety and pharmacokinetics of single doses of (+)-calanolide A, a novel, naturally occurring nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy, human immunodeficiency virus-negative human subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1379-1386 (2001).

Crombie L., Games D. E. Isolation and structure of mammea A/BA, A/AB and A/BB: a group of 4-aryl-coumarin extractives of *Mammea americana* L. *Tetrahedron lett.* 7, 145-149 (1966).



Crombie L., Jones R. C. F., Palmer C. J. Synthesis of mammeins and surangin A. *Tetrahedron lett.* 26, 2929-2932 (1985).

da Silva K. L., dos Santos A. R., Mattos P. E., Yunes R. A., Delle-Monache F., Cechinel-Filho V. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Therapie* 56, 431-434 (2001).

Dalgleish A. G., Beverly P. C., Clapham P. R., Crawford D. H., Greaves M. F., Weiss R. A. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763-767 (1984).

De Clercq E. Anti-HIV agents interfering with the initial stages of the HIV replicative cycle. En: Morrow W. J. W. y Haigwood N. L. (Eds.). HIV. Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment. 1993. Elsevier. The Netherlands. 386 pp.

De Clercq E. Perspectives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Il Farmaco* 54, 26-45 (1999).

De Clercq E. Reverse transcriptase inhibitors as anti-HIV Drugs. En: Unger R. E., Kreuter J., Rübsamen-Waigmann H. (Eds.). Antivirals Against AIDS. Cap. 4. 2000. Marcel Dekker, Inc., N. Y., U. S . A. pp 107-150.

Debyser Z., De Vreese K., Pauwels R., Yamamoto N., Anné J., De Clercq E., Desmyter J. Differential inhibitory effects of TIBO derivatives on different strains of simian immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* 73, 1799-1804 (1992).

Delle Monache F., Gács-Baitz E. Two polyisoprenylated ketones from *Clusia nemorosa*. *Phytochemistry* 30, 703-705 (1991a).

Delle Monache F., Gács-Baitz E. Prenylated benzophenones from *Clusia sandiense*. *Phytochemistry* 30, 2003-2005 (1991b).

Dharmaratne H. R. W., Wanigasekera W. M. A., Mata-Greenwood E., Pezzuto J. M. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase activity by Cordatolides isolated from *Calophyllum cordato-oblongum*. *Planta Med.* 64, 460-461 (1998).

Ee G. C., Ng K. N., Taufiq-Yap Y. H., Rahmani M., Ali A. M., Muse R. Mucigerin, a new coumarin from *Calophyllum mucogerum* (Guttiferae). *Nat. Prod. Res.* 18, 123-128 (2004).

El-Mekawy S., Meselhy M. R., Kusumoto I. T., Kadota S., Hattori M., Namba T. Inhibitory effects of Egyptian folk medicines on human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase. *Chem. Pharm. Bull.* 43, 641–648 (1995).

Estrada Muñiz E. Coumarinas y xantonas de *Calophyllum brasiliense*. Evaluación de su actividad antiviral, citotóxica y antibacteriana. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental). Facultad de Ciencias, UNAM. 2001. 66 pp.

Esnouf R., Ren J., Ross C., Jones Y., Stammers D., Stuart D. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat. Struct. Biol.* 2, 303-308 (1995).

Evans L. A., Levy J. A. The heterogeneity and pathogenicity of HIV. En: Morrow W. J. W. y Haigwood N. L. (Eds.). HIV. Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment. 1993. Elsevier. The Netherlands. 386 pp.

Fauci A. S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384, 529-533 (1996).

Flavin M. T., Rizzo J. D., Khilevich A., Kucherenko A., Sheinkam A. K., Vilaychack V., Lin L., Chen W., Greenwood E. M., Pengsuparp T., Pezzuto J. M., Hughes S. H., Flavin T. M., Cibulski M., Boulanger W. A., Shones R. L., Xu Z, Q. Synthesis, chromatographic resolution, and anti-human immunodeficiency virus activity of (±)-calanolide A and its enantiomers. *J. Med. Chem.* 39, 1303–1313 (1996).

Flint S. J., Enquist L. W., Krug R. M., Racaniello V. R., Skalka A. M. Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. 2000. ASM Press. Washington, U. S. A. 804 pp.

Francois G., Steenackers T., Assi L. A., Steglich W., Lamottke K., Holenz J., Bringmann G. Vismione H and structurally related anthranoid compounds of natural and synthetic origin as promising drugs against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structure-activity relationships. *Parasitol. Res.* 85, 582-588 (1999).

Freed E. O., Martin M. A. HIVs and Their Replication. En: Knipe D. M., Howley P. M. Fields Virology. 2001. Vol. 2. 4ta. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, U. S. A. 1971-2041.

Fuller R. W., Westergaard C. K., Collins J. W., Cardellina J. H. II, Boyd M. R. Vismiaphenones D-G, new prenylated benzophenones from *Vismia cayennensis*. *J. Nat. Prod.* 62, 67–69 (1999a).

Fuller R. W., Blunt J. W., Boswell J. L., Cardellina J. H. II, Boyd M. R. Guttiferone F, the first prenylated benzophenone from *Allanblackia sthulmannii*. *J. Nat. Prod.* 62, 130-132 (1999b).

Galiniš D. L., Fuller R. W., McKee T. C., Cardellina J. H. II, Gulankowski R. J., McMahon J. B., Boyd M. R. Structure-Activity modifications of the HIV-1 inhibitors (+)-Calanolide A and (-)-Calanolide B. *J. Med. Chem.* 39, 4507–4510 (1996).

García Barriga H. Flora medicinal de Colombia. Tomo II. 2da. Ed. Tercer Mundo Editores. Bogotá. 535 pp. 1992.

Garg R., Gupta S. P., Gao H., Babu M. S., Debnath A. K., Hansch C. Comparative quantitative structure-activity relationship studies on anti-HIV drugs. *Chem. Rev.* 99, 3525-3601 (1999).

Goff S. P. Retroviridae: the Retroviruses and their replication. En: Knipe D. M., Howley P. M. Fields Virology. 2001. Vol. 2. 4ta. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, U. S. A. 1987-1939.

González J. G., Martínez E., Delle Monache F. Citrans and cyclols from *Clusia multiflora*. *Phytochemistry* 38, 485-489 (1995).

Gottlieb M. S., Schroff R., Schanker H. M., Weisman J. D., Fan P. T., Wolf R. A., Saxon A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305, 1425-1431(1981).

Govindachari T. R., Prakash D., Viswanathan N. Structure of apetalic acid. *Tetrahedron* 24, 6411-6415 (1968).

Guaraldi G., Murri R., Orlando G., Orlandi E., Sterrantino G., Borderi M., Grosso C., Cattelan A. M., Nardini G., Beghetto B., Antinori A., Esposito R., Wu A. W. Morphologic alterations in HIV-infected people with lipodystrophy are associated with good adherence to HAART. *HIV Clin. Trials.* 4, 99-106 (2003).

Guerreiro E., Kunesch G., Polonsky J. Constituents of the seeds of *Calophyllum chapelieri* (Guttiferae). *Phytochemistry* 10, 2139-2145 (1971).

Guilet D., Séraphin D., Rondeau D., Richomme P., Bruneton J. Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*. *Phytochemistry* 58, 571-575 (2001).

Gunasekera S. P., Jayatilake G. S., Selliah S. S., Sultanbawa M. U. S. Chemical Investigation of Ceylonese plants. Part 27. Extractives of *Calophyllum cuneifolium* Thw. and *Calophyllum soulattri* Burm. f. (Guttiferae). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*. 1505-1511 (1977).

Gustafson K. R., Blunt J. W., Munro M. H. G., Fuller R. W., McKee T. C., Cardellina J. H. II, McMahon J. B., Cragg G. M., Boyd M. R. The Guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron* 48, 10093-10102 (1992).

Guyader M., Emerman M., Sonigo P., Clavel F., Montagnier L., Alizon M. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326, 662-669 (1987).

Hammel B. E. New species of Clusiaceae from Central America with notes on *Clusia* and synonymy in the tribe *Clusiaceae*. *Selbyana* 9, 112-120 (1986).

Hao Z., Cooney D. A., Farquhar D., Perno C. F., Zhang K., Masood R., Wilson Y., Hartman N. R., Balzarini J., Johns D. G. Potent DNA chain termination activity and selective inhibition of human immunodeficiency virus reverse transcriptase by 2', 3'-dideoxyuridine-5'-triphosphate. *Mol. Pharmacol.* 37, 157-163 (1990).

Heywood, V. Flowering Plants of the World. 1993. Andromeda Oxford Limited. Oxfordshire. U. K. 335 pp.

Hnatyszyn O., Broussalis A., Herrera G., Muschietti L., Coussio J., Martino V., Ferraro G., Font M., Monge A., Martínez-Irujo J. J., Sanromán M., Cuevas M. T., Santiago E., Lasarte J. J. Argentine plant extracts active against polymerase and ribonuclease H activities of HIV-1 reverse transcriptase. *Phytother. Res.* 13, 206-209 (1999).

Ho C. K., Huang Y. L., Chen C. C. Garcinona E, a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines. *Planta Med.* 68, 975-979 (2002).

Hu W. S., Temin H. M. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 250, 1227-1233 (1990).



Huang T. B., Fong W. P., Yeung H. W. Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sci.* 61, 933-949 (1997).

Hussein A. A., Bozzi B., Correa M., Capson T. L., Kursar T. A., Coley P. D., Solis P. N., Gupta M. P. Bioactive constituents from three *Vismia* species. *J. Nat. Prod.* 66, 858-860 (2003).

Ishikawa T., Oku Y., Kotake K. Diastereoselective preparation of a *trans, trans* 2,3-dimethylchroman-4-ol skeleton: a model synthetic approach to anti-HIV-1 active *Calophyllum* coumarins. *Tetrahedron* 53, 14915-14928 (1997).

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

Ito C., Itoigawa M., Miyamoto Y., Rao K. S., Takayasu J., Okuda Y., Mukainaka T., Tozuda H., Nishino H., Furukawa H. A new biflavonoid from *Calophyllum paniculatum* with antitumor-promoting activity. *J. Nat. Prod.* 62, 1668-1671 (1999).

Ito C., Itoigawa M., Mishina Y., Cechinel V., Mukainaka T., Tozuda H., Nishino H., Furukawa H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*: structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. *J. Nat. Prod.* 65, 267-272 (2002).

Ito C., Itoigawa M., Takakura T., Ruangrungsi N., Enjo F., Tokuda H., Nishino H., Furukawa H. Chemical constituents of *Garcinia fusca*: structure elucidation of eighth new xanthenes and their cancer chemopreventive activities. *J. Nat. Prod.* 66, 200-205 (2003a).

Ito C., Itoigawa M., Miyamoto Y., Onoda S., Rao K. S., Mukainaka T., Tozuda H., Nishino H., Furukawa H. Polyprenylated benzophenones from *Garcinia assigu* and their potential cancer chemopreventive activities. *J. Nat. Prod.* 66, 206-209 (2003b).

Ito C., Itoigawa M., Mishina Y., Cechinel V., Enjo F., Tozuda H., Nishino H., Furukawa H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. *J. Nat. Prod.* 66, 368-371 (2003c).

Itoigawa M., Ito C., Tan H. T., Kuchide M., Tozuda H., Nishino H., Furukawa H. Cancer chemopreventive agents 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*. *Cancer Lett.* 169, 15-19 (2001).

Jacobo-Molina A., Clark A. D. Jr., Williams R. L. Crystals of a ternary complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a monoclonal antibody Fab fragment and double-stranded DNA diffract x-rays to 3.5 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 10895-10899 (1991).

Jacobo-Molina A., Ding J., Nanni R. G., Clark A. D. Jr., Lu X., Tantillo C., Williams R. L., Karver G., Ferris A. L., Clark P., Hizi A., Hughes S. H., Arnold E. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complex with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 6320-6324 (1993).

Kashiwada Y., Nonaka G., Nishioka I., Lee K. J., Bori I., Fukushima Y., Bastow K. F., Lee K. H. Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II *in vitro*. *J. Pharm. Sci.* 82, 487-492 (1993).

Kashman Y., Gustafson K. R., Fuller R. W., Cardellina J. H. II, McMahon J. B., Currens M. J., Buckheit R. W. Jr., Hughes S. H., Cragg G. M., Boyd M. R. The Calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *J. Med. Chem.* 35, 2735-2743 (1992).

Katoh I., Yoshinaka Y., Rein A., Shibuya M., Odaka T., Oroszlan S. Murine leukemia virus maturation: protease region required for conversion from "immature" to "mature" core form and for virus infectivity. *Virology* 145, 280-292 (1985).

Kavlick M. F., Shirasaka T., Kojima E., Pluda J. M., Hui F. Jr., Yarchoan R., Mitsuya H. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 isolated from patients receiving (-)-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antiviral. Res.* 28, 133-146 (1995).

Kawazu K., Ohigashi H., Mitsui T. The piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum* Linn. *Tetrahedron Lett.* 2383-2385 (1968).

Kearns D. M., Berry P. E., Stevens P. F., Cuello N. L., Pipoly J. J. III, Robson N. K. B., Holst B. K., Kubitzki K., Weitzman A. L. In: Steyermark J. A., Berry P. E., Holst B. K. Flora of the Venezuelan Guayana. Vol. 4. Caesalpinaceae-Ericaceae. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis. 1998. U. S. A. St. Louis Missouri, 799 pp.

Kellam P., Boucher C. A. B., Larder B. A. Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, 1934-1938 (1992).

Khilevich A., Aye M., Flavin M. T., Rizzo J. D., Lin L., Dzekhtser S., Brankovic D., Zhang H., Chen W., Liao S., Zembower D. E., Xu Z. Q. Synthesis of (+)-calanolide A, an anti-HIV agent, via enzyme-catalyzed resolution of the aldol products. *Tetrahedron: asymmetry* 7, 3315-3326 (1996).

Kilby J. M., Hopkins S., Venetta T. M., DiMassimo B., Cloud G. A., Lee J. Y., Alldredge L., Hunter E., Lambert D., Bolognesi D., Matthews T., Johnson M., Nowak M. A., Shaw G. M., Saag M. S. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41 mediated virus entry. *Nat. Med.* 4, 1302-1307 (1998).

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

Kohlstaed L. A., Wang J., Friedman J. M., Rice P. A., Steitz T. A. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256, 1783-1790 (1992).

Kroeger M. B., Rouzer C. A., Taneyhill L. A., Smith N. A., Hughes S. H., Boyer P. L., Janssen P. A. J., Moereels H., Koymans L., Arnold E., Ding J., Das K., Zhang W., Michejda C. J., Smith R. H. Jr. Molecular modeling studies of HIV-1 reverse transcriptase nonnucleoside inhibitors: total energy of complexion as a predictor of drug placement and activity. *Protein Sci.* 4, 2203-2222 (1995).

Lacey S. F., Larder B. A. Novel mutation (V75T) in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to 2', 3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1428-1432 (1994).

Larcher G., Morel C., Tronchin G., Landreau A., Seraphin D., Richomme P., Bouchara J. P. Investigation of the antifungal activity of caledonixanthone E and other xanthonones against *Aspergillus fumigatus*. *Planta Med.* 70, 569-571 (2004).

Levy J. A., Kaminsky L. S., Morrow W. J. W., Steimer K., Luciw P., Dina D., Hoxie J., Oshiro L. Infection by the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome: clinical, biological and molecular features. *Ann. Int. Med.* 103, 694-699 (1985).

Levy J. A. HIV and the Pathogenesis of AIDS. 2<sup>nd</sup> Ed. ASM Press. Washington D. C., U. S. A. 1998. 588 pp.

Lokvam J., Braddock J. F., Reichardt P. B., Clausen T. P. Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). *Phytochemistry* 55, 29-34 (2000).

Ma C., Nakamura N., Hattori M., Kakuda H., Qiao J., Yu H. Inhibitory effects on HIV-1 protease of constituents from the wood of *Xanthoceras sorbifolia*. *J. Nat. Prod.* 63, 238-242 (2000).

Magis C., Bravo E., Anaya L., Uribe P. La situación del SIDA en México a finales de 1998. *Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas*. Nov-Dic 18, 236-244 (1998).

Maguire B. On the genus *Clusia* (Clusiaceae) in Mexico. *Taxon* 28, 13-18 (1979).

Mansky L. M., Temin H. M. Lower *in vivo* mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* 69, 5087-5094 (1996).

Matthée G., Wroight A. D. y Köning G. M. HIV Reverse Transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta Med.* 65, 493-506 (1999).

Marks K., Gulick R. M. New antiretroviral agents for the treatment of HIV infection. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 6, 333-339 (2004).

Matsumoto K., Akao Y., Kobayashi E., Ito T., Ohguchi K., Tanaka T., Iinuma M., Nozawa Y. Cytotoxic benzophenone derivatives from *Garcinia* species display a strong apoptosis inducing effect against human leukemia cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 569-571 (2003).

McKee T. C., Cardellina J. H. II, Dreyer G.B., Boyd M. R. The pseudocalanolides: structure revision of calanolides C and D. *J. Nat. Prod.* 58, 916-920 (1995).

McKee T. C., Covington C. D., Fuller R. W., Bokesch H. R., Young S., Cardellina J. H. II, Kadushin M. R., Soejarto D. D., Stevens P. F., Cragg G. M., Boyd M. R. Pyranocoumarins from tropical species of the genus *Calophyllum*: a chemotaxonomic study of extracts in the National Cancer Institute Collection. *J. Nat. Prod.* 61, 1252-1256 (1998).

Min B. S., Jung H. J., Lee J. S., Kim Y. H., Bok S. H., Ma C.M., Nakamura N., Hattori M., Bae K. Inhibitory effect of triterpens from *Crataegus pinnatifida* on HIV-1 protease. *Planta Med.* 65, 374-375 (1999).



Min B. S., Kim Y. H., Tomiyama M., Nakamura N., Miyashiro H., Otake T., Hattori M. Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities. *Phytother. Res.* 15, 481–486 (2001).

Moore M. International Herald Tribune. 22 de febrero de 2001. Disponible en: [http://www.wto.org/spanish/news\\_s/news01\\_s/tn\\_dg\\_iht\\_feb2001\\_s.htm](http://www.wto.org/spanish/news_s/news01_s/tn_dg_iht_feb2001_s.htm)

Morel C., Guilet D., Oger J. M., Séraphin D., Sévenet T., Wiart C., Hadi A. H., Richomme P., Bruneton J. 6-acylcoumarins from *Mesua racemosa*. *Phytochemistry* 50, 1243-1247 (1999).

Morel C., Séraphin D., Teyrouz A., Larcher G., Bouchara J. P., Litaudon M., Richomme P., Bruneton J. New and antifungal xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Med.* 68, 41-44 (2001).

Munk B. Resistencia a los medicamentos anti-VIH. (2003). Disponible en [www.tpan.com/publications/positively\\_aware-en-espanol/winter-2003/resistencia.html](http://www.tpan.com/publications/positively_aware-en-espanol/winter-2003/resistencia.html).

Nakane H., Fukushima M., Ono K. Differential inhibition of reverse transcriptase and various DNA polymerases by digallic acid and its derivatives. *J. Nat. Prod.* 53, 1234–1240 (1990).

Newman R. A., Chen W., Madden T. L. Pharmaceutical properties of related calanolide compounds with activity against human immunodeficiency virus. *J. Pharm. Sci.* 87, 1077-1080 (1998).

Nishizawa M., Yamagishi T., Dutschman G. E., Parker W. B., Bodner A. J., Kilkuskie R. E., Cheng Y. C., Lee K. H. Anti-AIDS agents. 1. Isolation and characterization of four new tetragalloylquinic acids as a new class of HIV reverse transcriptase inhibitors from tannic acid. *J. Nat. Prod.* 52, 762–768 (1989).

Oger J. M., Morel C., Helesbeux J. J., Litaudon M., Séraphin D., Dartiguelongue C., Larcher G., Richomme P., Duval O. First 2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl substituted xanthenes isolated from plants: structure elucidation, synthesis and antifungal activity. *Nat. Prod. Res.* 17, 195-199 (2002).

Patil A. D., Freyer A. J., Eggleston D. S., Haltiwanger R. C., Bean M. F., Taylor P. B., Caranfa M. J., Breen A. L., Bartus H. R., Johnson R. K., Hertzberg R. P., Westley J. W. The Inophyllums, Novel Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase isolated from the Malaysian Tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *J. Med. Chem.* 36, 4131–4138 (1993).

Pengsuparp T., Serit M., Hughes S. H., Soejarto D. D., Pezzuto J. M. Specific inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase mediated by Soulatrolide, a coumarin isolated from the latex of *Calophyllum teysmanii*. *J. Nat. Prod.* 59, 839-842 (1996).

Pennington T. D., Sarukhán J. Manual para la Identificación de Campo de los Principales Árboles Tropicales de México. 2da. Ed., Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, México, 1998.

Pereira M. O., Gottlieb O. R., Magalhaes M. T. Constituintes xantônicos do *Calophyllum brasiliense*. *An. Acad. Bras.Cien.* 38, 425-427 (1966).

Pereira M. O., Gottlieb O. R., Magalhaes M. T. Novas xantonas do *Calophyllum brasiliense*. *An. Acad. Bras.Cienc.* 39, 255-256 (1967).

Plattner R. D., Spencer G. F., Weisleder D., Kleiman R. Chromanone acids in *Calophyllum brasiliense* seed oil. *Phytochemistry* 13, 2597-2602 (1974).

Press N., Tyndall M. W., Wood E., Hogg R. S., Montaner J. S. Virologic and immunologic response, clinical progression, and highly active antiretroviral therapy adherence. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Human Retrovirol.* 31, Suppl 3:S112-7 (2002).

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

Raulin J. Human immunodeficiency virus and host cell lipids. Interesting pathways in research for a new HIV therapy. *Prog Lip Res* 41, 27-65 (2002).

Reyes-Chilpa R., Jiménez-Estrada M., Estrada-Muñiz E. Antifungal xanthonas from *Calophyllum brasiliensis* heartwood. *J. Chem. Ecol.* 23, 1901-1911 (1997).

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

Rukachaisirikul V., Pailee P., Hiranrat A., Tuchinda P., Yoosook C., Kasisit J., Taylor W. C., Reutrakul V. Anti-HIV-1 protostane triterpens and digeranylbenzophenone from trunk bark and stems of *Garcinia speciosa*. *Planta med.* 69, 1141-1146 (2003).

Sakagami Y., Kajimura K., Wijesinghe W. M. N. M., Dharmaratne H. R. W. Antibacterial activity of calozeoyloxanthone isolated from *Calophyllum* species against vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. *Planta Med.* 68, 541-543 (2002).

Samaraweera U., Sotheeswaran S., Sultanbawa M. U. S. Bark acids of seven *Calophyllum* species (Guttiferae). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 703-706 (1983).

Sarawak MediChem Pharmaceuticals, Inc. (2004). Disponible en: <http://www.sarawak-medichem.com/cala/dev.htm>.

Secretaría de Salud, México. (2004). Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/conasida/medicos/guias/medica/guia2004.pdf>.

Seo E. K., Wani M. C., Wall M. E., Navarro H., Mukherjee R., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. *Phytochemistry* 55, 35-42 (2000).

Shao X., Ekstrand D. H. L., Bhikhabhai R., Källander C. F. R., Gronowitz J. S. A non-radioactive microtitre plate reverse transcriptase (RT) assay, based on immobilized template, for screening of RT inhibitors and evaluation of their mode of action. *Antivir. Chem. Chemother.* 8, 149-159 (1997).

Shen Y. C., Wang L. T., Khalil A. T., Kuo Y. H. Chromanones and dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*. *Chem. Pharm. Bull.* 52, 402-405 (2004).

Soto Núñez J. C. Las plantas medicinales y su uso tradicional en la cuenca del Río Balsas; Estado de Michoacán y Guerrero, México. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM, 1987. 231 pp.

Standley P. C. Clusiaceae En: Trees and Shrubs of Mexico. *Contribut. Unit. Stat. Nat. Herb.* 23, 824-827 (1923).

Standley P. C., Williams L. O. Guttiferae. In: Flora of Guatemala. Fieldiana, Bot. 24, 36-61 (1961).

Stevens P. F. A revision of the old world species of *Calophyllum* (Guttiferae). *J. Arnold Arbor.* 61, 117-171 (1980).

Stout G. H., Krahn M. M., Breck G. D. *Calophyllum* products. II. Brasiliensic and inophylloidic acids. *Tetrahedron Letters* 29, 3285-3290 (1968).

Suksamrarn S., Suwannapoch N., Phakhodee W., Thanuhiranlert J., Ratananukul P., Chimnoi N., Suksamrarn A. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem. Pharm. Bull.* 51, 857-859 (2003).

Tan G. T., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D. Evaluation of Natural Products as inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Reverse Transcriptase. *J. Nat. Prod.* 54, 143-154 (1991).

Tarinas A., Tápanes R. D., Pérez L. J. Terapia antiviral para VIH-SIDA. *Rev. Cubana Farm.* 34, 207-220 (2000).

Taylor P. B., Culp J. S., Debouck C., Johnson R. K., Patil A. D., Woolf D. J., Brooks I., Hertzberg R. P. Kinetic and mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibition by inophyllums, a novel class of non-nucleoside inhibitors. *J. Biol. Chem.* 269, 6325-6331 (1994).

UNAIDS. United Nations Programme on HIV/AIDS. (2004). Disponible en: [www.unaids.org/html/pub/Publications/IRC-pub06/Epi03-00sp-html.htm](http://www.unaids.org/html/pub/Publications/IRC-pub06/Epi03-00sp-html.htm).

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

Wlodawer A., Erickson J. W. Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 543-585 (1993).

Wong-Staal F., Gallo R. C. Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature* 317, 395-403 (1985).

Xu Z. Q., Bukheit R. W., Stup T. L., Flavin M. T., Khilevich A., Rizo J. D., Lin L., Zembower D. E. *In vitro* anti-human immunodeficiency virus (VIH) activity of the chromanone derivative 12-oxocalanolide A, a novel NNRTI. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 2179-2184 (1998).

Yang S. S., Cragg G. M., Newman D. J., Bader J. P. Natural Product-Based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. *J. Nat. Prod.* 64, 265-277 (2001).



# APÉNDICE I

## PROTOCOLOS DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### A. Efecto de los Extractos y Compuestos sobre TR VIH-1

Para la determinación del efecto de los extractos y compuestos puros de Clusiaceae mexicanas sobre TR VIH-1, se utilizó el kit Lenti RT (Cavidi Tech). Los extractos y/o fracciones en un primer sondeo se probaron a una concentración única de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . De los extractos y /o fracciones que resultaron activos, se determinó una curva dosis-respuesta donde las concentraciones fueron en un intervalo de 10-120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . De igual forma, los compuestos puros se probaron inicialmente a una concentración única de 1mM; la curva dosis-respuesta se realizó únicamente con los compuestos activos en un intervalo de 1 mM a 0.001  $\mu\text{M}$ .

Tanto extractos, fracciones como compuestos puros fueron disueltos en DMSO y probados por triplicado. Se utilizó Nevirapine como control positivo.

A continuación se describe el protocolo del Kit Lenti RT (Cavidi Tech) para determinar la actividad inhibitoria sobre la TR VIH-1.

Este kit consta de varios elementos:

- 2 placas de Poli A (96 pozos cada una)
- 1 frasco con amortiguador de dilución (B)
- 2 frascos con componentes de reacción de la TR (C1)
- 1 frasco con amortiguador de reconstitución (C2)
- 1 frasco con estándar TRr-VIH (D)
- 1 frasco con amortiguador de lavado concentrado (E)
- 2 frascos con anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (O)
- 1 frasco con tabletas del sustrato de la fosfatasa alcalina (P1)
- 1 frasco con amortiguador del sustrato de la fosfatasa alcalina (P2)
- 4 tapas de plástico adhesivo
- 2 tapas de plástico duro.

1. Preparación del amortiguador de dilución:

3.1.1 Adicionar 30 ml del frasco B en un vaso de precipitados y adicionar 30 ml de agua destilada (solución 1).

2. Dilución de las sustancias:

Las sustancias puras se evaluaron en 7 concentraciones que van desde 1mM, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001  $\mu$ M. Para ello:

3.1.2 Adicionar 135  $\mu$ l de la solución 1 en cada pozo de las dos placas de preparación de las muestras (placas de 96 pozos)

3.1.3 Adicionar 15  $\mu$ l de la sustancia por analizar en el pozo A1

3.1.4 Adicionar 15  $\mu$ l de la segunda sustancia por analizar en el pozo A2 y así continuar con las demás sustancias hasta completar A12

3.1.5 Transferir 15  $\mu$ l desde los pozos A1-A12 a los correspondientes pozos de la fila B

3.1.6 Transferir 15  $\mu$ l desde los pozos B1-B12 a los correspondientes pozos de la fila C y así continuar hasta la fila G (esto se realiza en ambas placas)

3.1.7 La fila H se usa para controles.

3. Preparación de la mezcla de reacción:

- Adicionar 2 ml de amortiguador de reconstitución (C2) al frasco que contienen los componentes de reacción de la TR (C1). Regresar 200  $\mu$ l al frasco C2 (mezcla C1 + C2).

4. Preparación de las placas de Poli A con las muestras:

- Tomar las 2 placas de Poli A y adicionar 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción (mezcla C1 + C2) a cada pozo
- Transferir 50  $\mu$ l de cada pozo de las placas de preparación de muestras a las placas de PoliA en el pozo correspondiente
- Cubrir las placas con la tapa de plástico adhesivo e incubar a 33° C durante 30 min.

5. Dilución del estándar TRr-VIH (D):
  - Adicionar 1.5 ml de la solución 1 al frasco que contiene el liofilizado del estándar TRr-VIH (D). Mezclar vigorosamente
  - En un vaso de precipitados adicionar 12 ml de la solución 1 y verter 1 ml de la TRr-VIH (D) resuspendida. Mezclar vigorosamente (solución 2).
  
6. Inicio de la reacción de la TR:
  - Tomar las placas de Poli A de la incubadora y adicionar 50  $\mu$ l de la solución 2 en todos los pozos excepto H8-H12
  - Adicionar 50  $\mu$ l del amortiguador de dilución en los pozos H8-H12
  - Sellar las placas con las tapas de plástico adhesivo e incubar a 33° C durante 3 h con agitación constante.
  
7. Preparación de la solución de lavado:
  - Adicionar 30 ml de Tritón X-100 en un litro de agua destilada (ó la cantidad necesaria para que se disuelva) y agitar por 10 min
  - Adicionar 10 ml del lavado concentrado (E) a un contenedor de 4 l
  - Adicionar el Tritón X-100 disuelto en el contenedor y ajustar el volumen a 4 l con agua destilada. Mezclar vigorosamente.
  
8. Fin de la reacción de la TR:
  - Tomar las placas de Poli A de la incubadora y lavarlas 4 veces con la solución de lavado de Tritón X-100. Eliminar el exceso de agua colocándolas cara abajo sobre papel absorbente.
  
9. Reconstitución del anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina:
  - Tomar los 2 frascos que contienen el anticuerpo (O) y adicionar 12 ml de una solución 1% v/v de Tritón X-100 a cada una. Mezclar vigorosamente de 10 a 15 min
  - Tomar las placas recién lavadas y adicionar 100  $\mu$ l del anticuerpo resuspendido a cada pozo en ambas placas.



Cubrirlas con tapa de plástico adhesivo e incubarlas a 33° C durante 90 min con agitación constante.

10. Preparación del sustrato de la fosfatasa alcalina (FA):
  - Adicionar las tabletas de FA (P1) al amortiguador (P2). Agitar ocasionalmente. Mantener en oscuridad y a temperatura ambiente. Dejar reposar por un tiempo mínimo de 20 min.
  
11. Eliminar el exceso de anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina:
  - Tomar las placas de Poli A de la incubadora y lavarlas con la solución de lavado de Tritón X-100 (aproximadamente 20 veces). Eliminar el exceso de agua colocándolas cara abajo sobre un papel absorbente.
  
12. Inicio de la reacción de la fosfatasa alcalina:
  - Adicionar 200 µl del sustrato de la fosfatasa alcalina a cada uno de los pozos de ambas placas de Poli A
  - Cubrir las placas con las tapas de plástico duro e incubar a temperatura ambiente. Mantener en oscuridad y agitación constante.
  
13. Lectura de las placas:
  - Leer la absorbancia de ambas placas con un lector, utilizando un filtro de 405 nm, después de 15 min de reacción. Repetir la lectura en intervalos de tiempo hasta que la lectura de los pozos H1-H7 den valores de aproximadamente el 75% del valor máximo de actividad.
  
14. Procesar datos.

## **B. Efecto Tóxico sobre Linfocitos Humanos**

El efecto citotóxico de los extractos y fracciones seleccionados con actividad sobre TR VIH-1, fue determinado sobre la línea celular linfocítica MT2.

Los extractos y/o fracciones en un primer sondeo se probaron a una concentración única de 50 µg/ml. A los extractos y /o fracciones que resultaron activos, se les realizó una curva dosis-respuesta donde las concentraciones fueron en un intervalo de 10-120 µg/ml.

Tanto extractos, fracciones como compuestos puros fueron disueltos en DMSO y probados por cuatuplicado. Se utilizó Nevirapine como control positivo (40 µM).

El protocolo del ensayo realizado se describe a continuación:

### **1. Disolución de los extractos:**

- Los extractos y fracciones a probar fueron disueltos en DMSO (0.15% v/v; cantidad previamente determinada) y se adicionó agua destilada en los casos requeridos
- En el caso del control Nevirapina, fue disuelto en DMSO y agua destilada acidificada (pH= 1.8).

### **2. Montaje de las placas de cultivo:**

- Se utilizaron placas de 24 pozos donde se colocaron 150, 000 células MT2 (fase log) por pozo, que previamente fueron seleccionadas entre otras cepas
- Adicionar a cada pozo medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0.25 µg/ml de estreptomicina y 100 µg/ml de penicilina G
- Adicionar 50 µg/ml de la sustancia a probar (excepto en los pozos control)
- Incubar las placas a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda durante 48 horas (tiempo previamente estandarizado).

### **3. Preparación en la cámara de Neubauer:**

- Sacar las placas de la incubadora y tomar una alícuota de cada pozo de 20  $\mu\text{l}$  y colocarlas en un tubo
- Agregar 80  $\mu\text{l}$  de colorante vital (azul de tripano) y agitar vigorosamente
- Tomar una muestra y colocarla en la cámara de Neubauer, cuidando que la película no se derrame por los lados y que esté libre de burbujas.

4. Conteo de células:

- Realizar el conteo directo de células en la preparación realizada en la cámara de Neubauer mediante el microscopio óptico.

5. Procesar datos.

### C. Inhibición de la Replicación de VIH-1 en Linfocitos Humanos

El efecto inhibitorio sobre la replicación viral de los extractos y fracciones seleccionados con actividad sobre TR VIH-1 y no tóxicos a linfocitos MT2, fue determinado mediante la cuantificación de antígeno p24 en sobrenadante de cocultivo de IIIb/LAV-Molt4 y células MT2 en presencia de la sustancia a probar.

Las condiciones de este cocultivo, así como las concentraciones de las sustancias a probar fueron idénticas a las del ensayo de toxicidad, con la única salvedad de que se agregaron 350 células IIIb/LAV-Molt4 por pozo.

A los datos obtenidos en los ensayos de toxicidad e inhibición de la replicación viral se les aplicó un análisis estadístico (ANOVA).

La cuantificación de antígeno p24 en sobrenadante se midió después de 48 h de incubación y se realizó mediante el kit Genetic Systems HIV-1 Ag EIA (Bio-Rad), cuyo protocolo se describe a continuación.

Este kit consta de varios elementos:

- 2 placas con anticuerpos monoclonales a p24 de VIH-1 (96 pozos cada una) (R1)
  - 1 frasco con solución concentrada de lavado (Tween 20 ) (R2)
  - 1 frasco con diluyente del espécimen (R3)
  - 1 vial con el control negativo (suero humano normal) (CO)
  - 1 vial con el control positivo (antígeno VIH-1 purificado) (C1)
  - 1 vial con conjugado 1 (conjugado de anticuerpo de oveja anti p24 ) (R4)
  - 1 vial con conjugado 2 (conjugado avidina-HRP) (R5)
  - 1 frasco con diluyente del conjugado (R6)
  - 1 frasco con buffer del sustrato ( $H_2O_2$ ) (R8)
  - 1 frasco con cromógeno (TMB) (R9)
  - 2 frascos con solución de paro ( $H_2SO_4$  1N) (R10)
- tapas plásticas adhesivas.



1. Preparar las soluciones de trabajo:

- Diluir los conjugados 1 (R4) y 2 (R5) en el diluyente del conjugado (R6) en una proporción 1:100 en recipientes separados. Mezclar vigorosamente
- Diluir el cromógeno TMB (R9) en el buffer del sustrato (R8) en una proporción 1:100 y mezclar vigorosamente. El cromógeno debe ser incoloro o amarillo pálido. Mantener por separado
- Adicionar 1 parte de la solución concentrada de lavado (R2) a 9 partes de agua destilada o desionizada. Mezclar vigorosamente. Mantener por separado.

2. Adición de las muestras y controles:

- Adicionar 50  $\mu\text{l}$  del diluyente del espécimen (R3) a cada pozo. Observar que el color de esta solución es verde
- Adicionar 150  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes de cultivo en los pozos respectivos
- Colocar 2 controles positivos (C1) y 2 negativos del sobrenadante de cultivo en cada placa. Agitar vigorosamente. Observar que el diluyente del espécimen cambiará de color a azul.
- Cubrir las placas con tapas plásticas adhesivas e incubar a  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  ó  $40 \pm 1^\circ \text{C}$  durante  $60 \pm 5$  min.

3. Comienzo de la reacción con el conjugado 1:

- Tomar las placas de la incubadora y lavarlas un mínimo de 5 veces con la solución de lavado (al menos 350  $\mu\text{l}$ /pozo/lavado).
- Adicionar 100  $\mu\text{l}$  del conjugado 1 (color amarillo) a cada pozo experimental ó control
- Cubrir las placas con una tapa de plástico adhesivo e incubar a  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  ó  $40 \pm 1^\circ \text{C}$  durante  $30 \pm 5$  min.

4. Segunda reacción con el conjugado 2:

- Tomar las placas de la incubadora y aspirar su contenido en un recipiente de desechos biológicos

- Lavar las placas un mínimo de 5 veces con la solución de lavado (al menos 350  $\mu$ l/pozo/lavado)
- Adicionar 100  $\mu$ l del conjugado 2 (color verde) a cada pozo experimental ó control.
- Cubrir las placas con una tapa de plástico adhesivo e incubar a  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  ó  $40 \pm 1^\circ \text{C}$  durante  $30 \pm 5$  min.

5. Reacción del cromógeno:

- Tomar las placas de la incubadora y lavarlas un mínimo de 5 veces con la solución de lavado (al menos 350  $\mu$ l/pozo/lavado). Eliminar el exceso de agua, colocándolas cara abajo sobre un papel absorbente
- Adicionar 100  $\mu$ l del cromógeno a cada pozo experimental ó control. Incubar las placas en oscuridad a una temperatura de  $18\text{-}30^\circ \text{C}$  durante  $30 \pm 5$  min.

6. Final de la reacción:

- Adicionar 100  $\mu$ l de la solución de paro a cada pozo. Agitar constantemente.

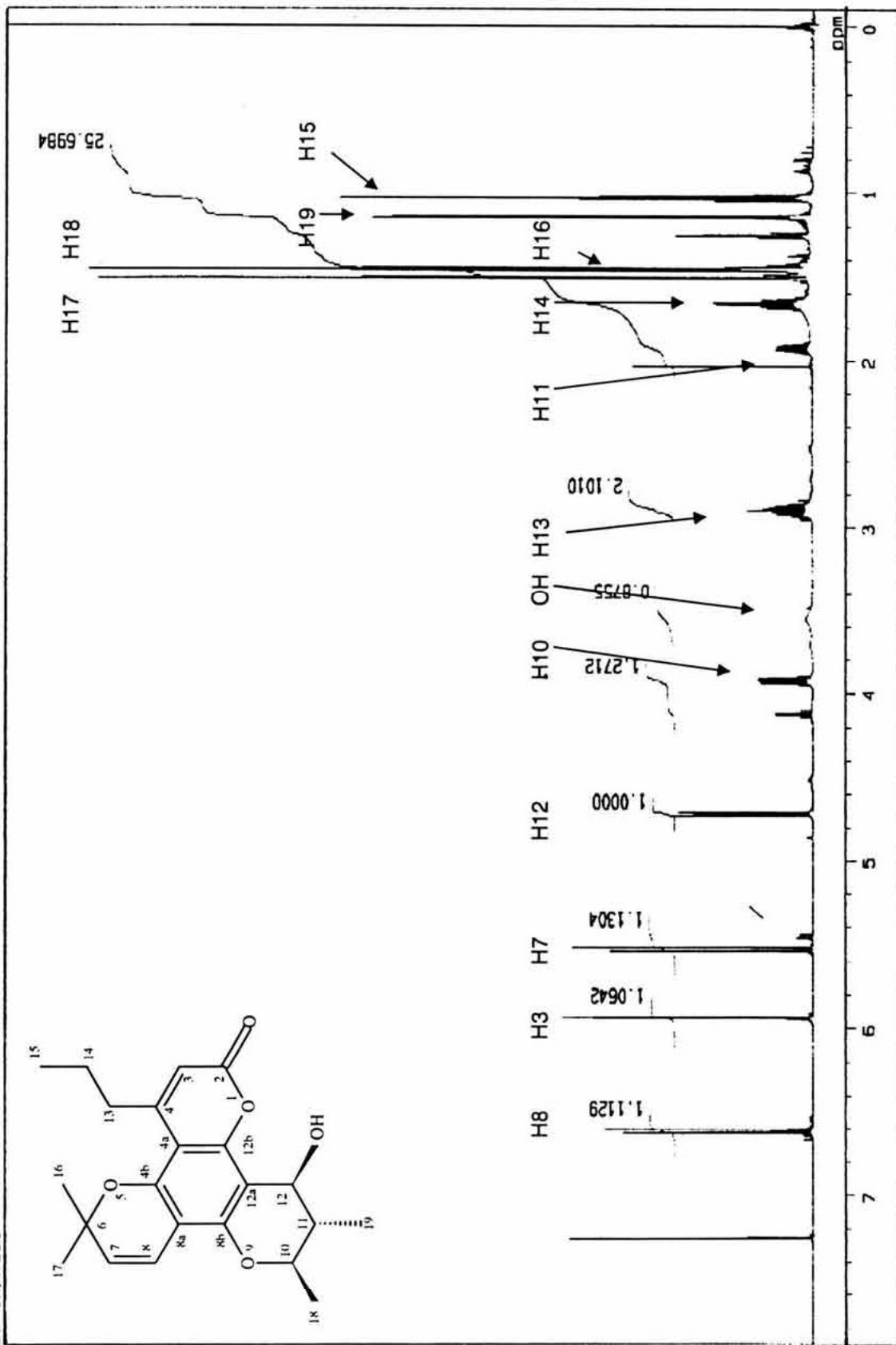
7. Lectura de las placas:

- Leer la absorbancia de ambas placas después de 30 min de reacción. Utilizar un lector con filtro de 450 nm y usar un filtro de referencia de 615 a 630 nm.

8. Procesar datos.

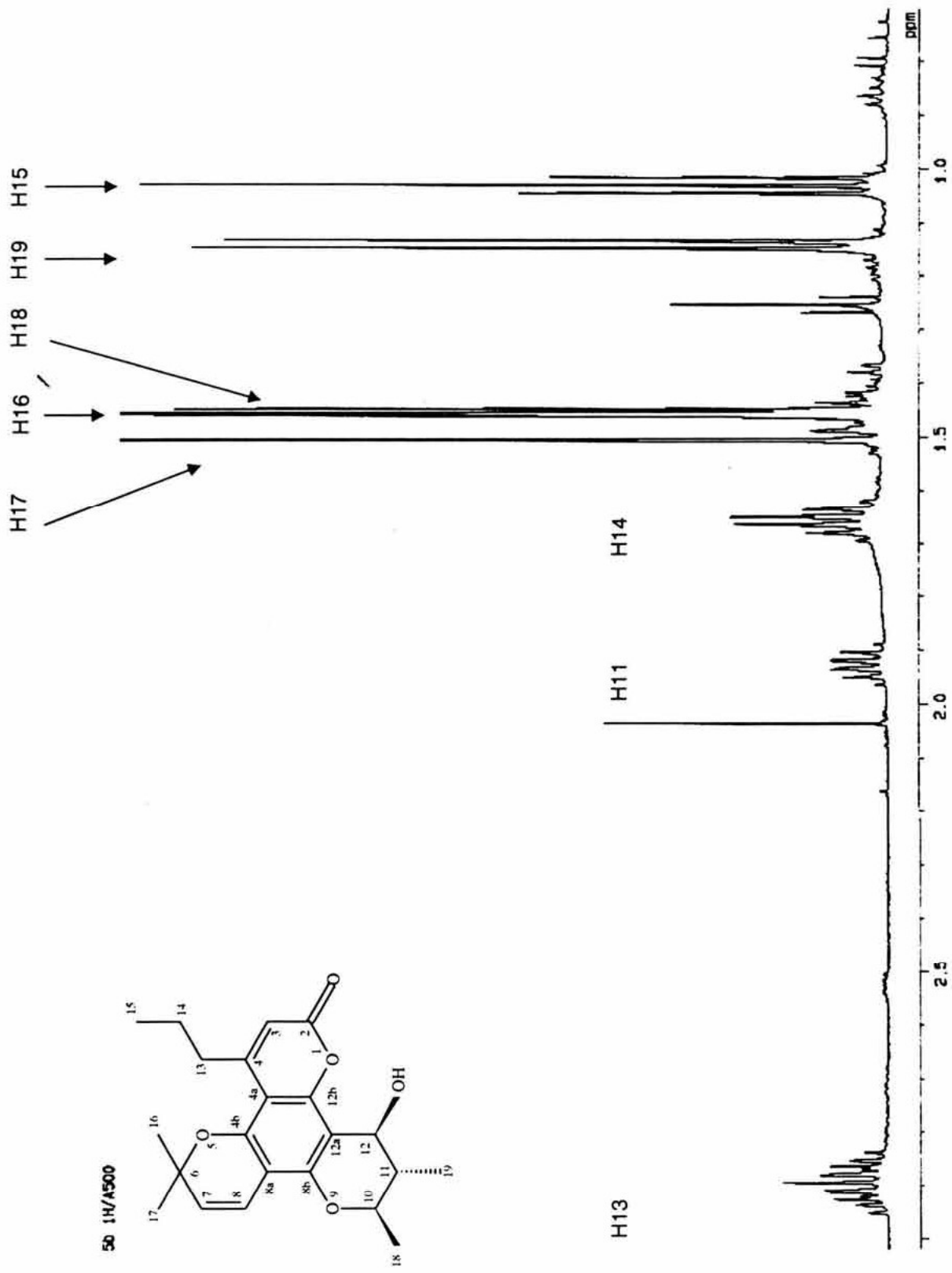
## APÉNDICE II

5b 1H/A500

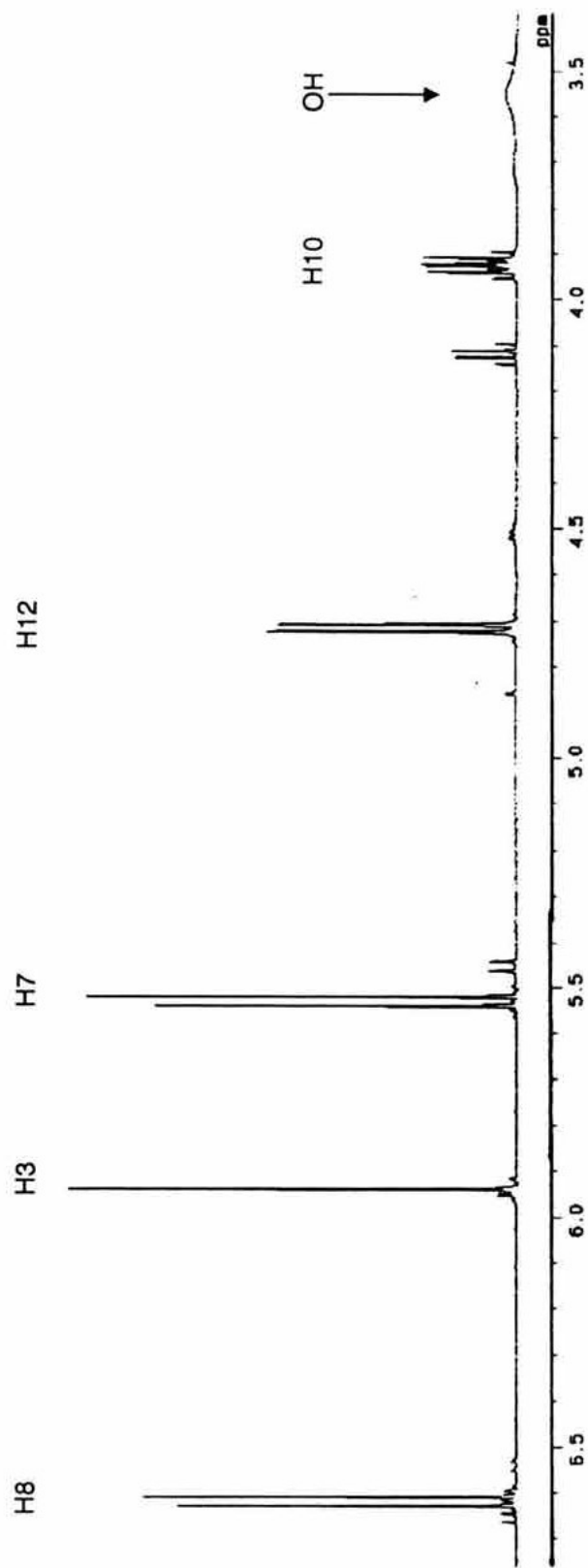
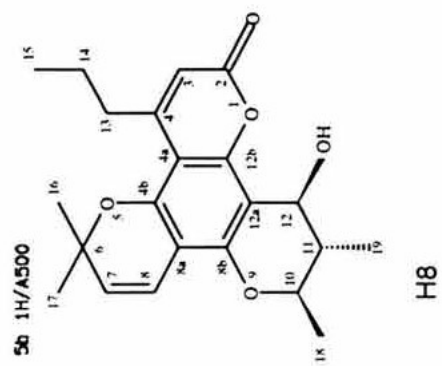


Espectro 1. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del calanólido A.

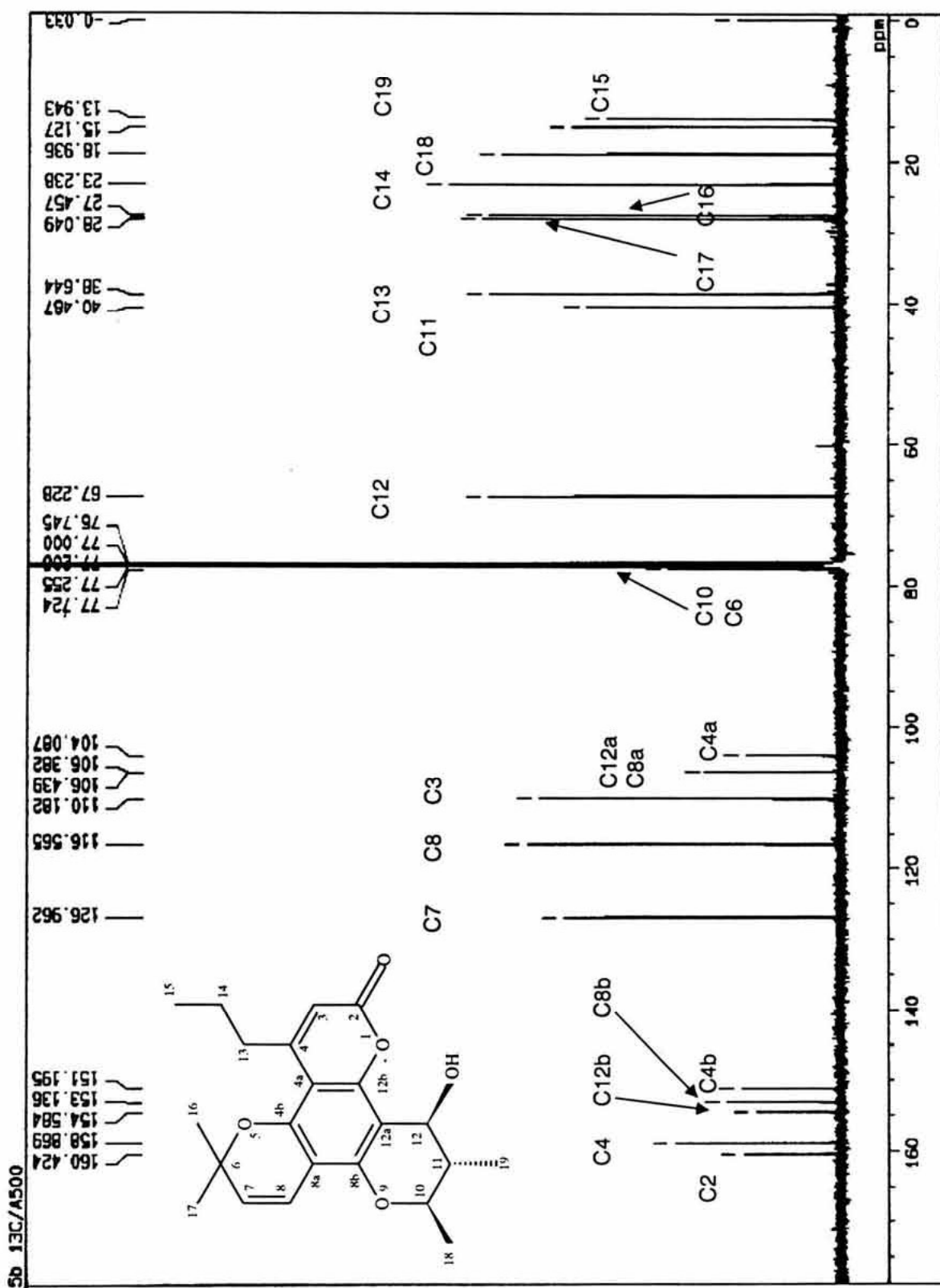




Espectro 2. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del calanólide A (1-3 ppm).

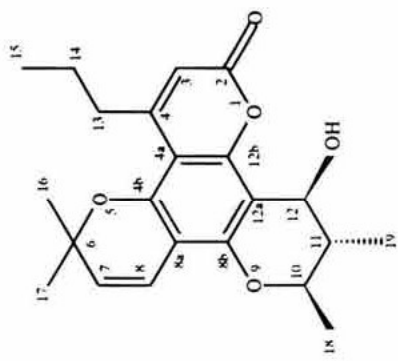
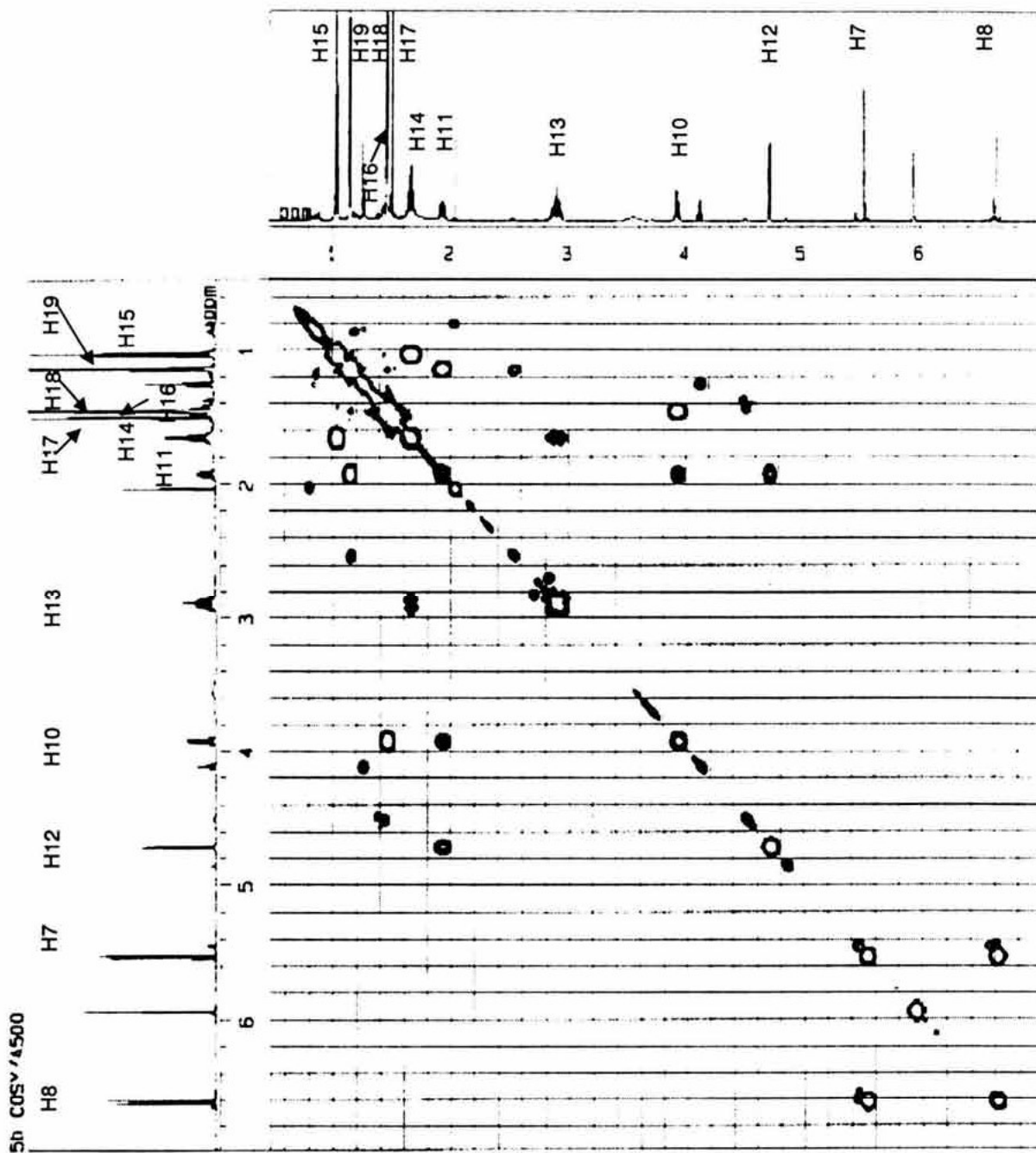


Espectro 3. Ampliación del espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  del calanólido A (3.5-7 ppm).



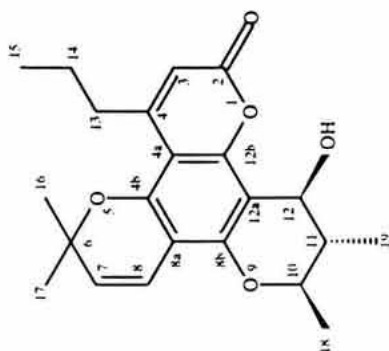
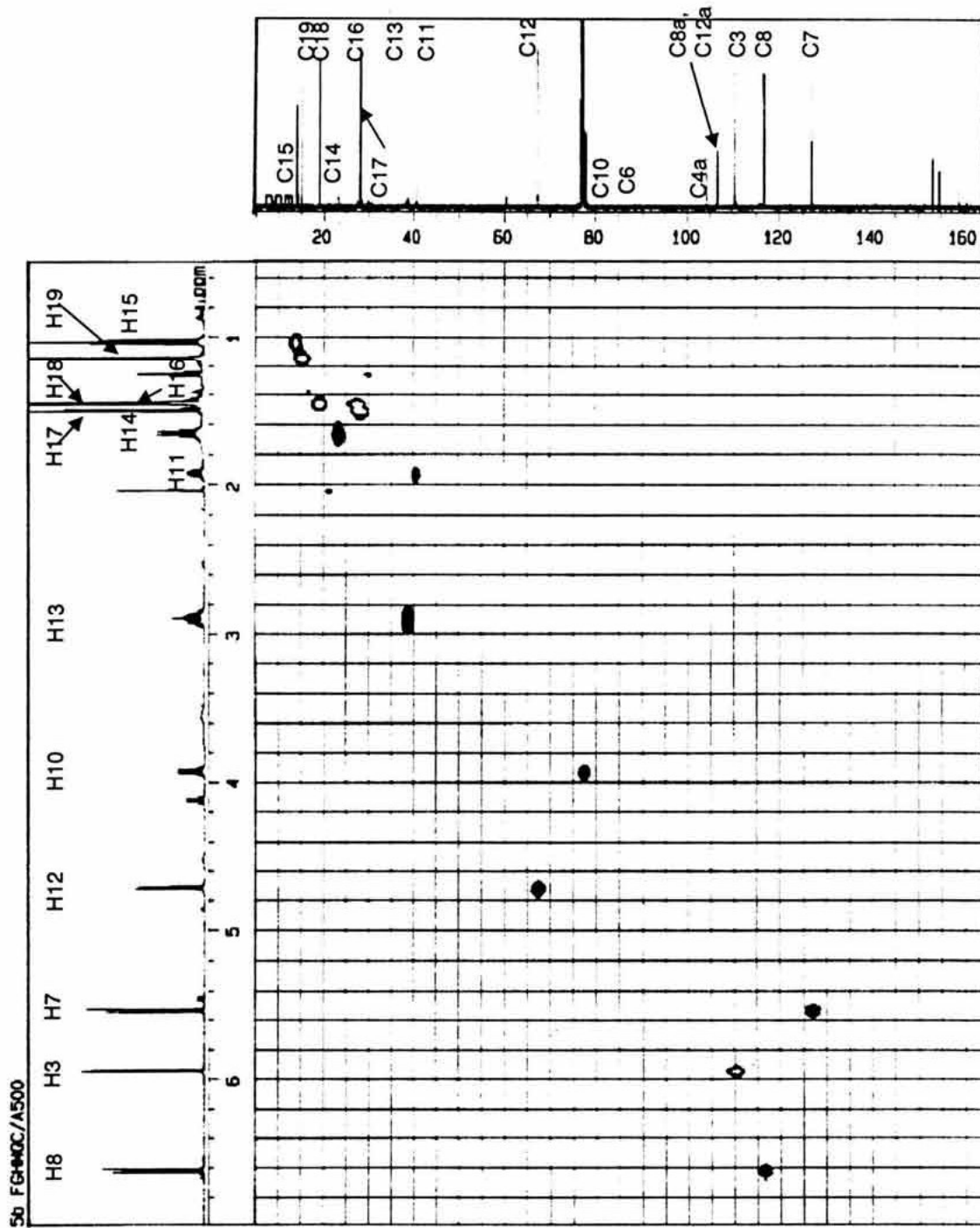
Espectro 4. Espectro de RMN<sup>13</sup>C del calanólido A.



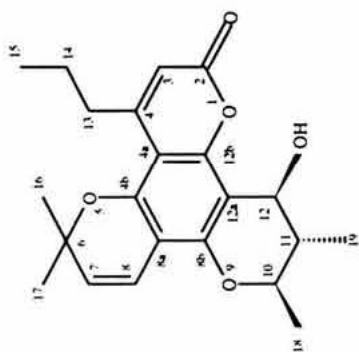
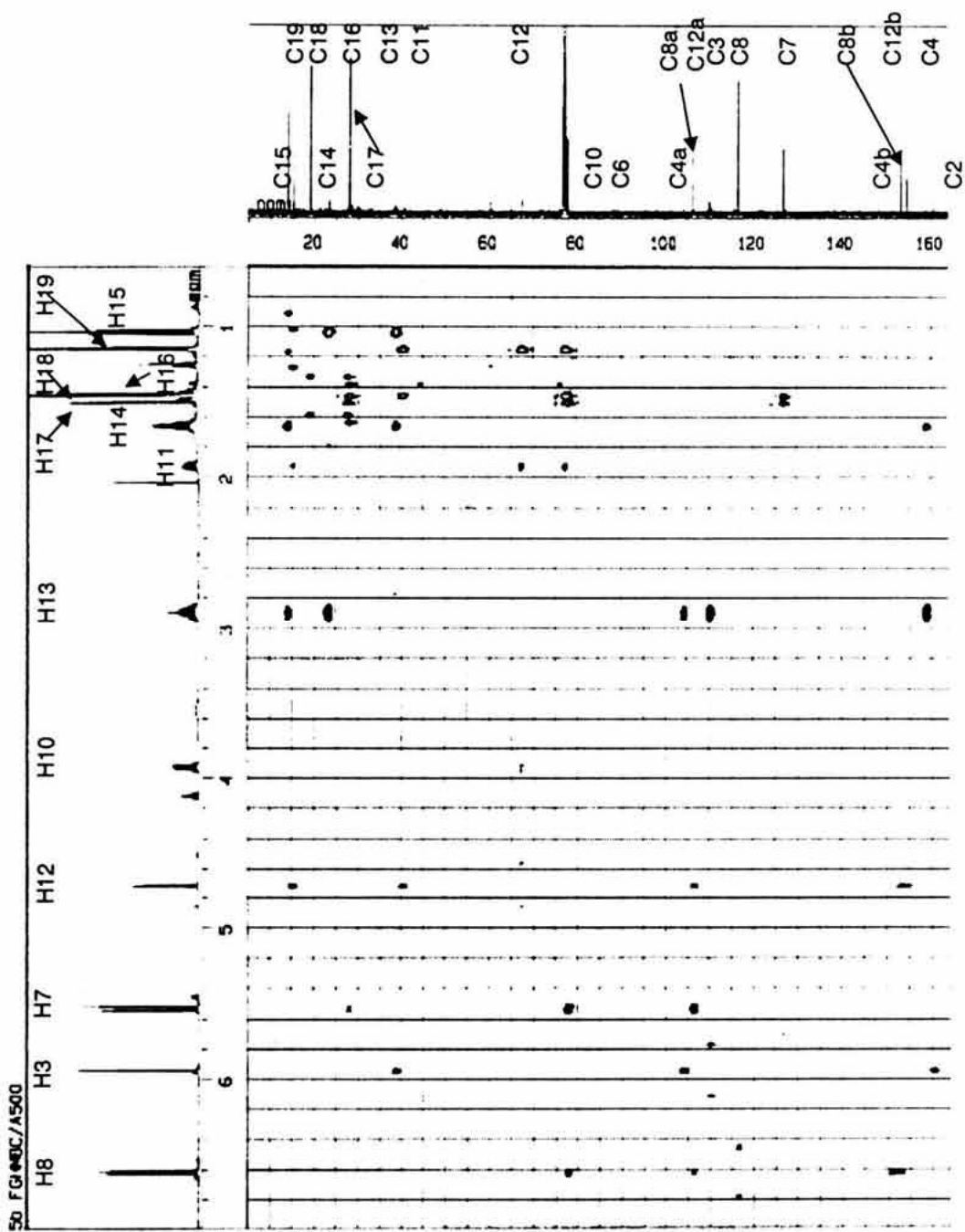


Espectro 6. Espectro COSY del calanolido A.



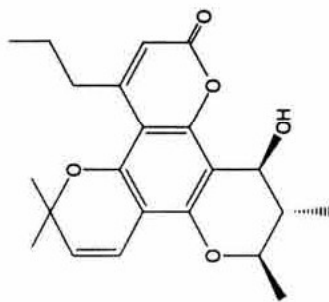


Espectro 7. Espectro HMQC del calanolido A.

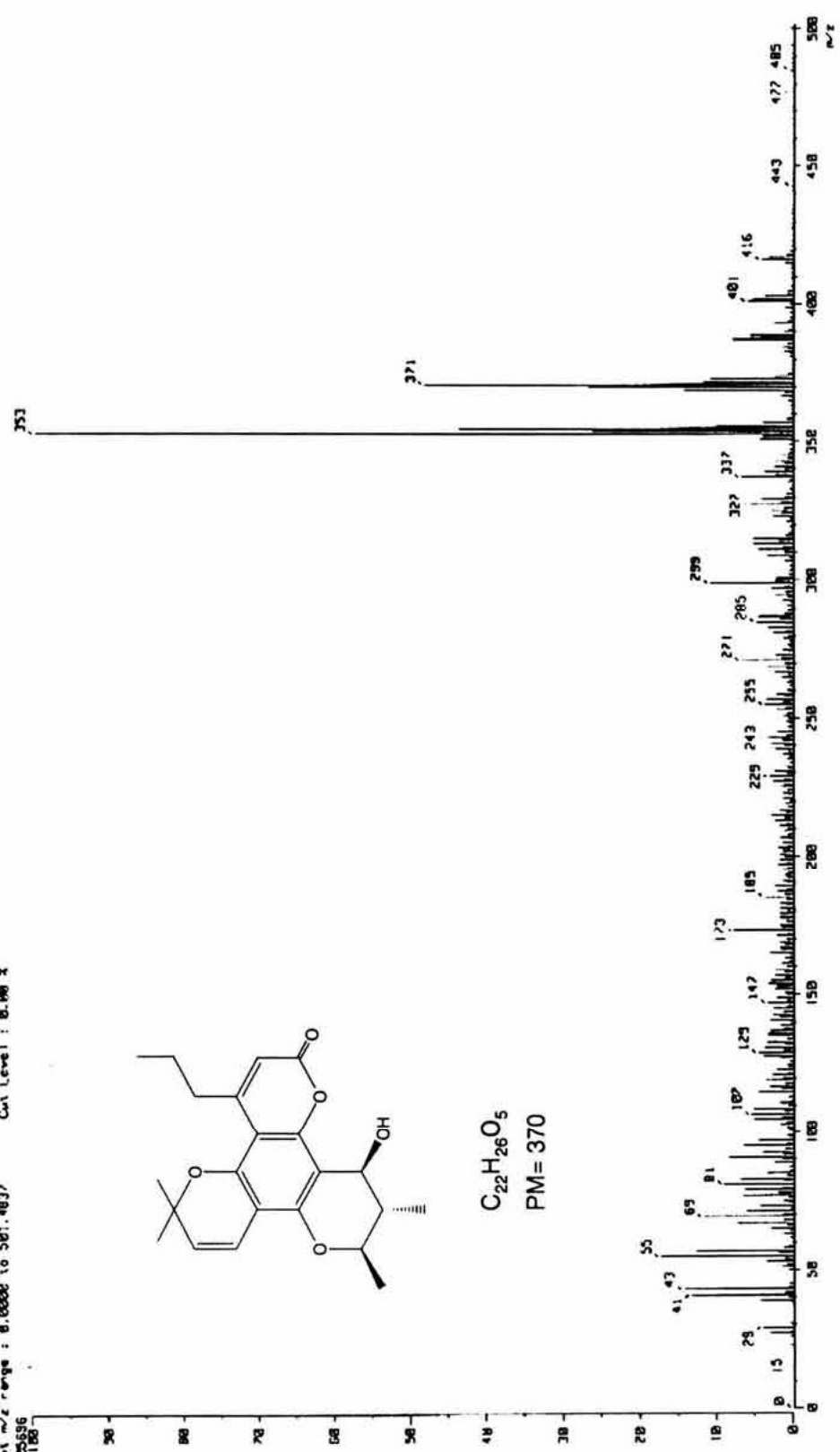


Espectro 8. Espectro HMBC del calanólido A.

[ Mass Spectrum ]  
 Date : 13-May-2003 16:58  
 Data : My880  
 Sample: 5a(378)----FAB Pos  
 Note : m-NMTOC13  
 Inlet : Direct [Ion Mode : FAB+]  
 Spectrum Type : Normal Ion [M-Linear]  
 RT : 8.58 min. Scan# : (3,6)  
 BP : m/z 353.0888 Int. : 248.50  
 Output m/z range : 8.0000 to 501.4837 Cut Level : 0.00 x  
 2605396

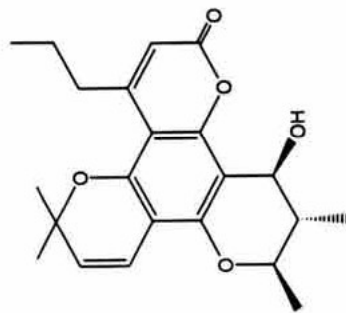


$C_{22}H_{26}O_5$   
 PM = 370

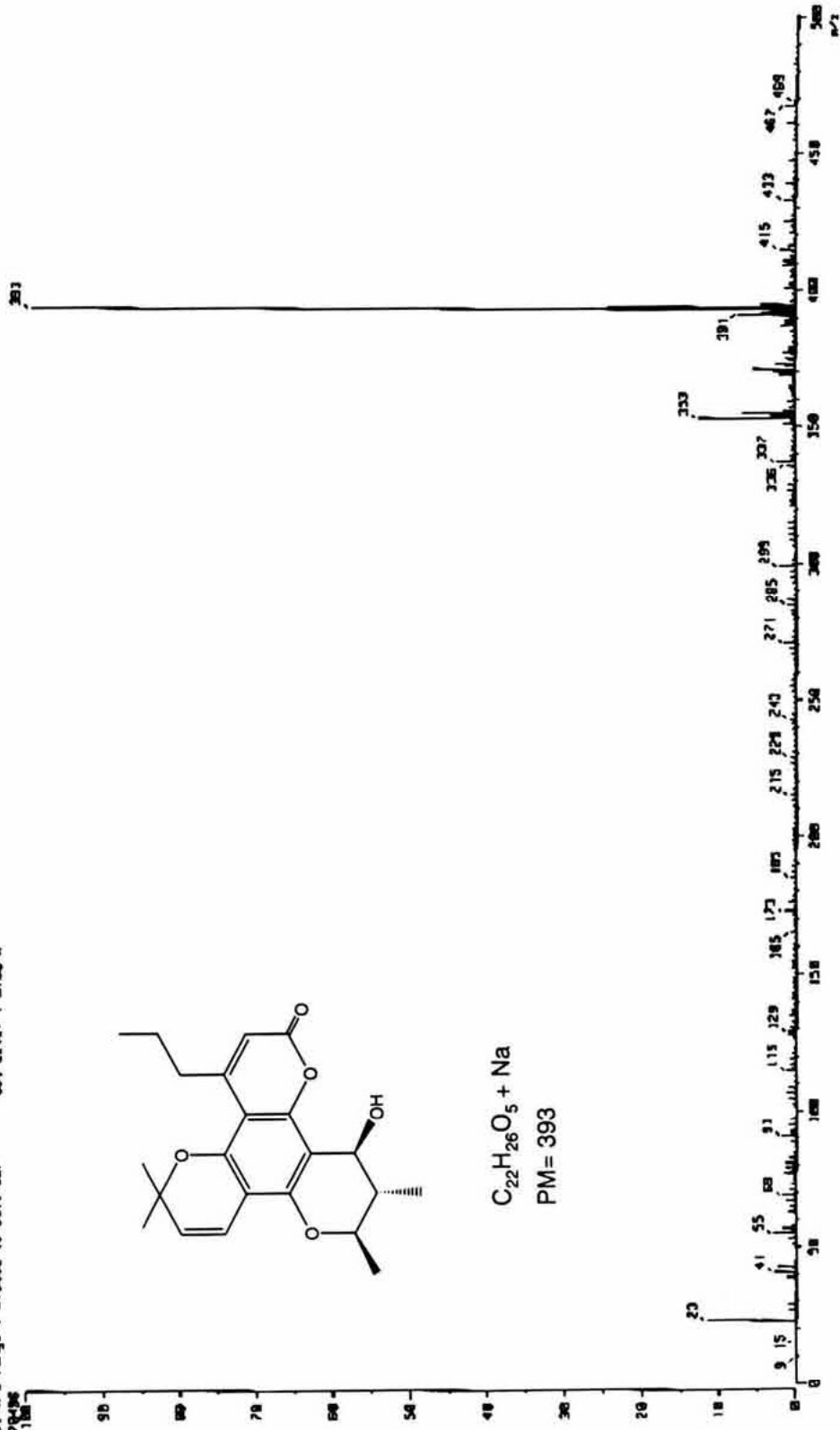


Espectro 9. Espectro de Masas (FAB) del calanólido A.

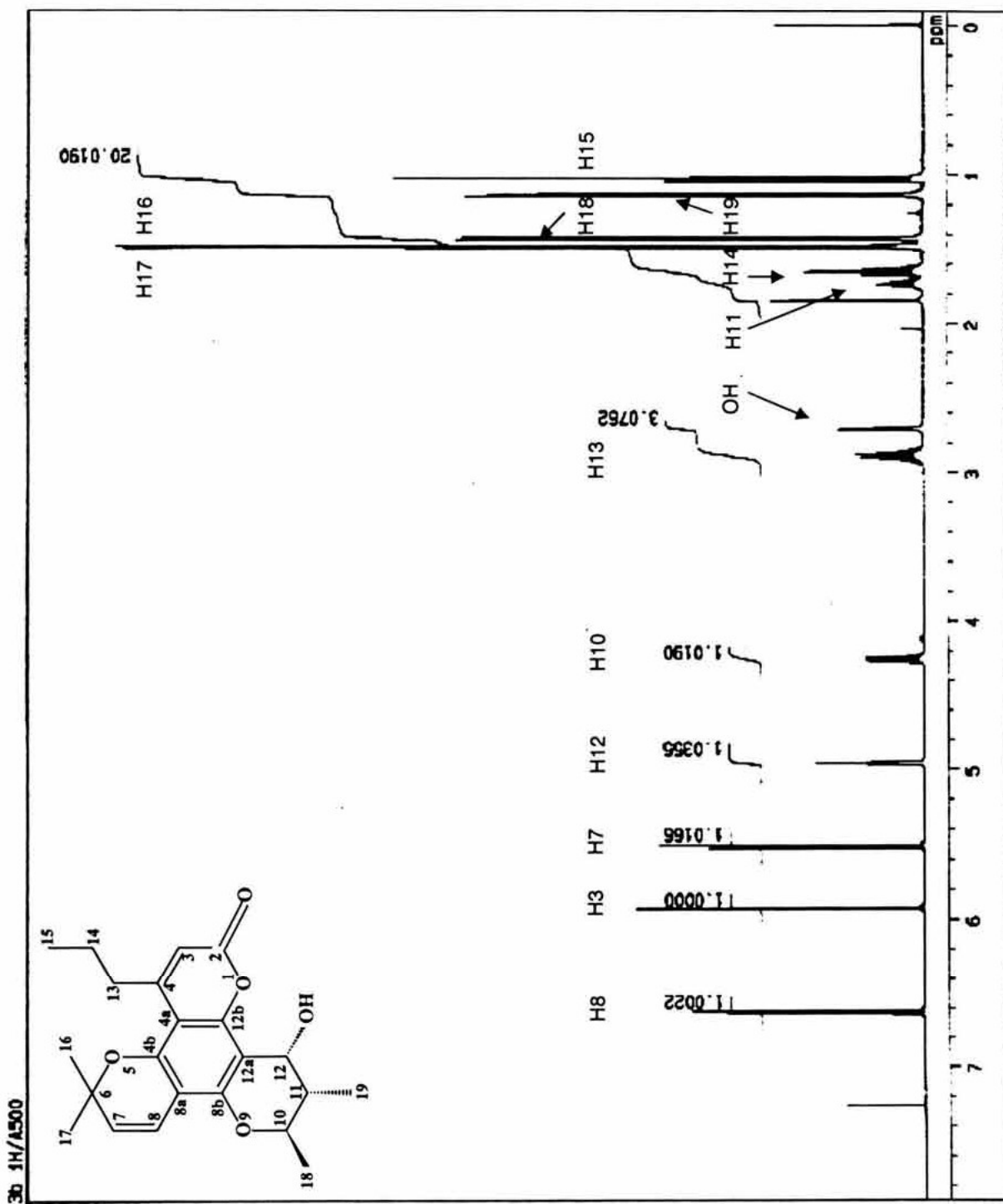
[ Mass Spectrum ]  
 Date : 13-May-2003 17:00  
 Data : 41405  
 Sample: 3a(378)mg---FAB Plus  
 Note : n-NB5/OK13  
 Inlet : Direct Ion Mode : FPG  
 Spectro Type : Normal Ion (4F-Lenser)  
 RT : 8.50 min Scans : 1216  
 BP : 4/2 300.0000 Int. : 503.83  
 Output file range : 8.0000 to 9.0137  
 7120426 Cut Level : 0.002 X



$C_{22}H_{26}O_5 + Na$   
 PM= 393

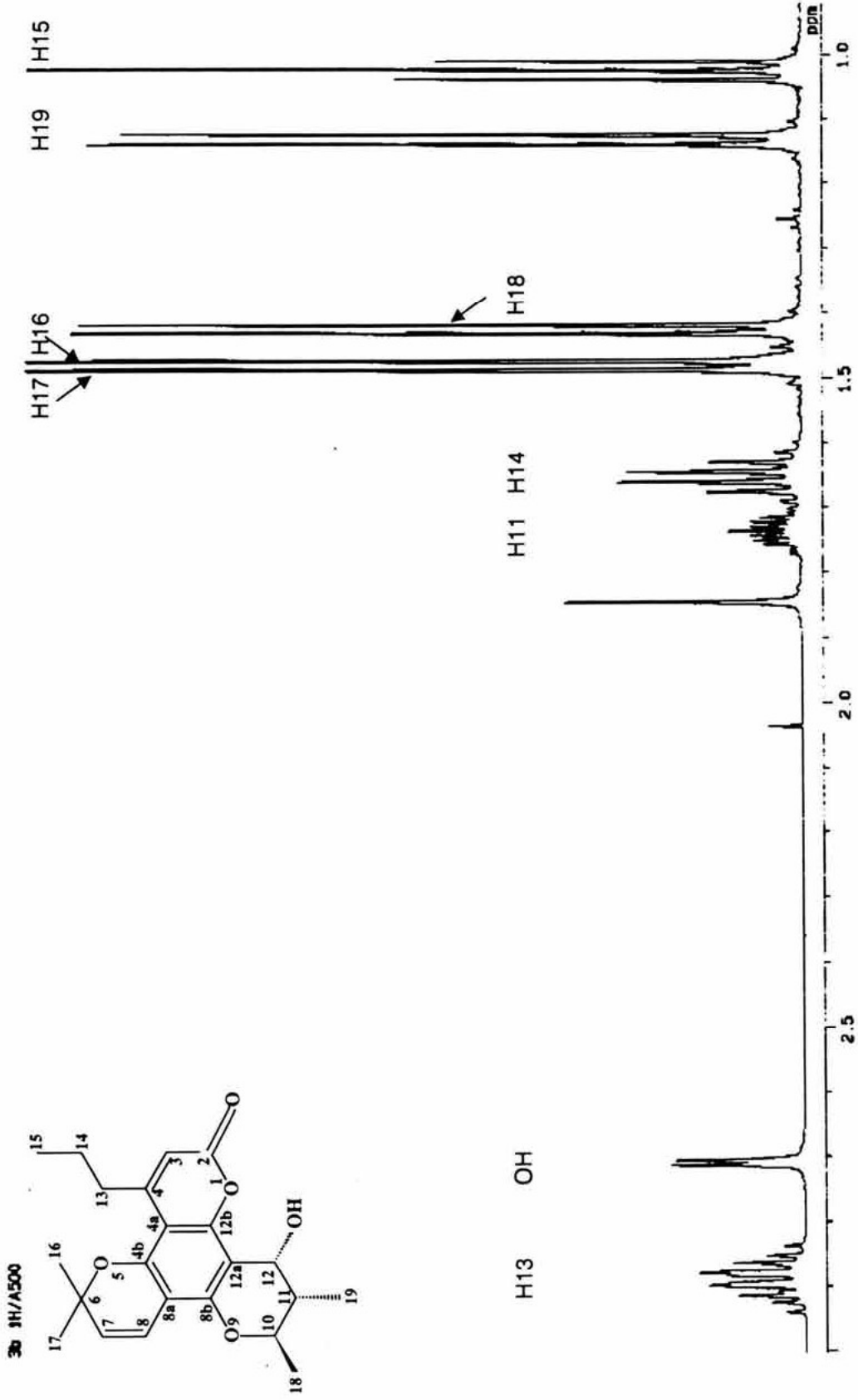


Espectro 10. Espectro de Masas (HR-FAB+ Na) del calanólido A.



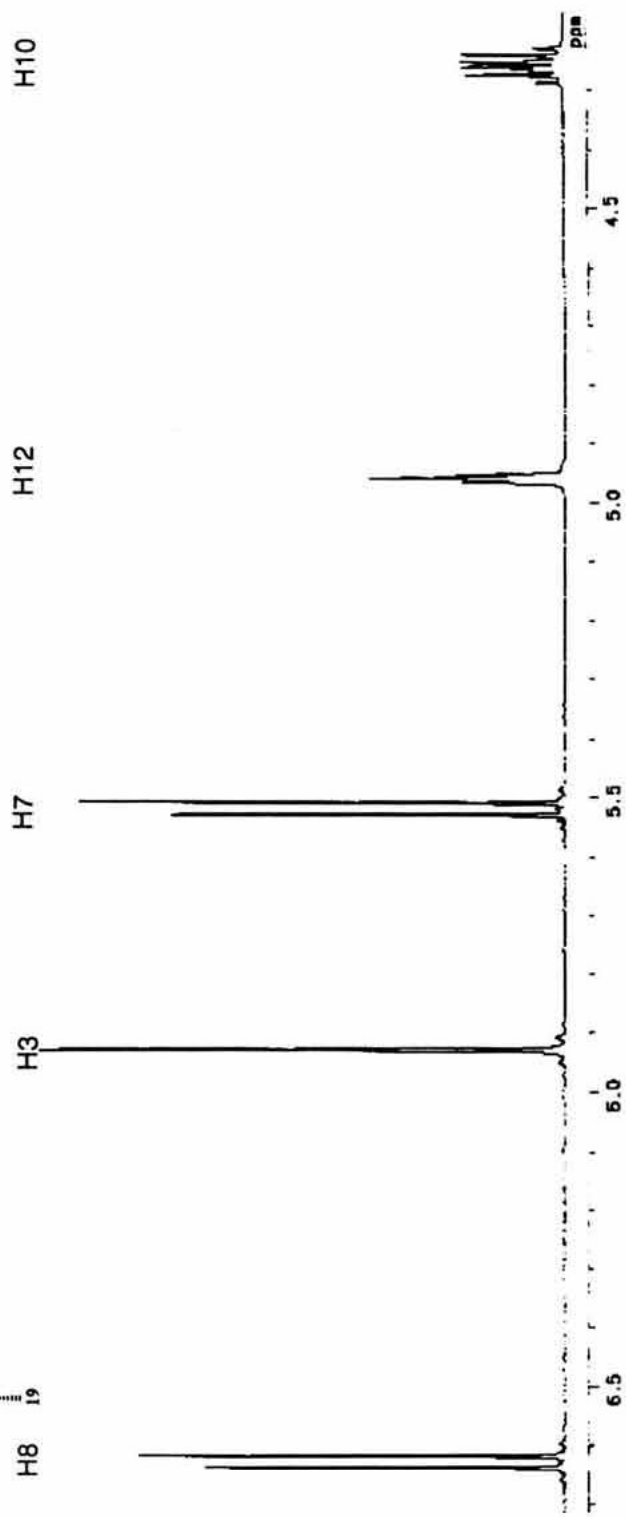
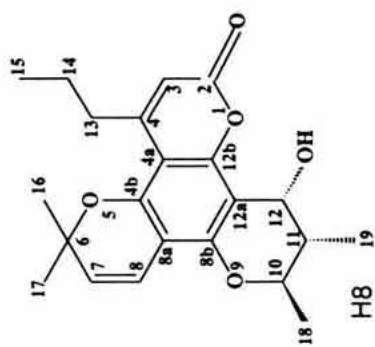
Espectro 11. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del calanólido B.



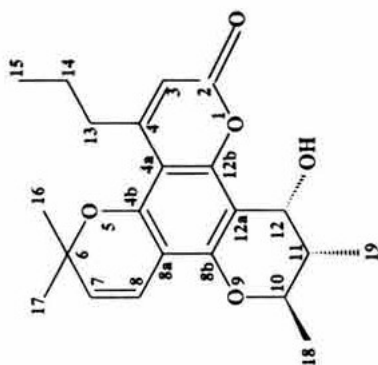
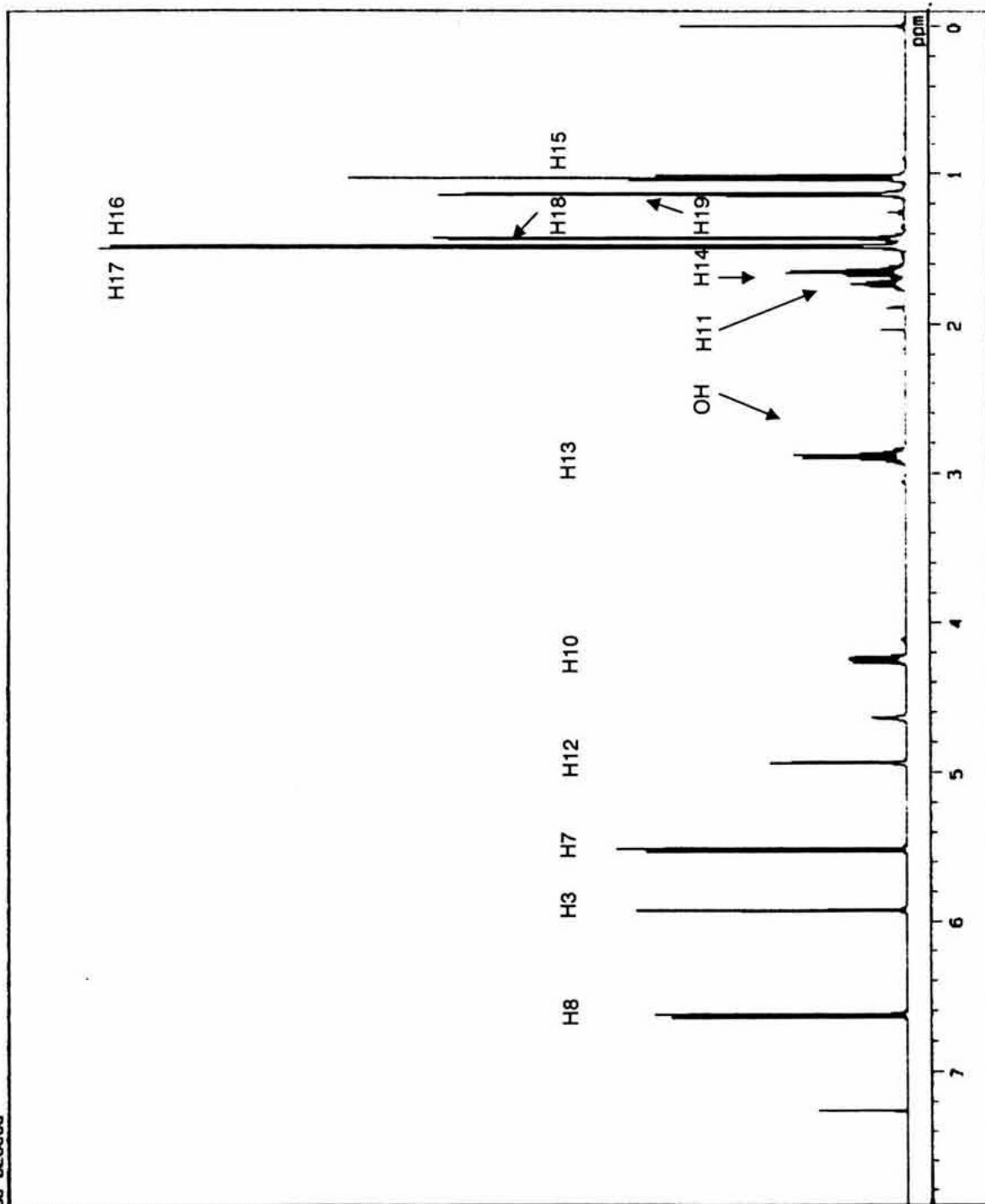


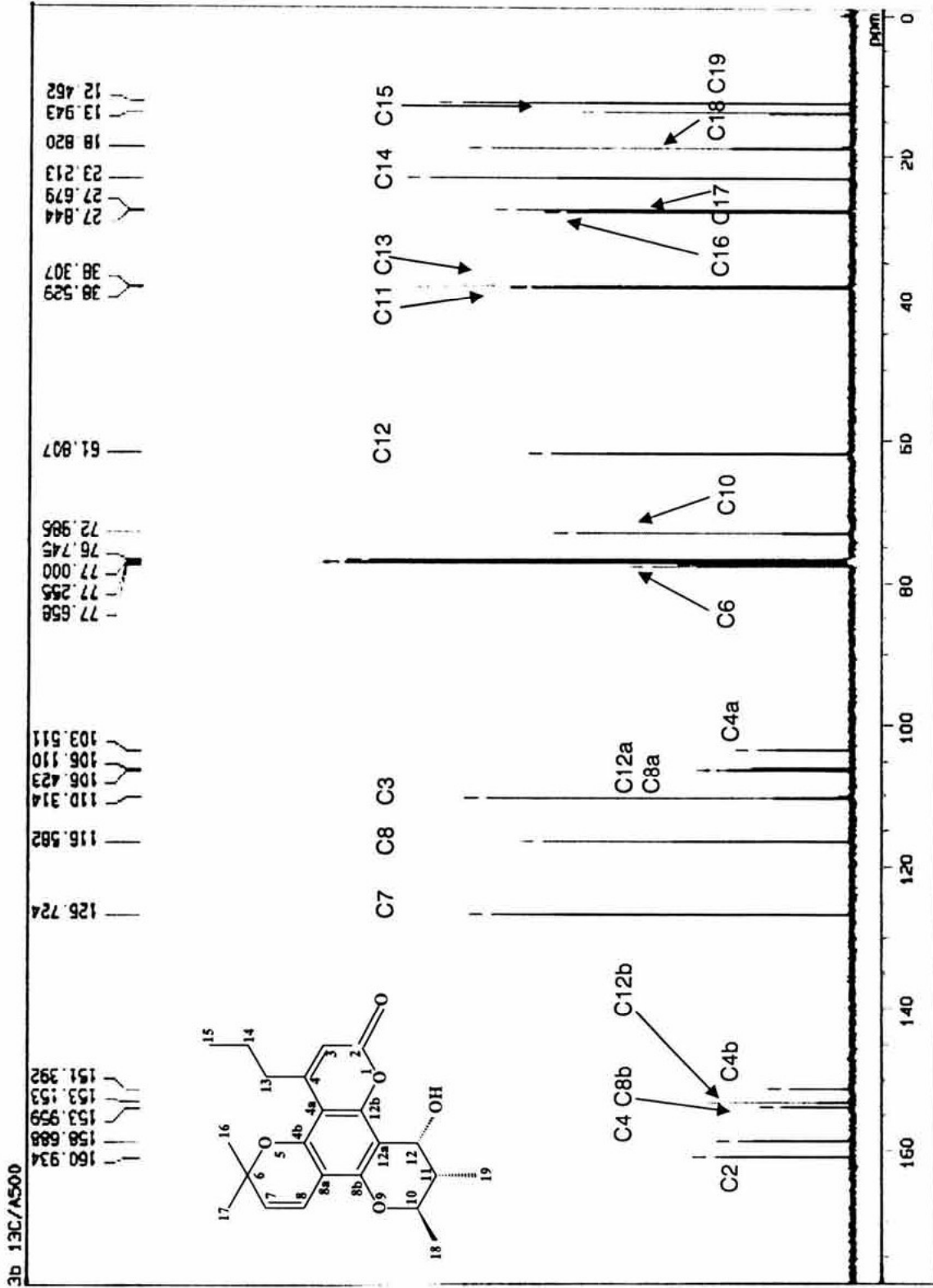
Espectro 12. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del calanólido B (1-3 ppm).

3b 1H/AS00



Espectro 13. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del calanólido B (3.5-7 ppm).

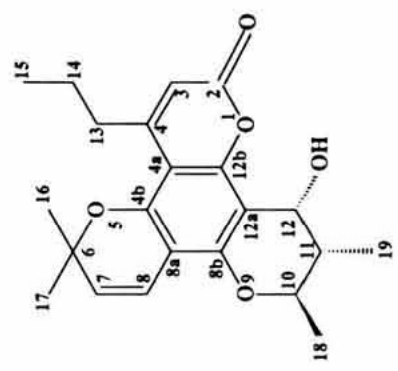
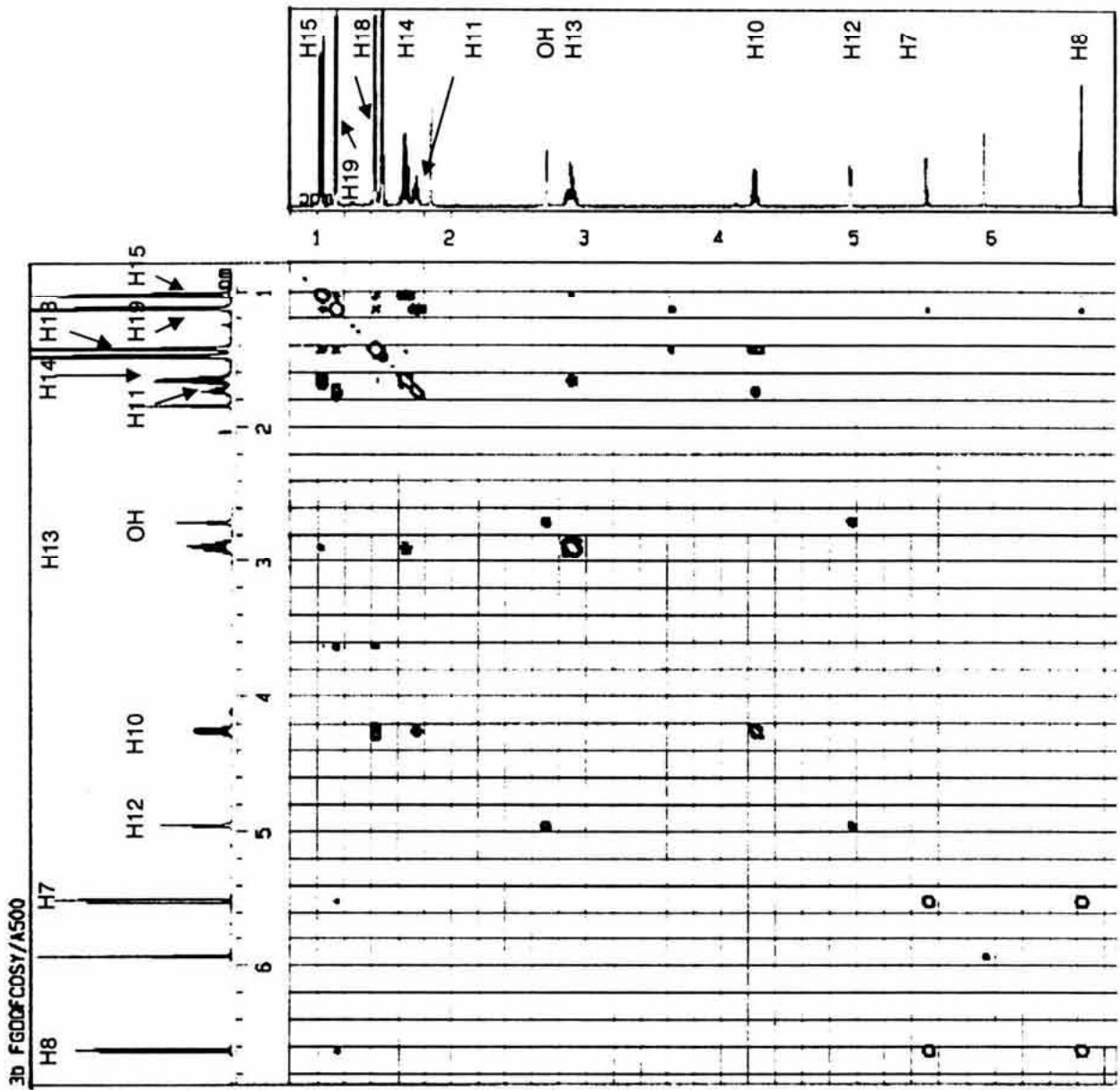
Espectro 14. Espectro de RMN<sup>1</sup>H + D<sub>2</sub>O del calanólido B



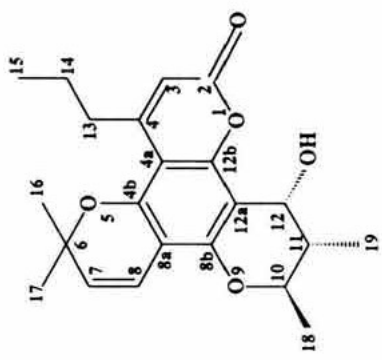
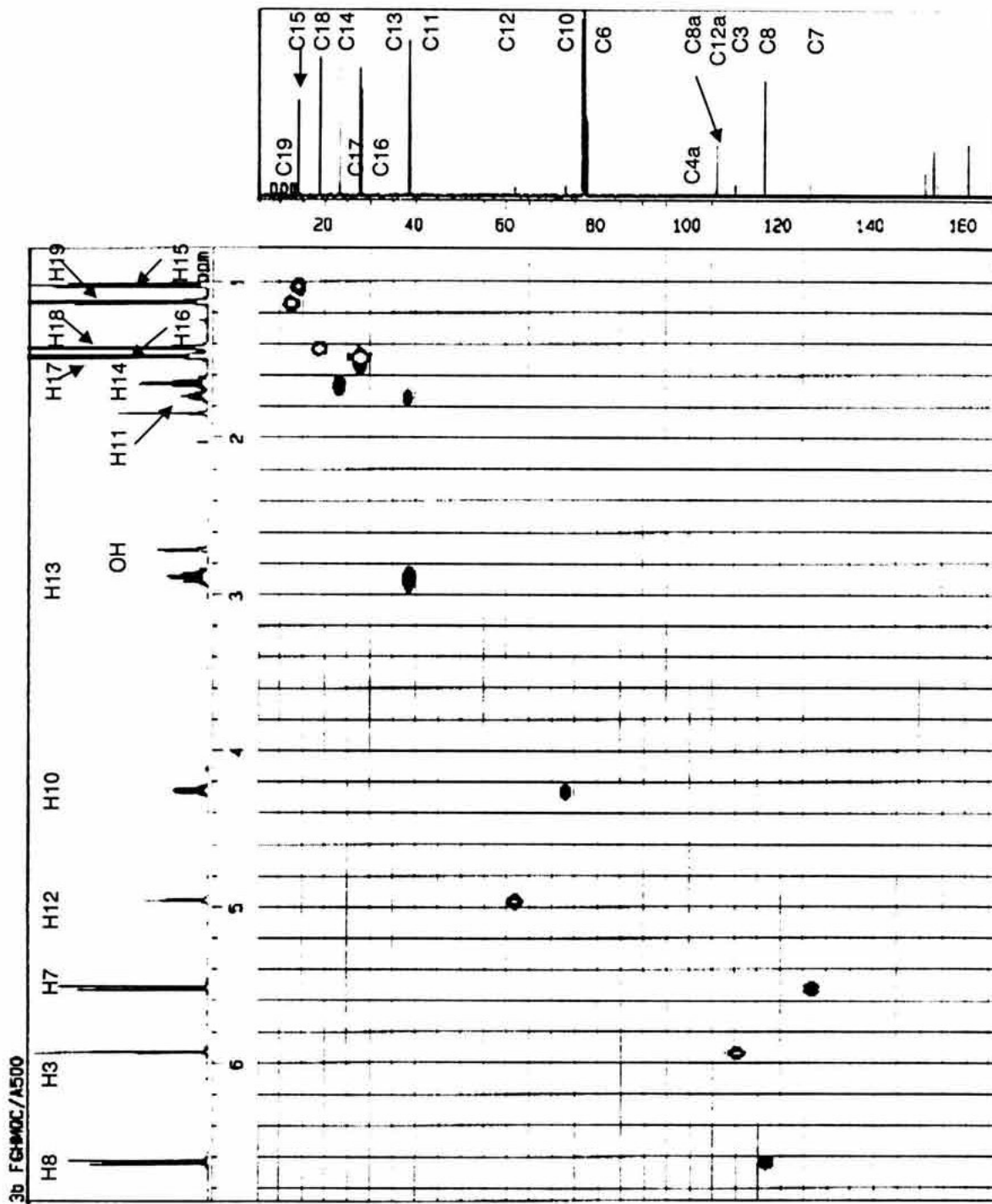
Espectro 15. Espectro de RMN<sup>13</sup>C del calanólido B.



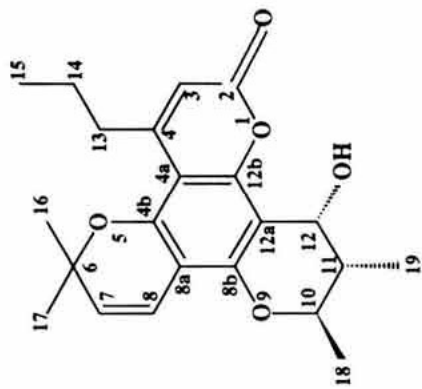
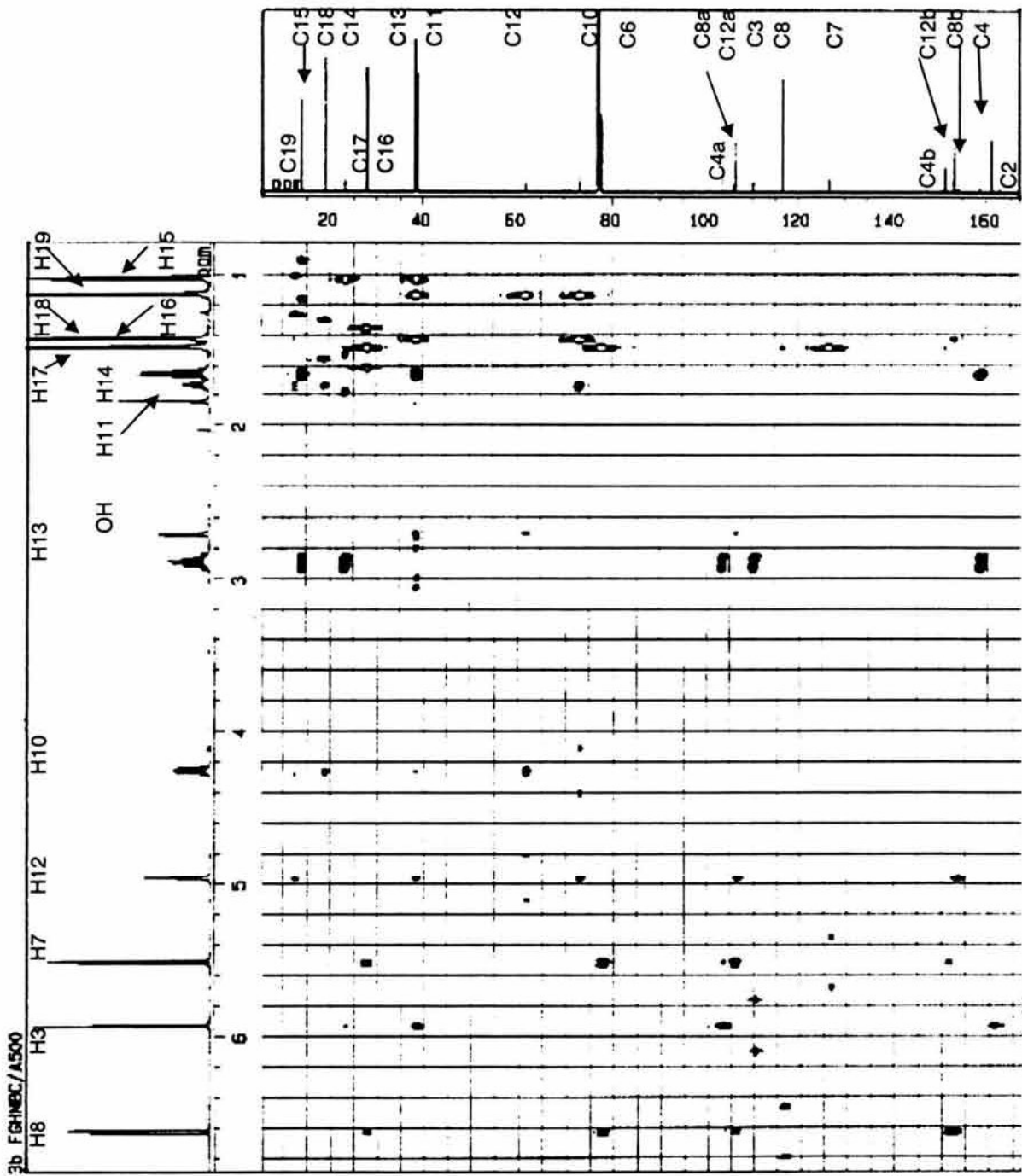




Espectro 17. Espectro COSY del calanolido B.

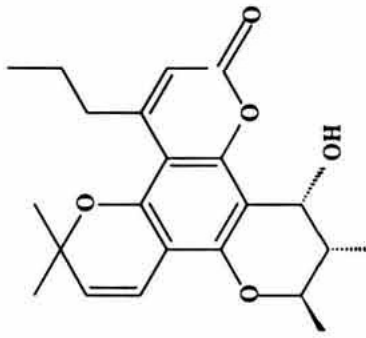
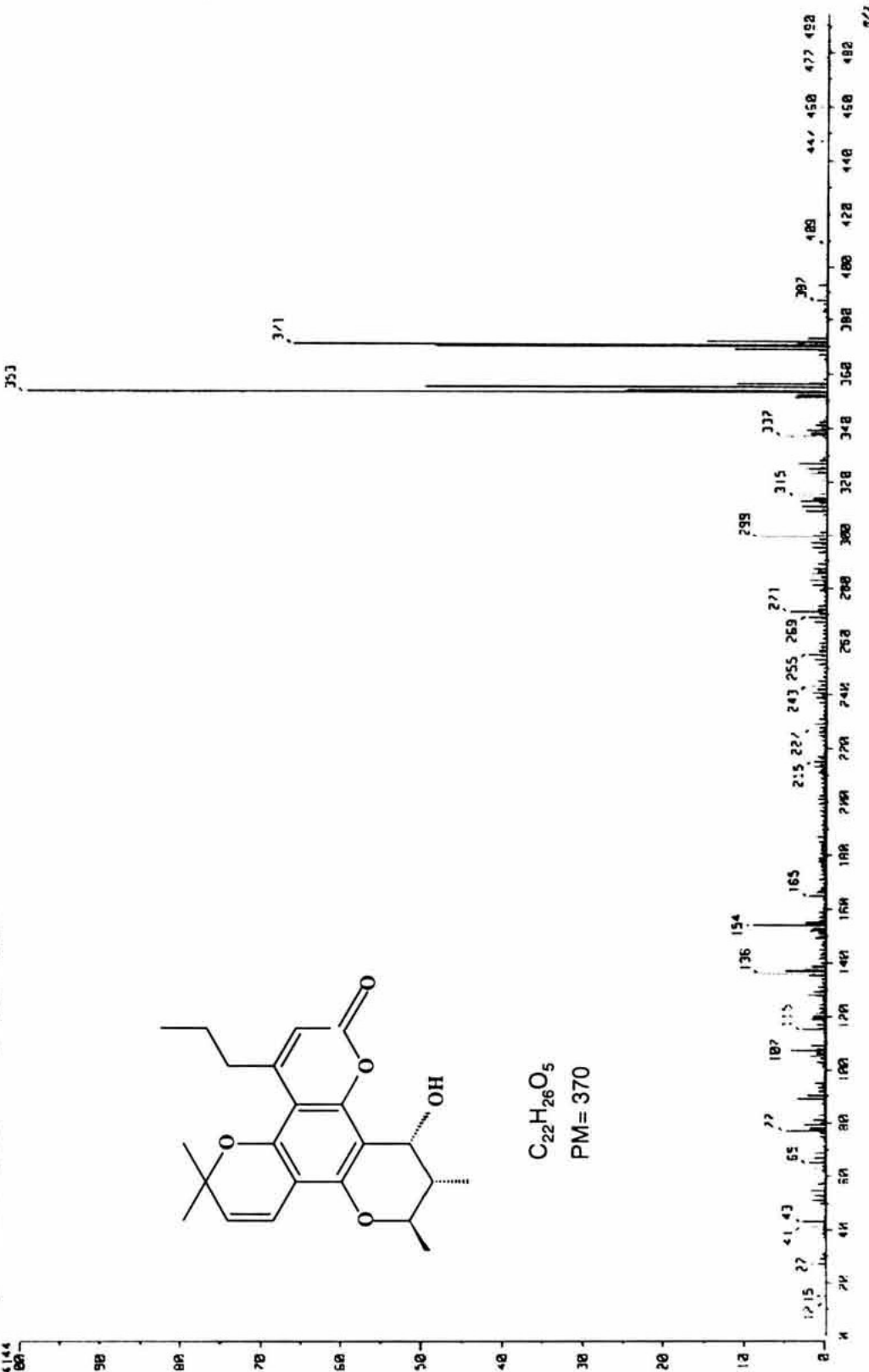


Espectro 18. Espectro HMOC del calanólido B



Espectro 19. Espectro HMBC del calanolido B.

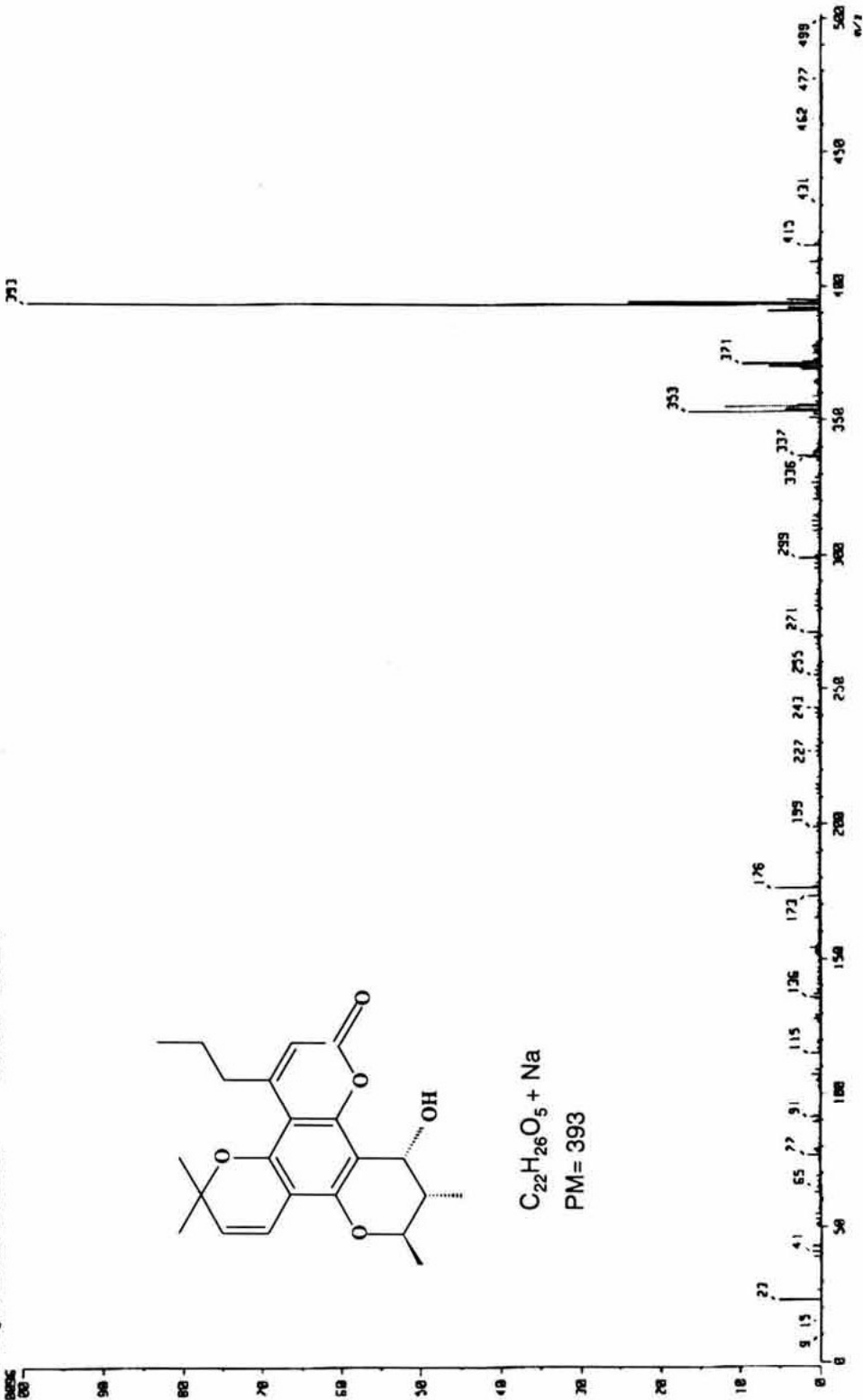
( Mass Spectrum )  
 Date : 15-Feb-2003 16:14  
 Sample: 26(378) --FAB Pos  
 Note : --MSP/OC13  
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB-  
 Spectrum Type : Normal for 194-1, linear  
 RT : 8.58 min Scale : (3,5)  
 BP : 272.353.0000 Int. : 1183.91  
 Output w/z range : 3.0000 to 498.5163 Cut Level : 0.00 x  
 :241414



C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>  
 PM= 370

Espectro 20. Espectro de Masas (FAB) del calanólido B.

[ Mass Spectrum ]  
 Date : 15-Apr-2000 16:17  
 Sample: 3613781-Ma----F7B Pos  
 Note : --NRPV-C13  
 Inlet : Direct (Ion Mode : F7B)  
 Spectrum Type : Normal Ion (F7-Linear)  
 RT : 0.58 min Scan# : (3,6)  
 BP : m/z 353.0000 Int. : 642.79  
 Output m/z range : 0.0000 to 561.4837 Cut Level : 0.000 %  
 6748056

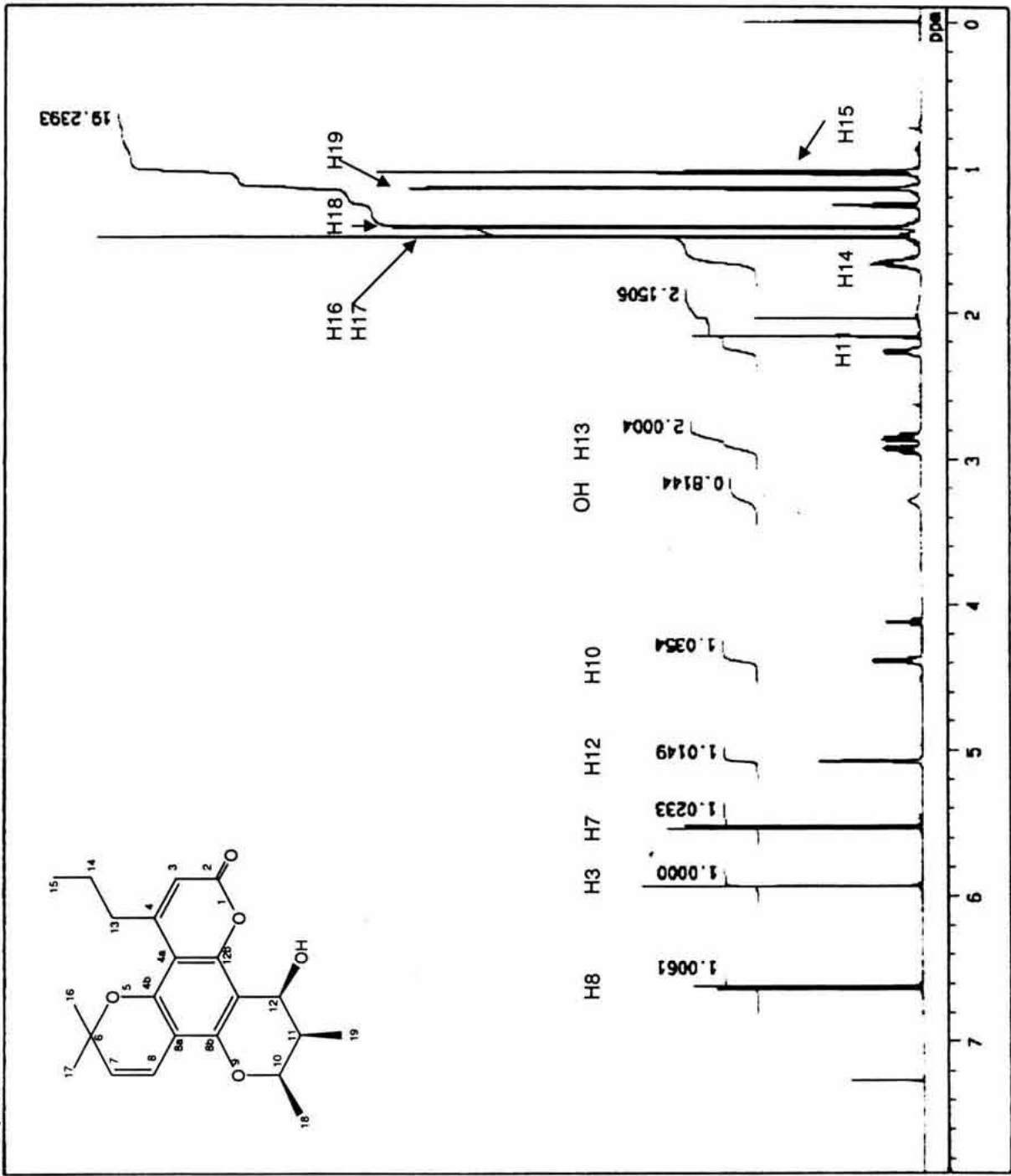


$C_{22}H_{26}O_5 + Na$   
 PM= 393

Espectro 21. Espectro de Masas (HR-FAB+ Na) del calanólido B.

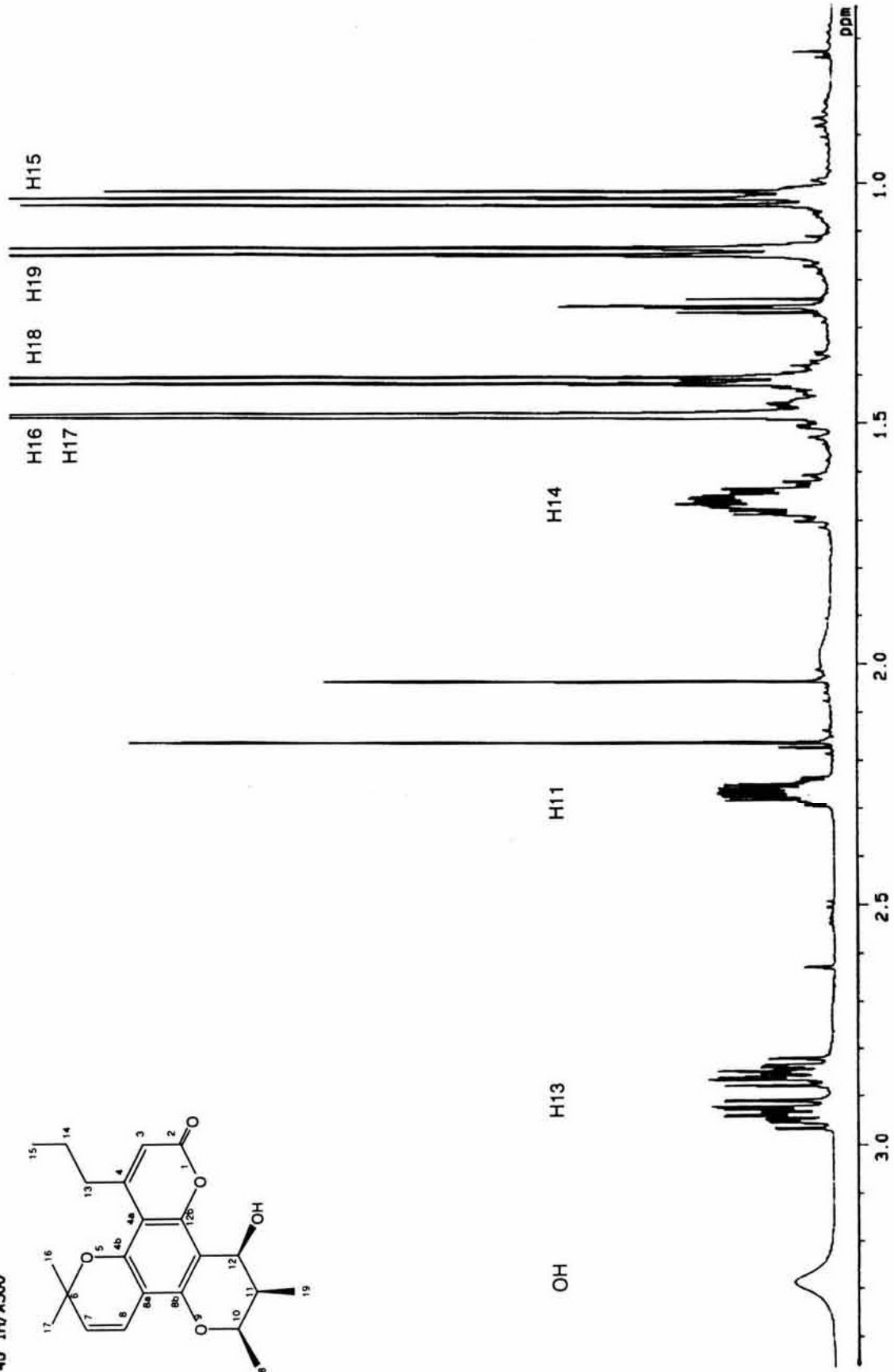
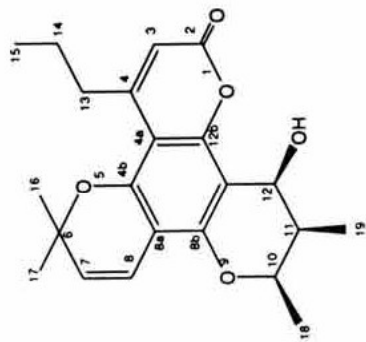


4b. 1H/A500

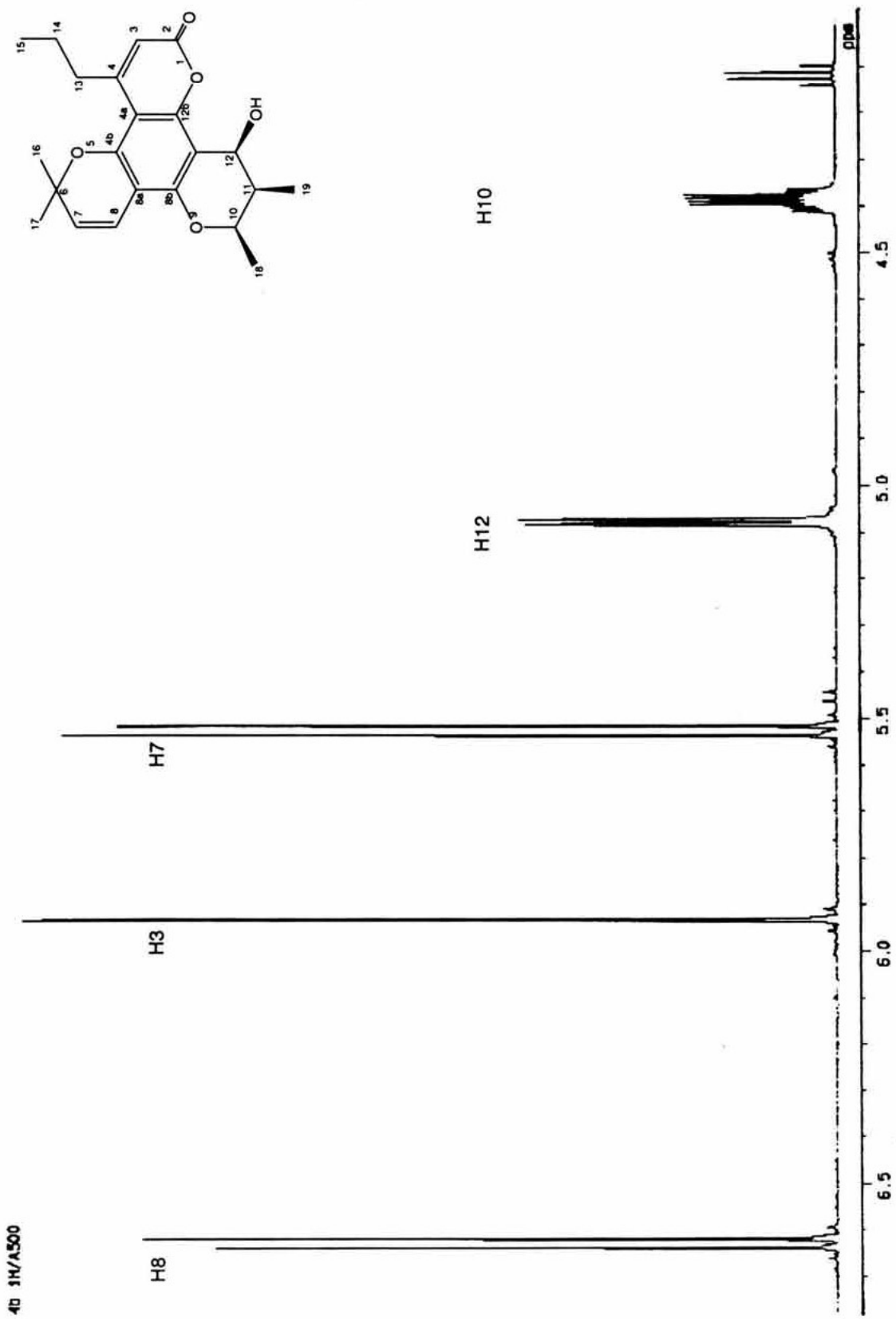


Espectro 22. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del calanólido C.

4b 1H/A500

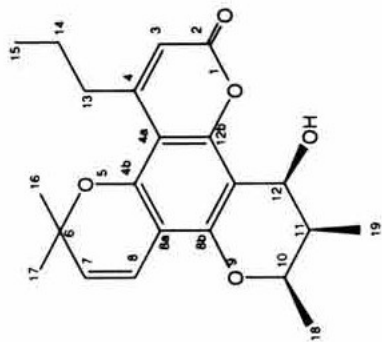
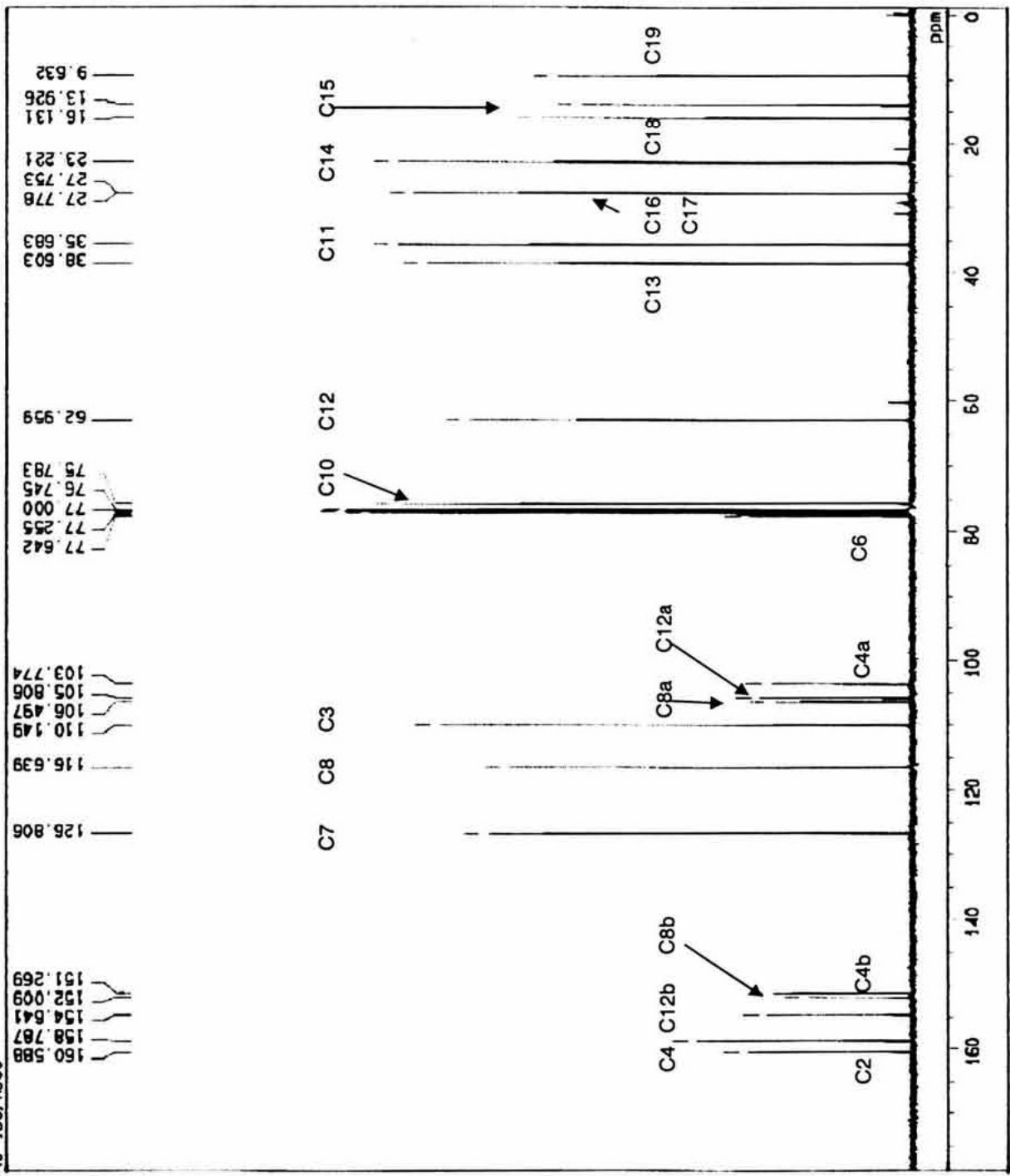


Espectro 23. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del calanólido C (1-3.5 ppm).

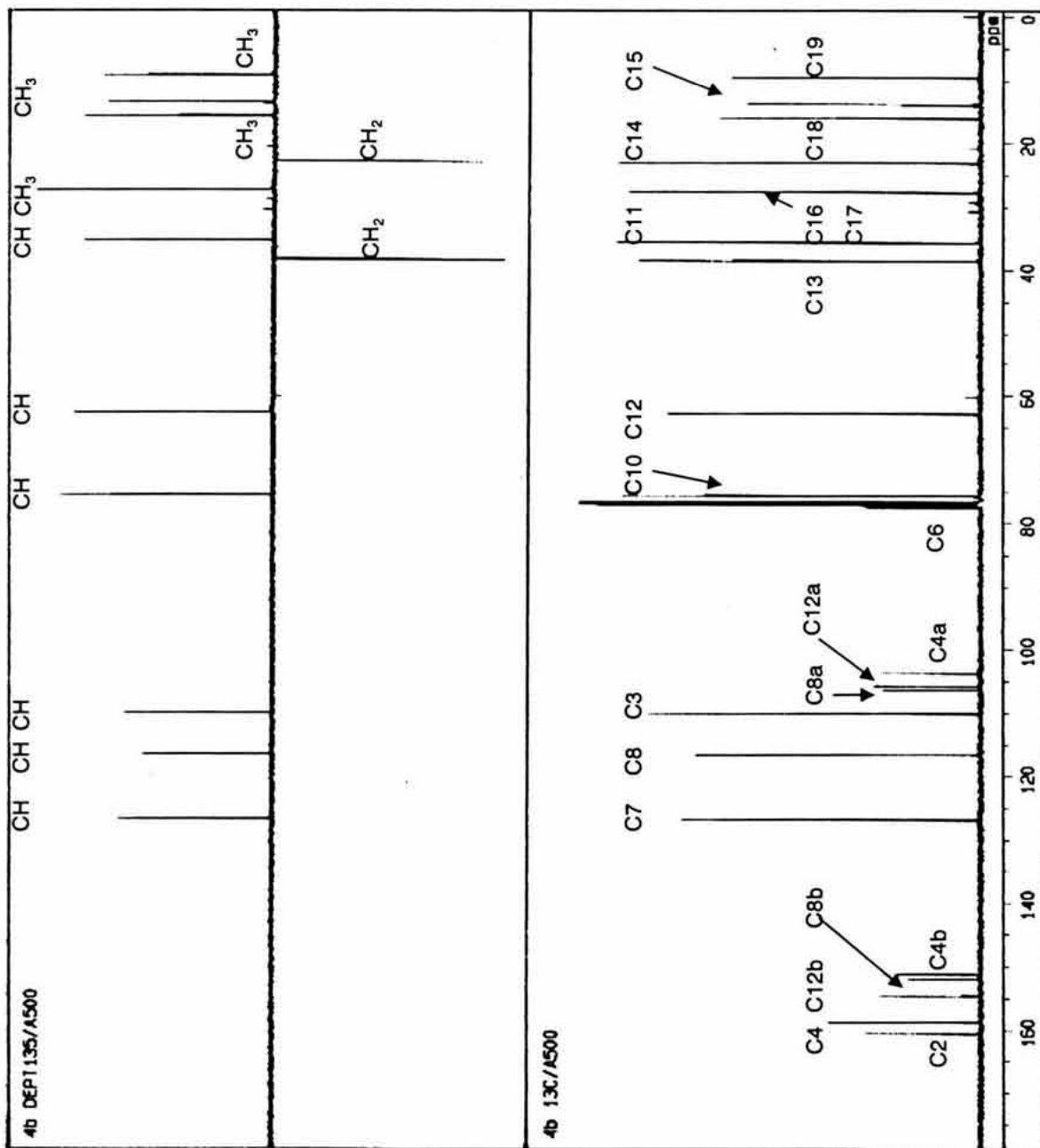
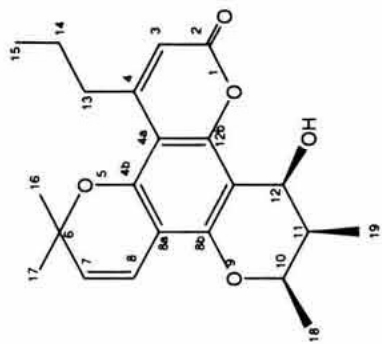


Espectro 24. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del calanólido C (4-7 ppm).

4b 13C/A500

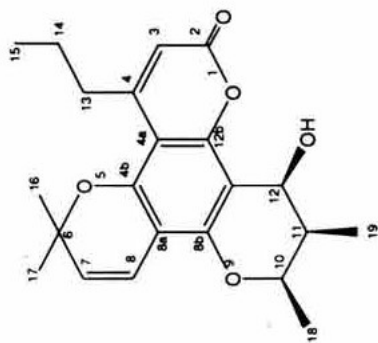
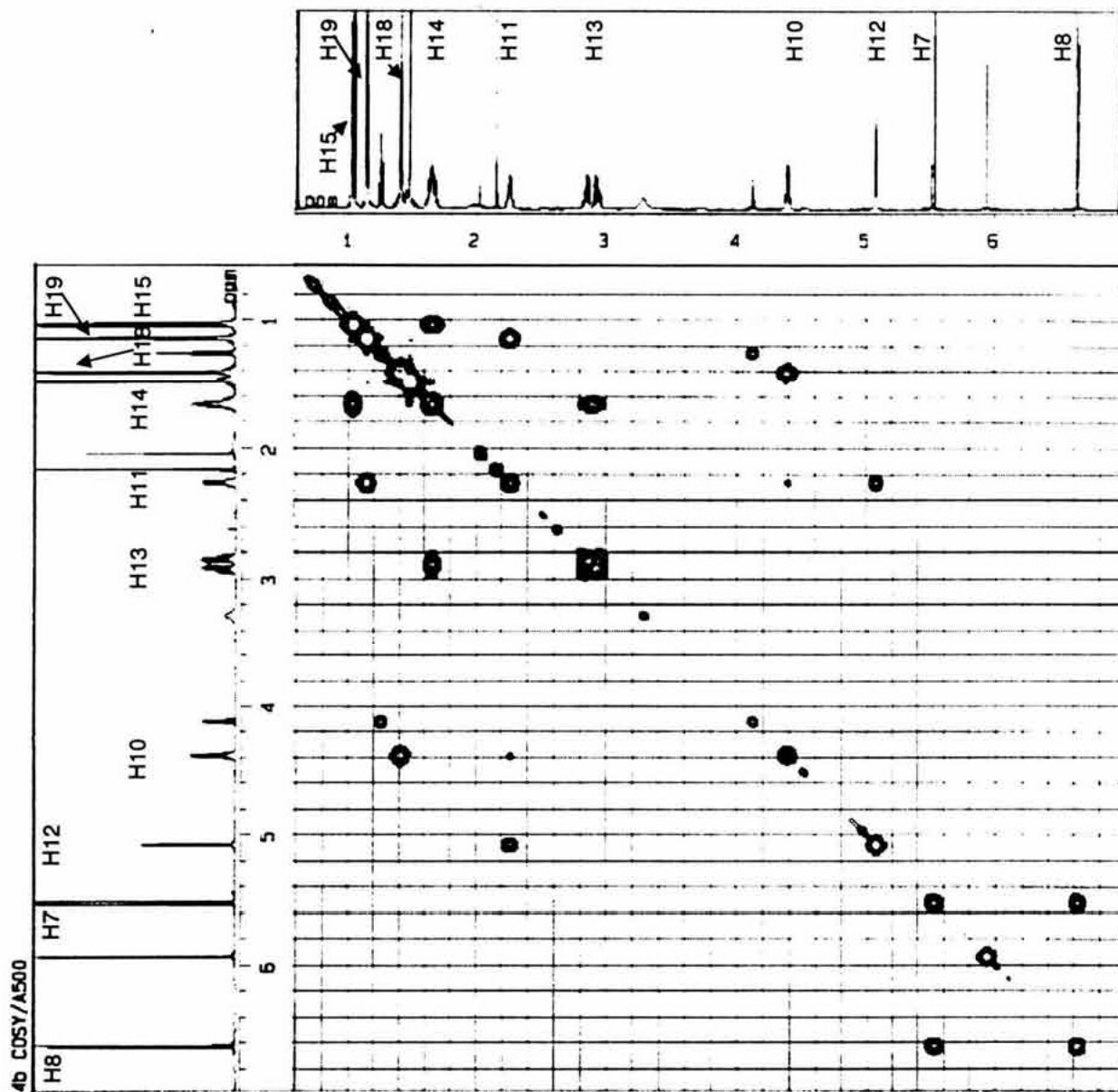


Espectro 25. Espectro de RMN<sup>13</sup>C del calanolido C.

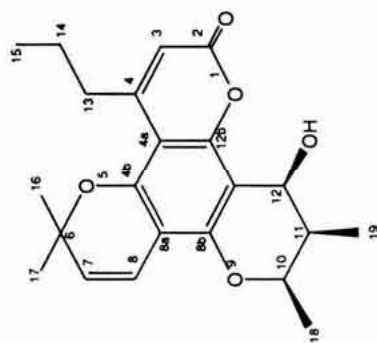
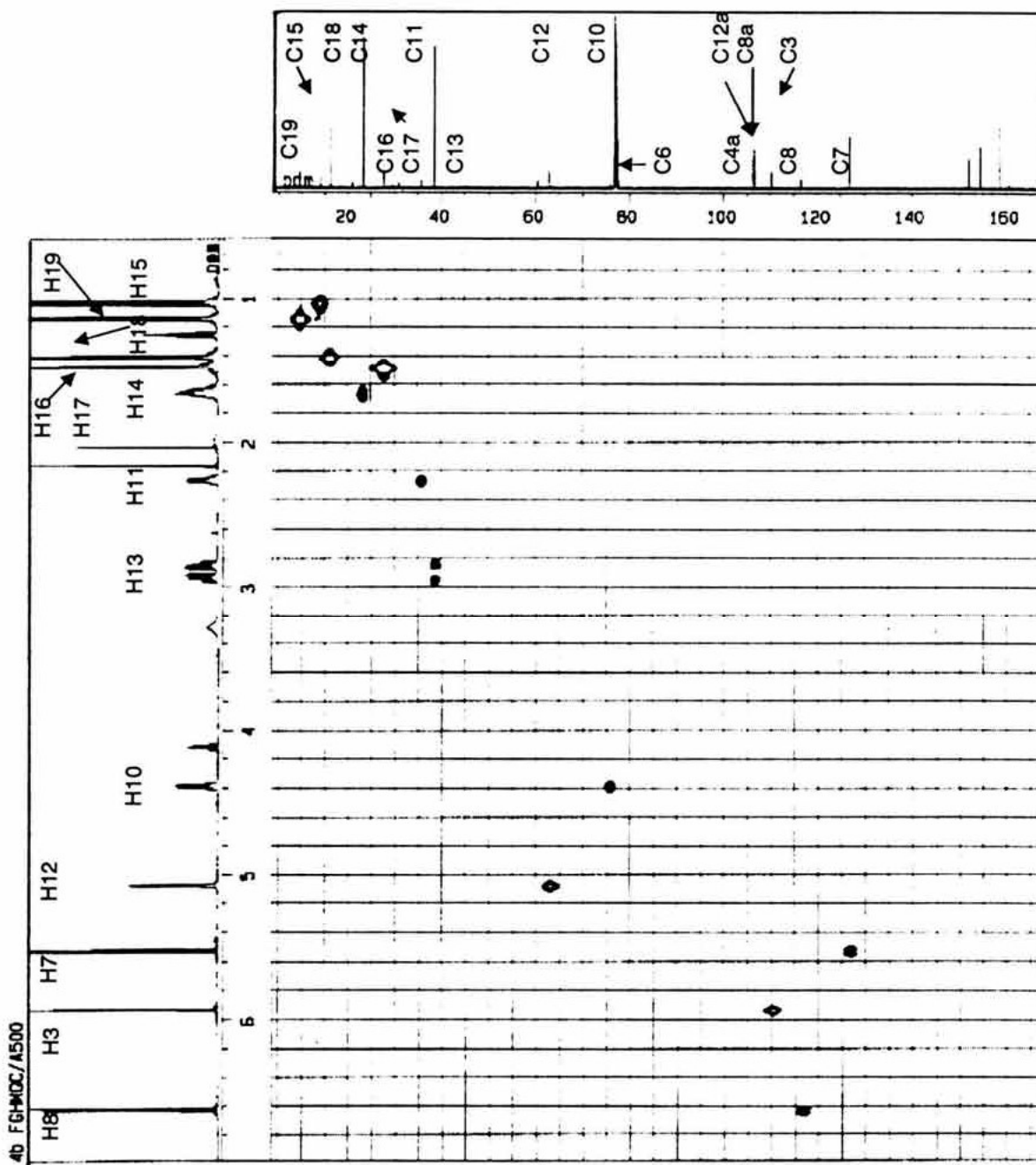


Espectro 26. Espectro DEPT del calanolido C.

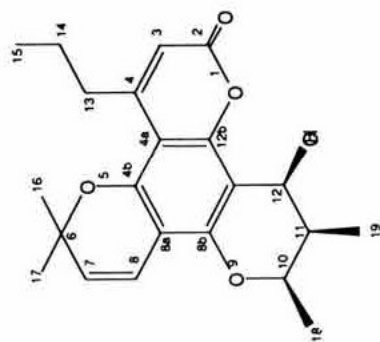
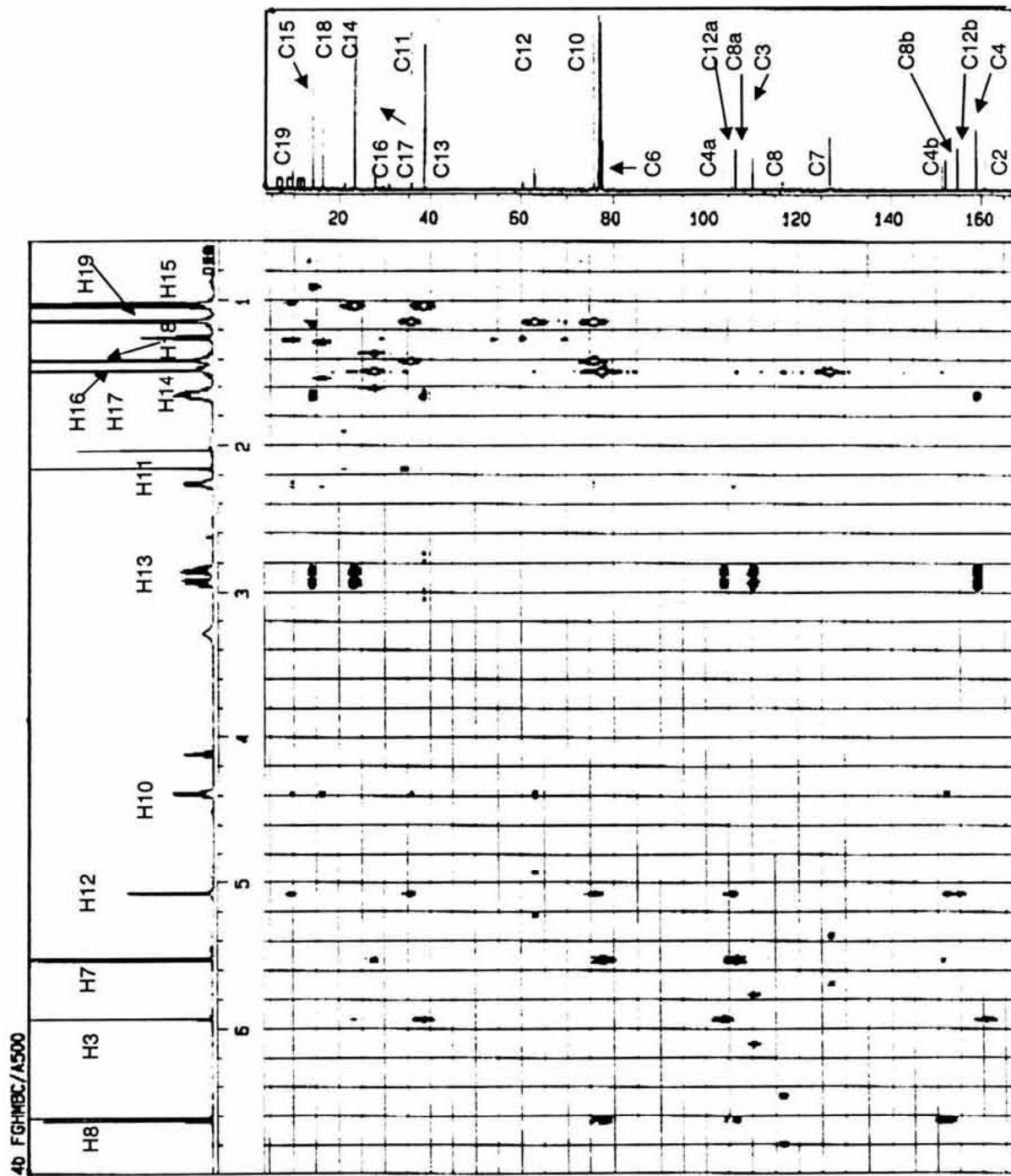




Espectro 27. Espectro COSY del calanolido C.

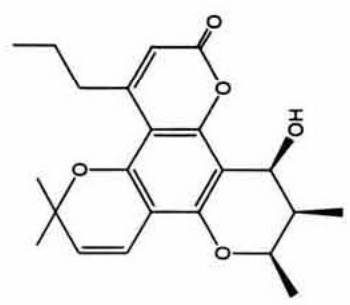


Espectro 28. Espectro HMOC del calanolido C.

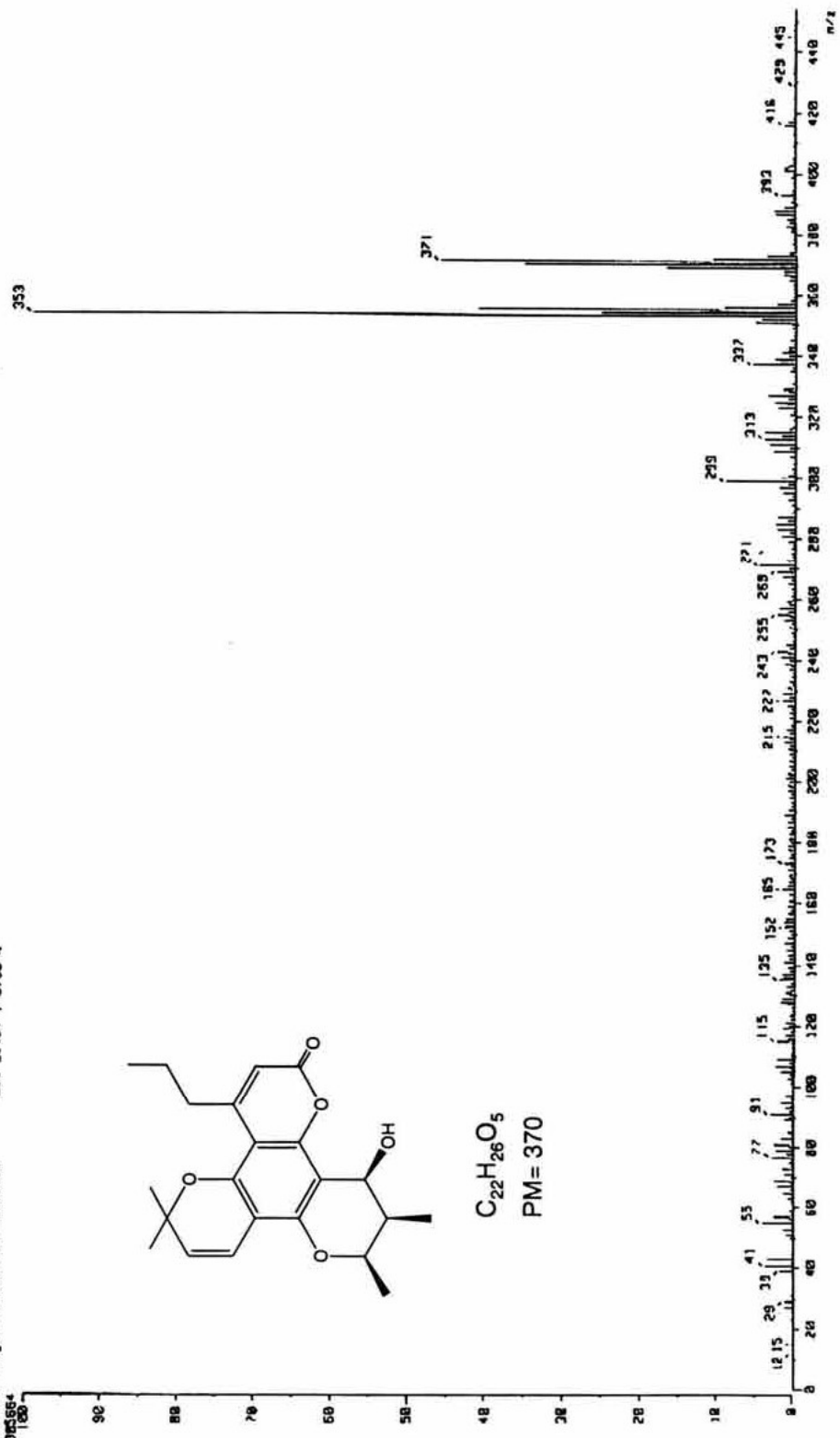


Espectro 29. Espectro HMBC del calanolido C.

( Mass Spectrum )  
 Date : 13-May-2003 16:51  
 Sample: 4a(378)----FAB Pos  
 Note : m-NBVDK13  
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+  
 Spectrum Type : Normal Ion [M<sup>+</sup>-Linear]  
 RT : 0.58 min Scan# : (3,6)  
 BP : m/z 353.8228 Int. : 1269.83  
 Output m/z range : 0.0000 to 451.8653 Cut Level : 0.00 x  
 13362564

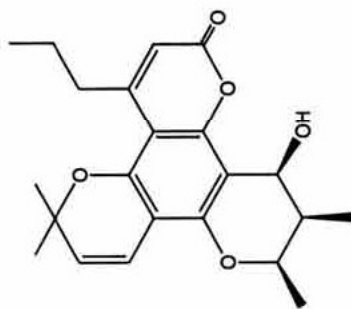
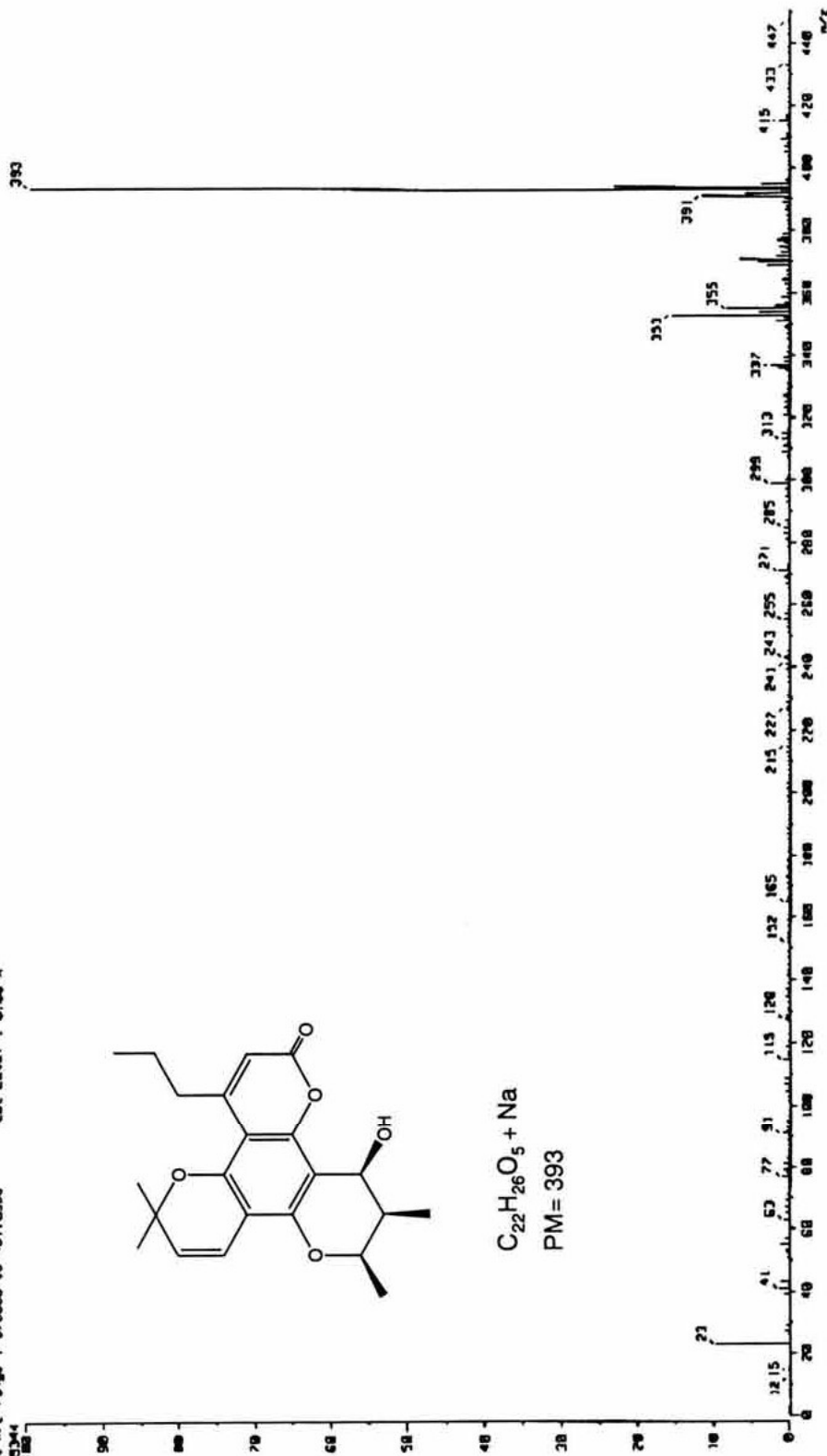


$C_{22}H_{26}O_5$   
 PM= 370



Espectro 30. Espectro de Masas (FAB) del calanólido C.

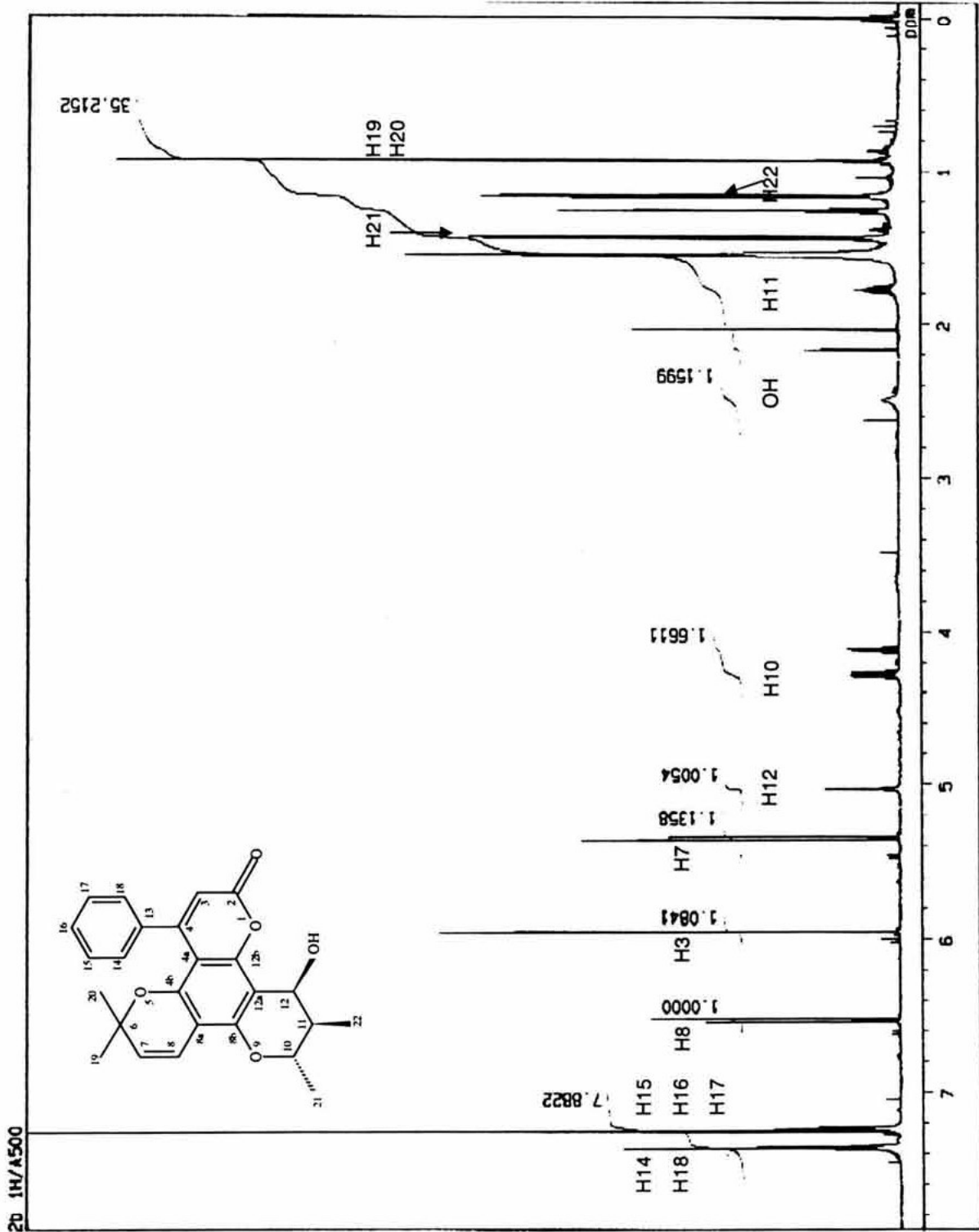
( Mass Spectrum )  
 Date : 13-May-2003 16:53  
 Data : MSY004  
 Sample: 4b(178)1-ma-----FAB Pos  
 Name : m-NBVO-C13  
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+  
 Spectrum Type : Normal Ion (CF<sub>3</sub>-Linear)  
 RT : 9.58 min Scan# : 12,61  
 BP : m/z 353.0000 Int. : 1362.74  
 Output m/z range : 0.0000 to 451.0336 Cut Level : 0.00 x  
 1428334



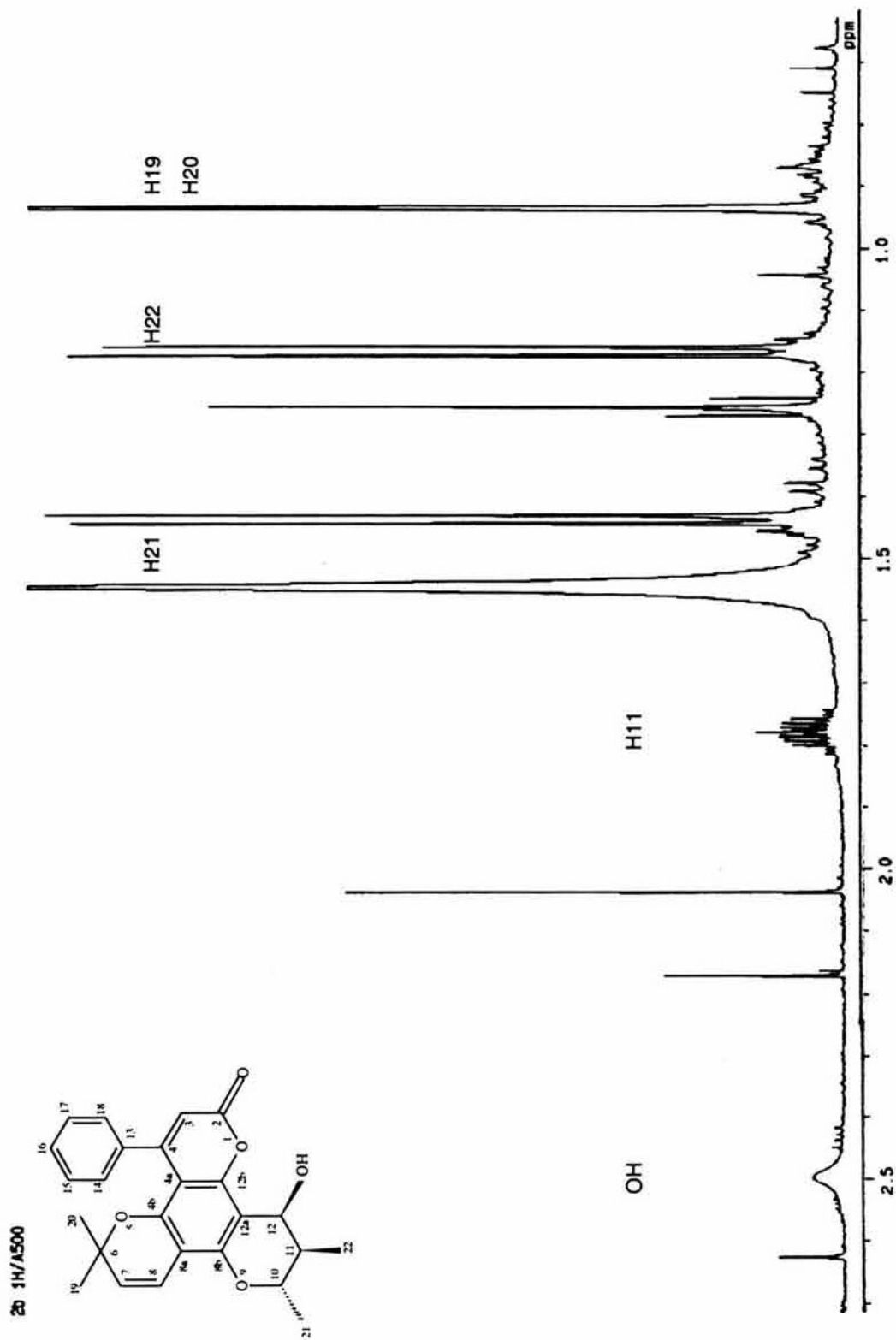
C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub> + Na  
 PM= 393

Espectro 31. Espectro de Masas (HR-FAB+ Na) del calanólido C.

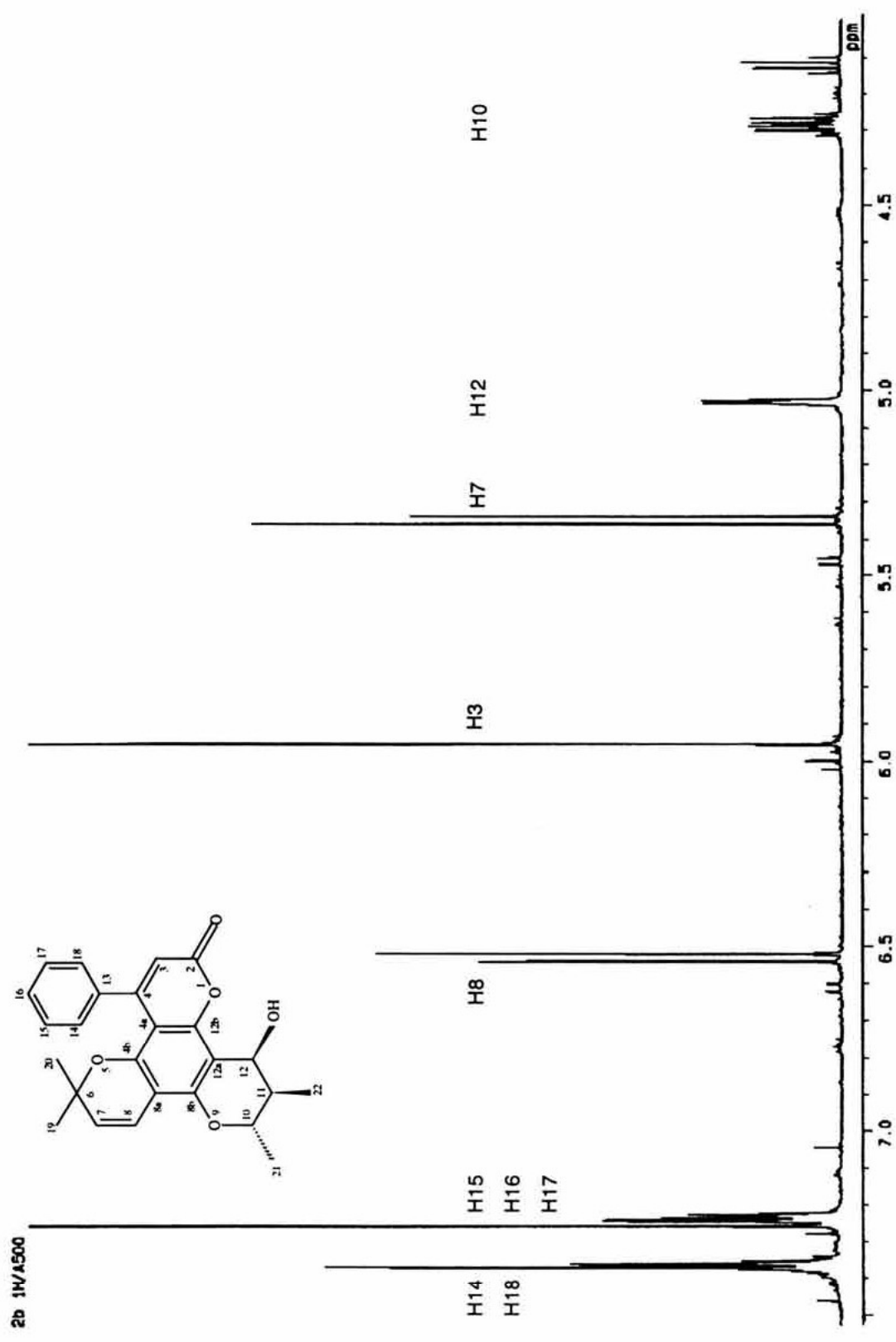




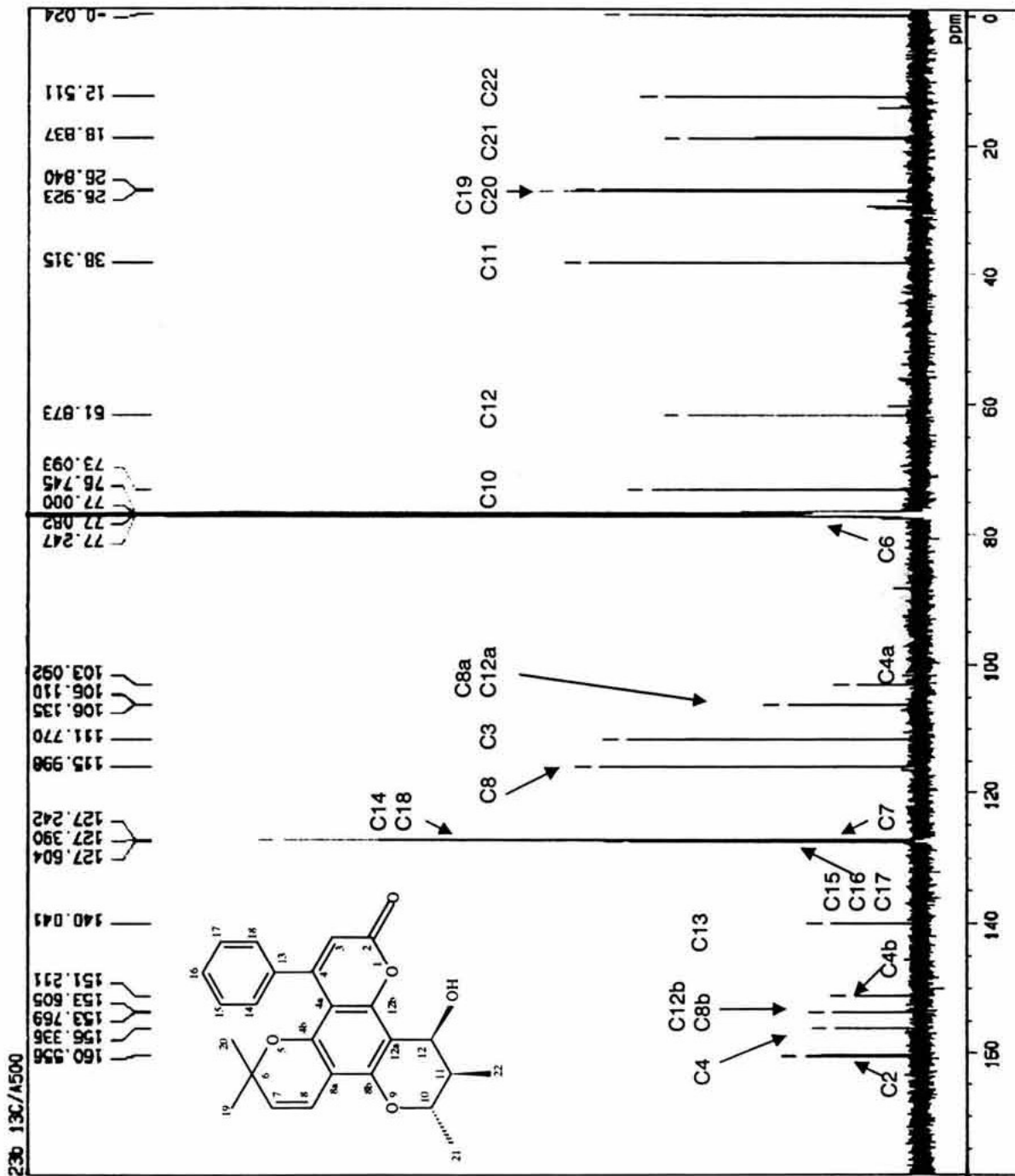
Espectro 32. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del soulatrólido.



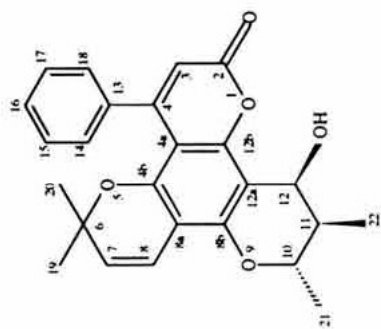
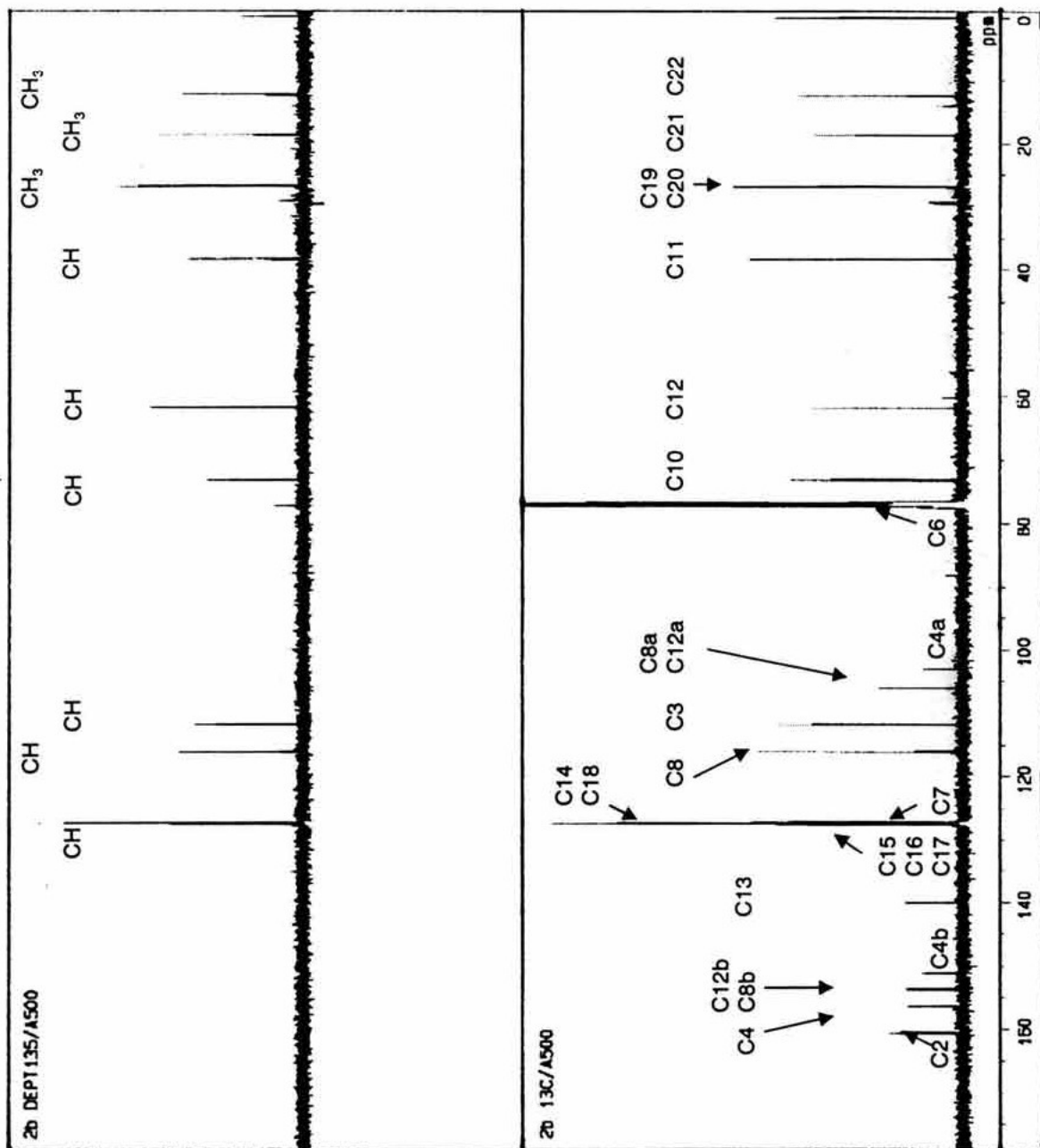
Espectro 33. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del soulatrónido (1-3 ppm).



Espectro 34. Ampliación del espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  del soulatrólido (4-8 ppm).

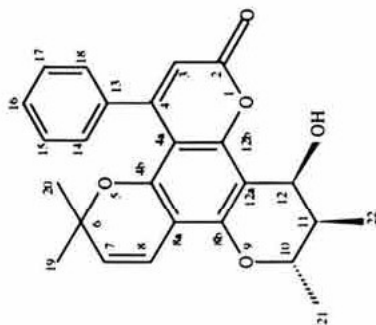
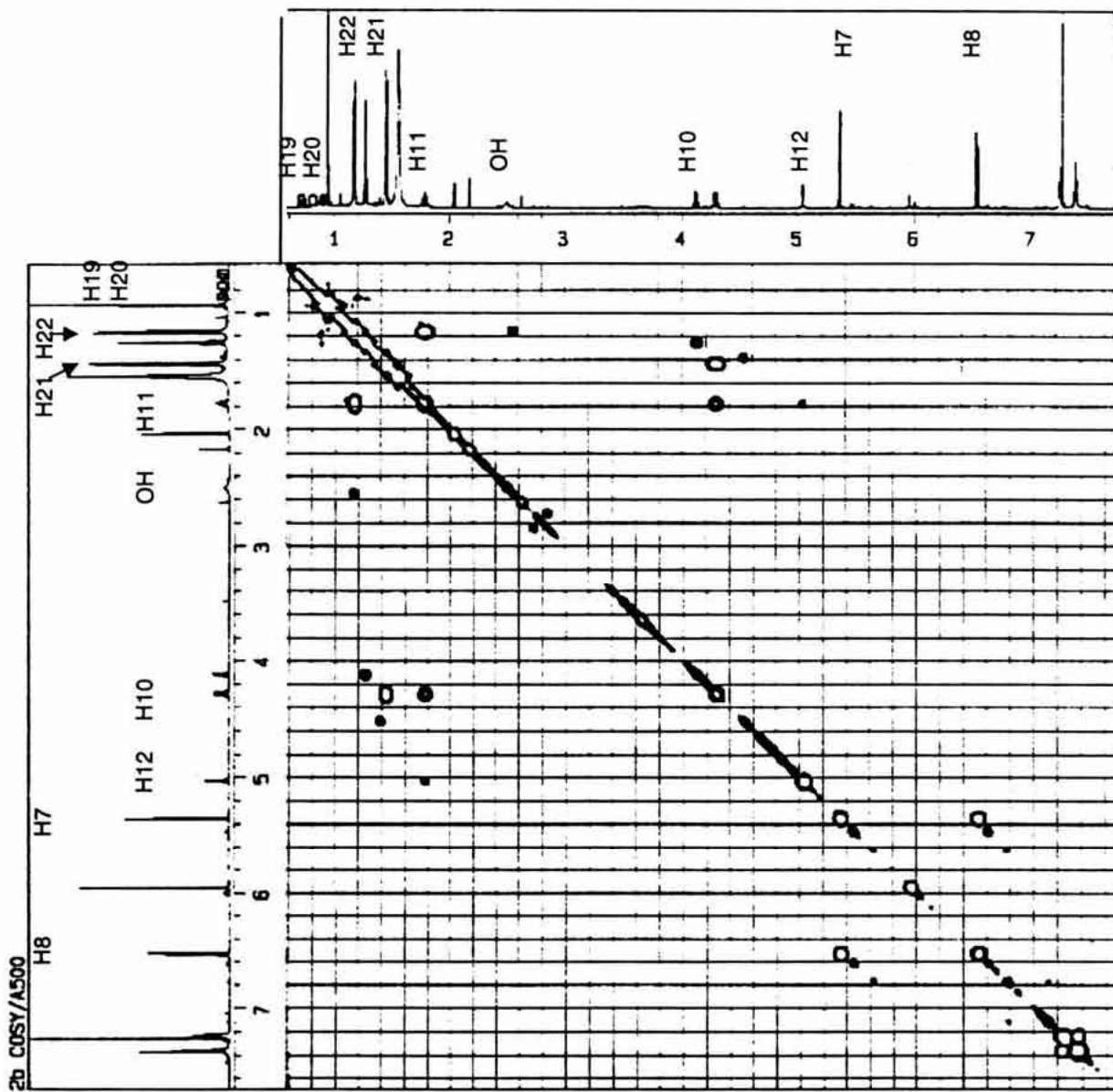


Espectro 35. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$  del soualtrólide.

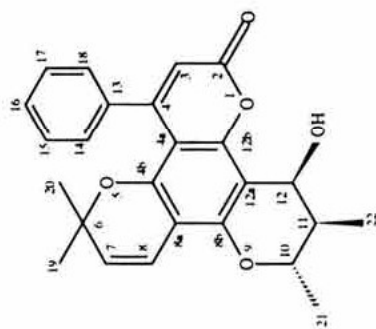
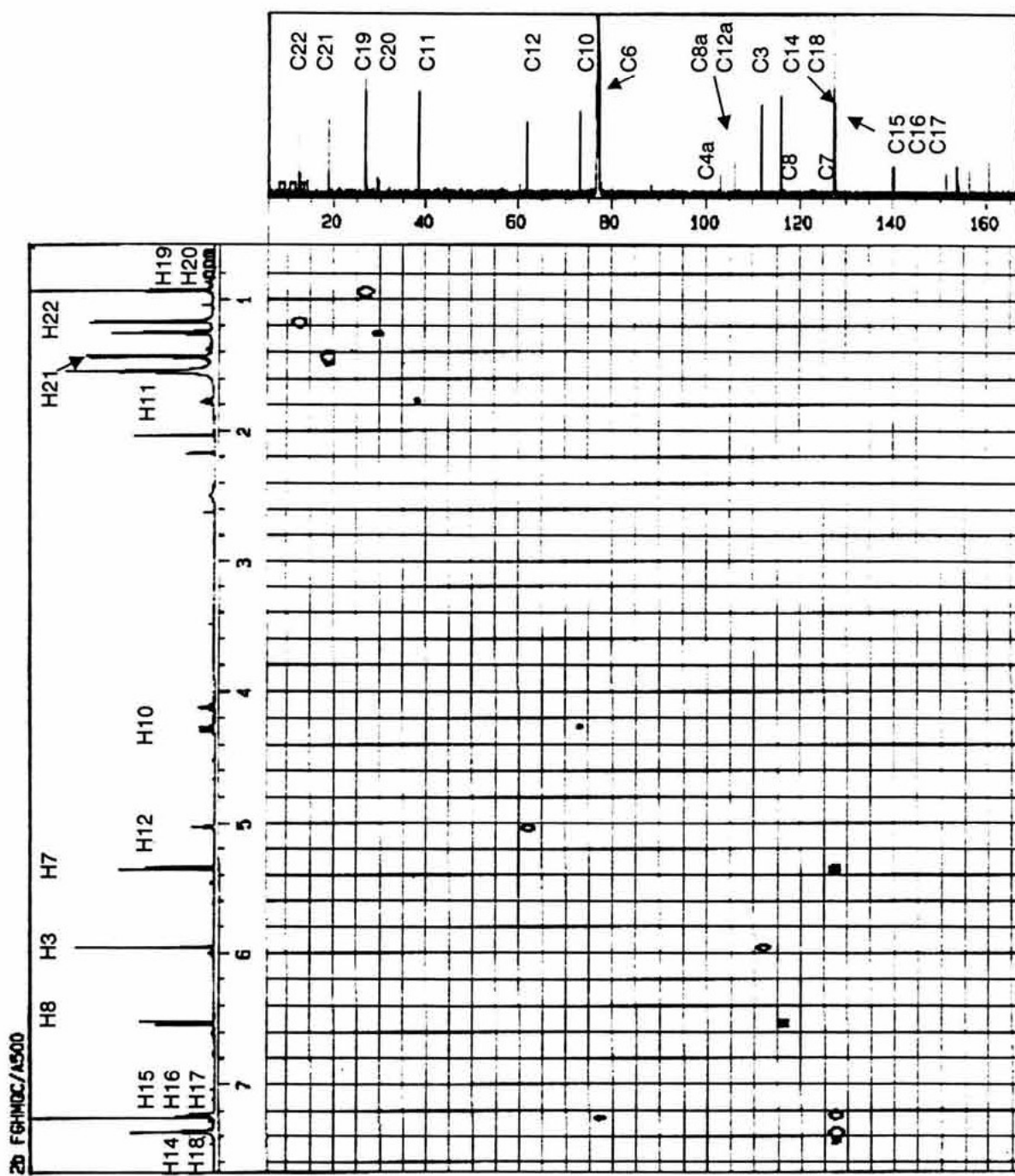


Espectro 36. Espectro DEPT del soulatrólido.

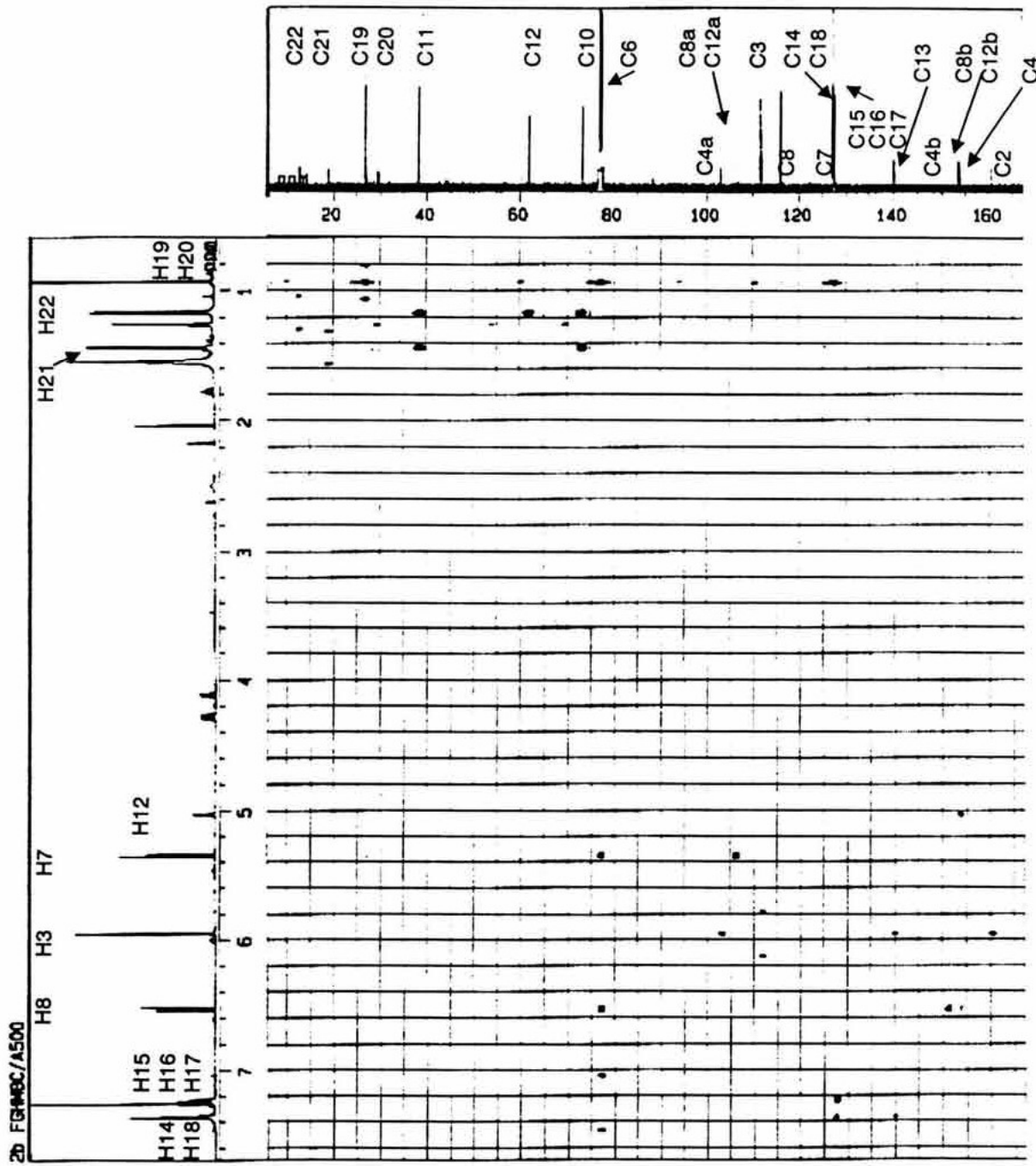




Espectro 37. Espectro COSY del soulatrolido.

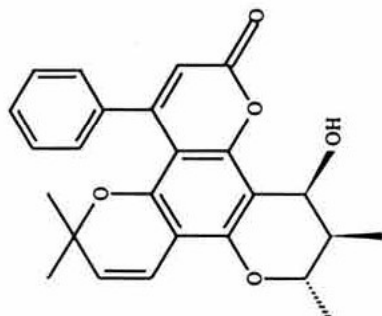
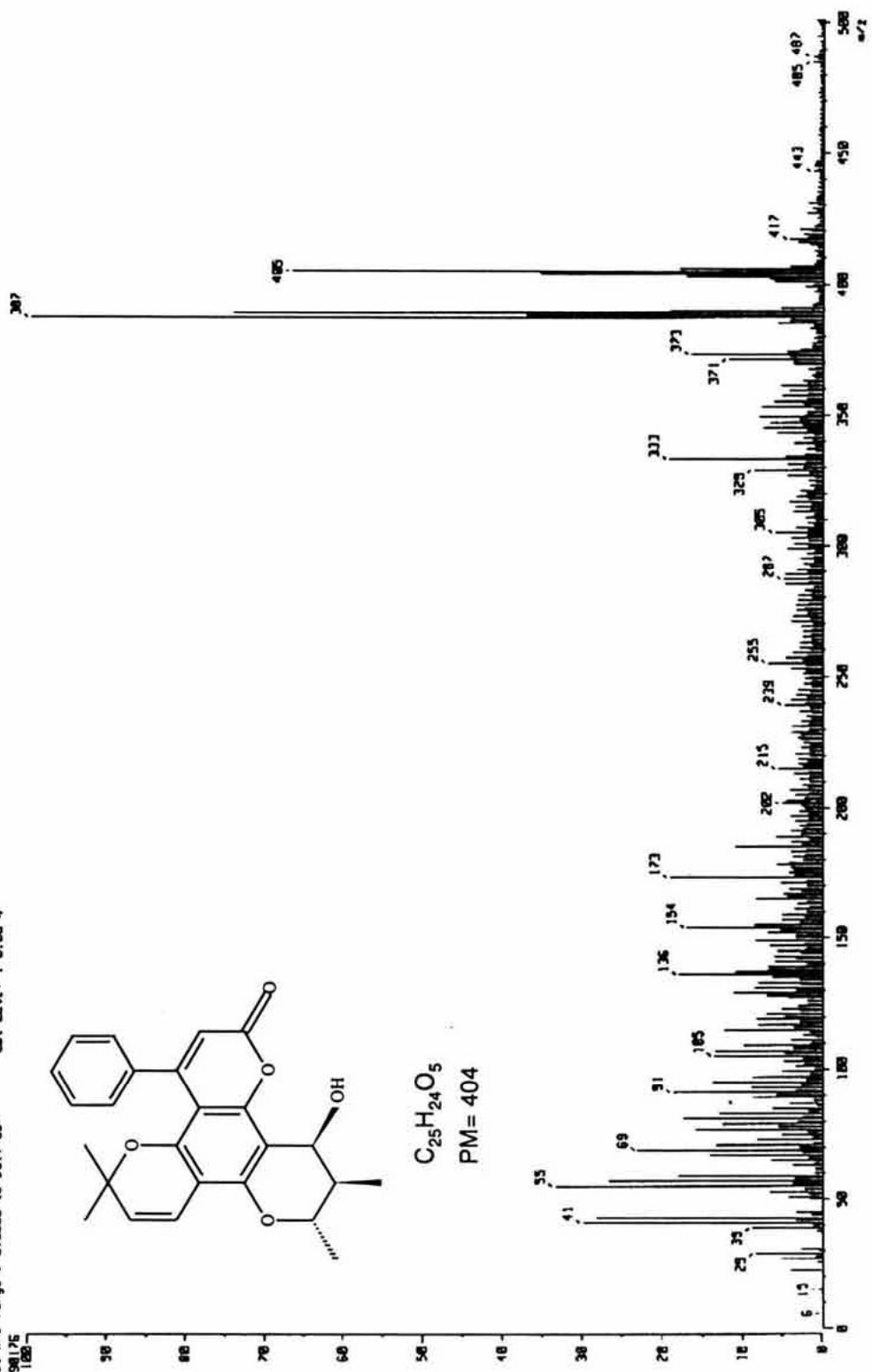


Espectro 38. Espectro HMQC del soulatrónido.



Espectro 39. Espectro HMBC del soulatrolido.

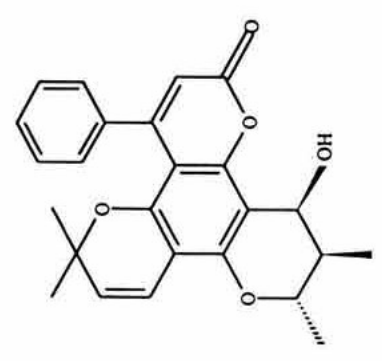
( Mass Spectrum )  
 Date : 13-May-2003 15:46  
 Sample: Ph(4M)-----F78 Pos  
 Note : -NBN/DC13  
 Inlet : Direct [Ion Mode : F78+]  
 Spectrum Type : Normal Ion [W-L:linear]  
 RT : 0.58 min Scans : (3,6)  
 SR : m/z 307.8000 Int. : 485.14  
 Output m/z range : 6.0000 to 581.4837  
 4258125 Cut Level : 0.000 x



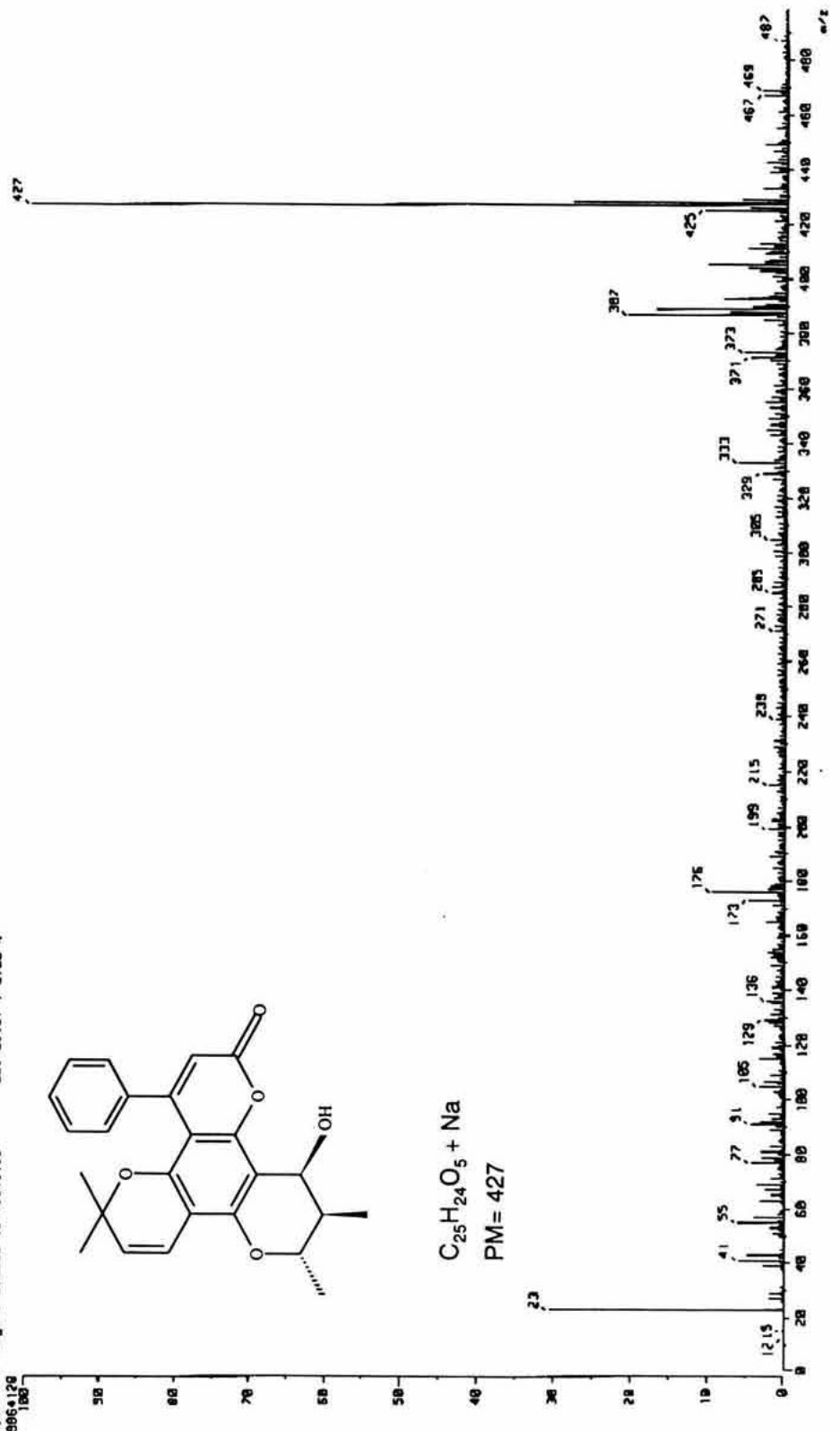
$C_{25}H_{24}O_5$   
 PM = 404

Espectro 40. Espectro de Masas (FAB) del soulatrólido.

Mass Spectrum 1  
 date : May882  
 sample: 2b(484).mg----FAB Pos  
 site : emhp/CVC13  
 plot : Direct  
 Ion Mode : FRB+  
 spectrum type : Normal Ion (M<sup>+</sup>-L, near)  
 F : 8.50 min  
 Scans : (3,6)  
 P : m/z 427.80288 Int. : 948.72  
 v/out m/z range : 0.00000 to 498.5163  
 9964126  
 Cut Level : 0.00 %



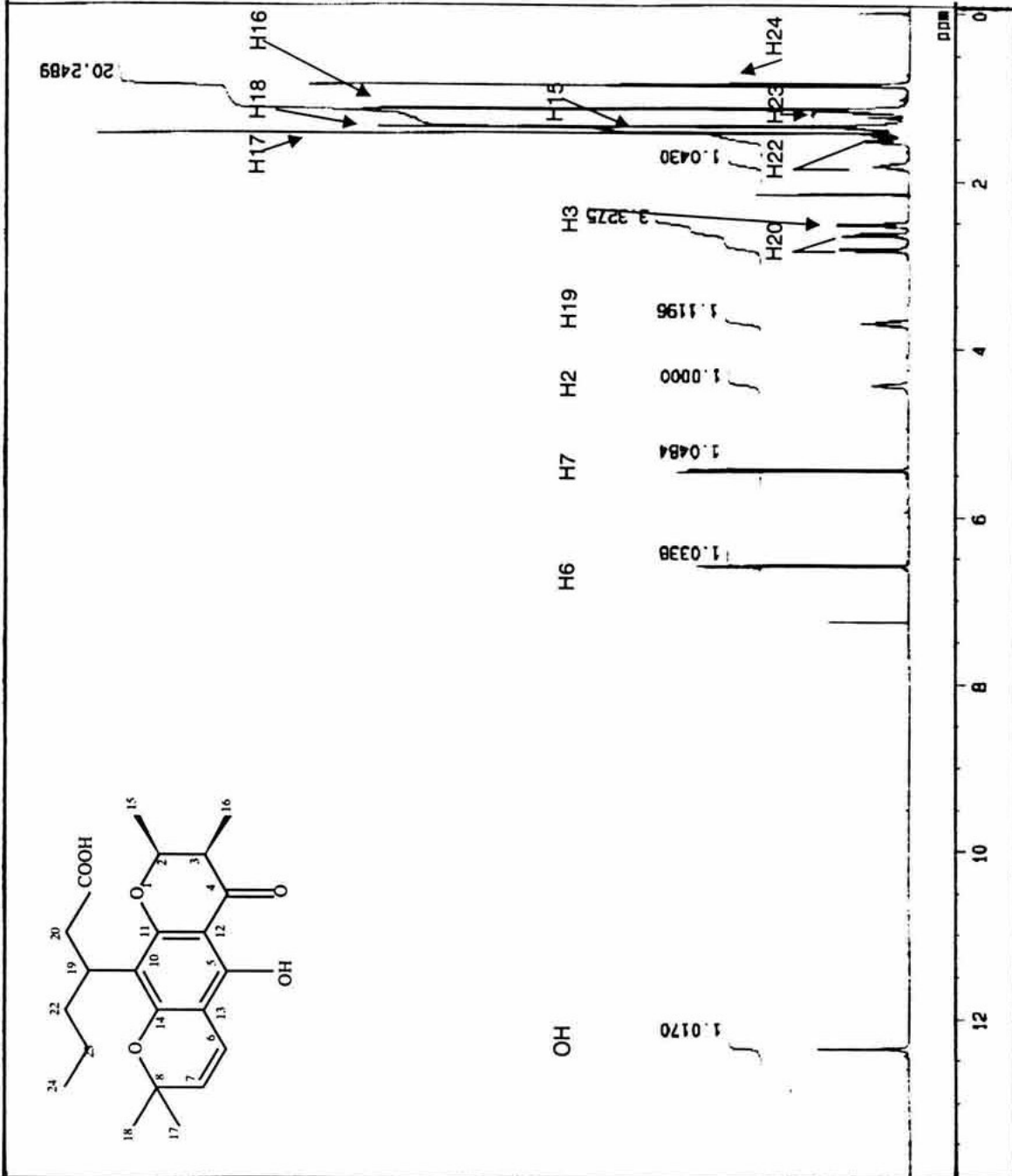
$C_{25}H_{24}O_5 + Na$   
 PM= 427



Espectro 41. Espectro de Masas (HR-FAB+ Na) del soulatrórido.

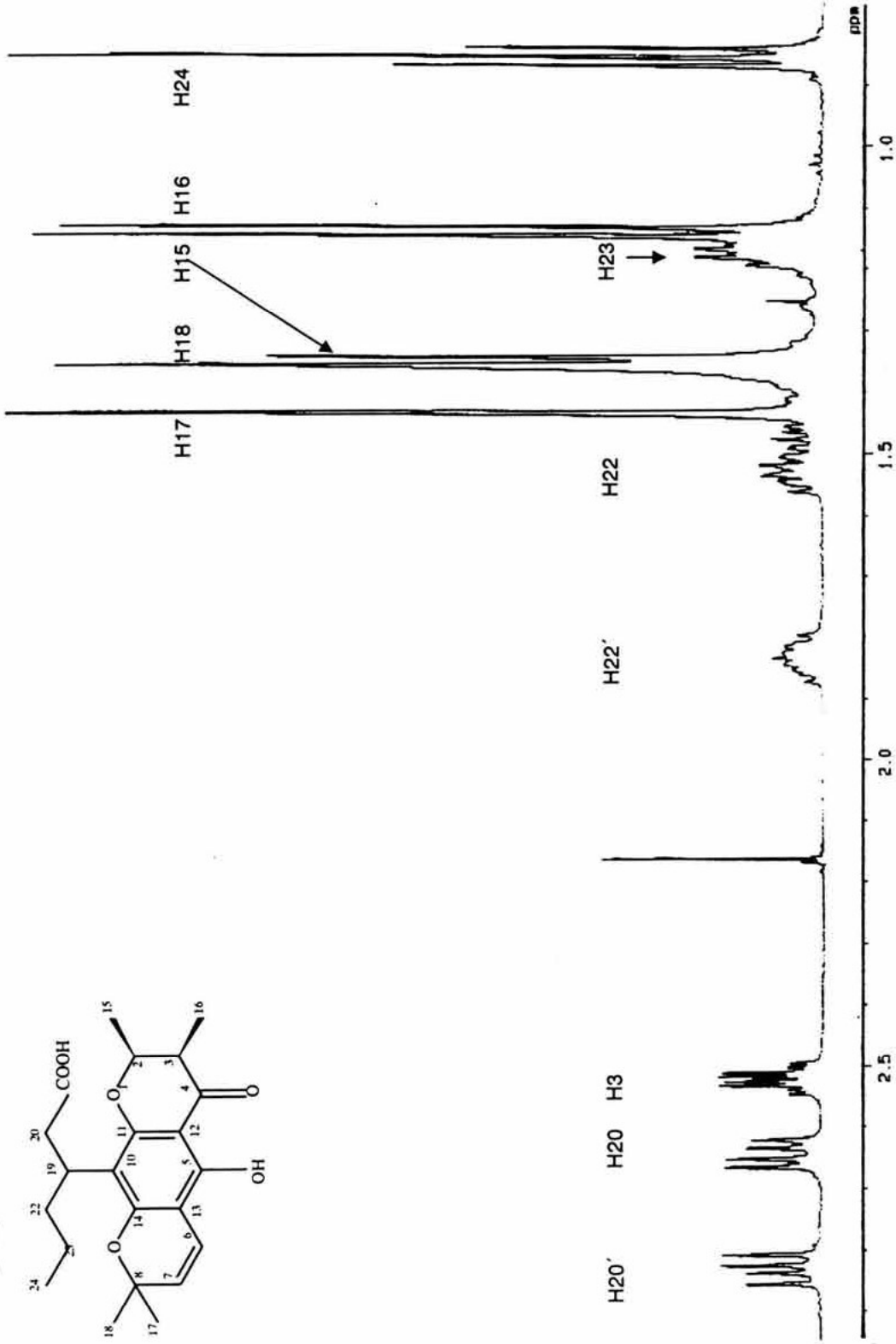
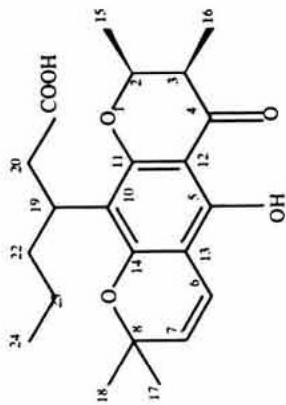


XI6-B 1H/A500



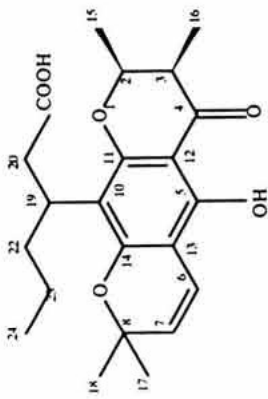
Espectro 42. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido apetalico.

X16-B 1H/AS00



Espectro 43. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido apetalico (1-3 ppm).

X16-B 1H/A500

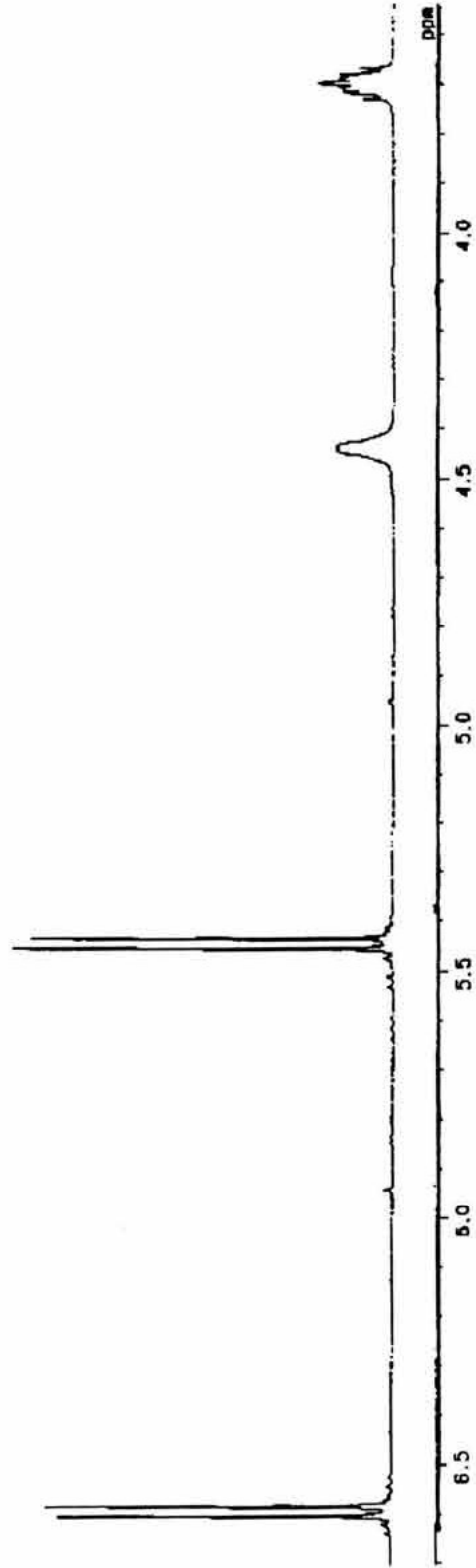


H19

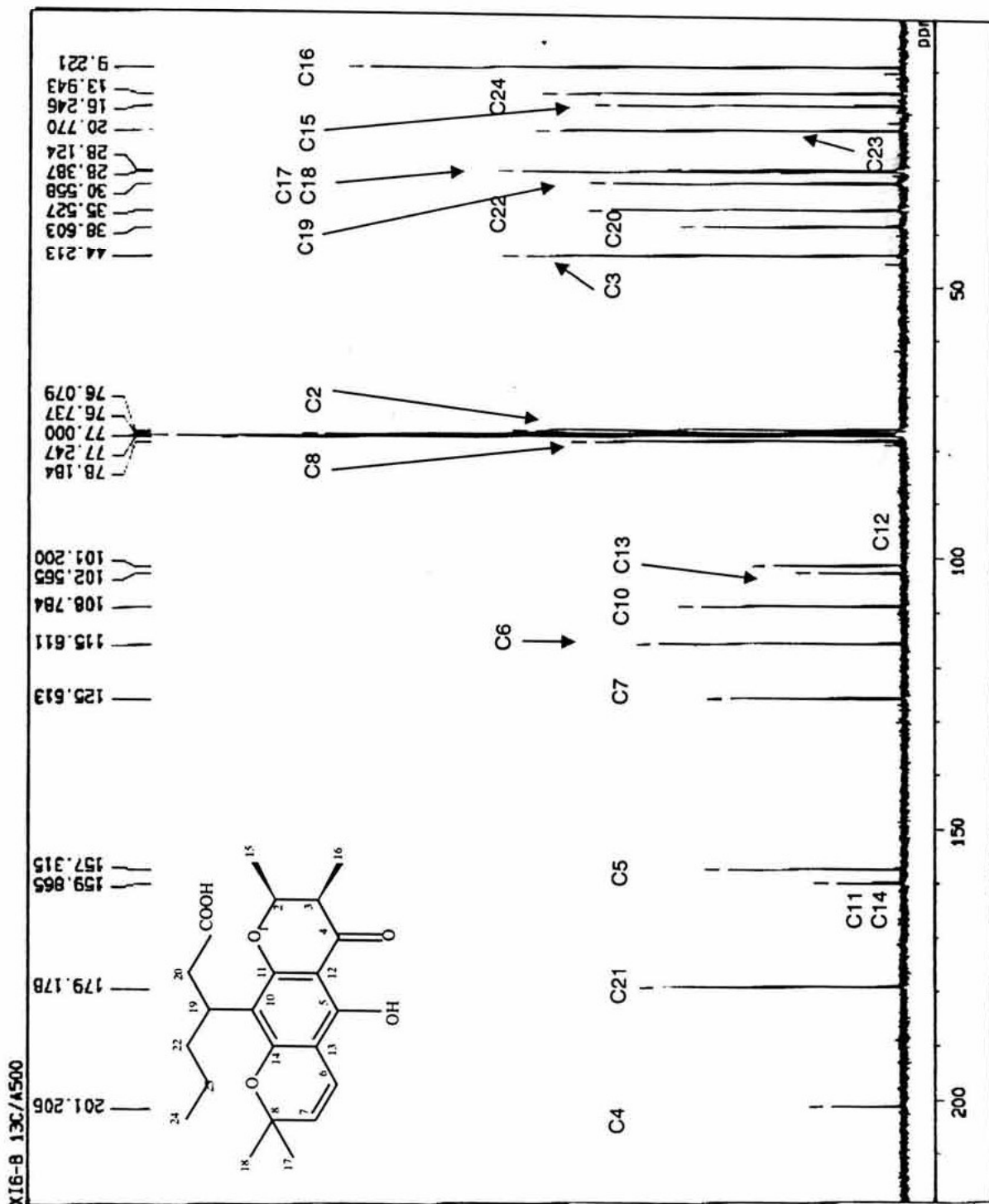
H2

H7

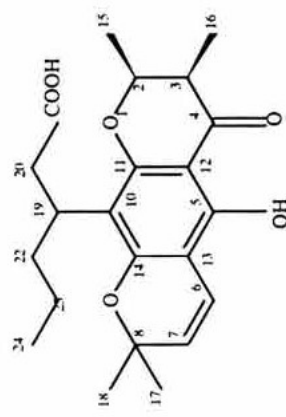
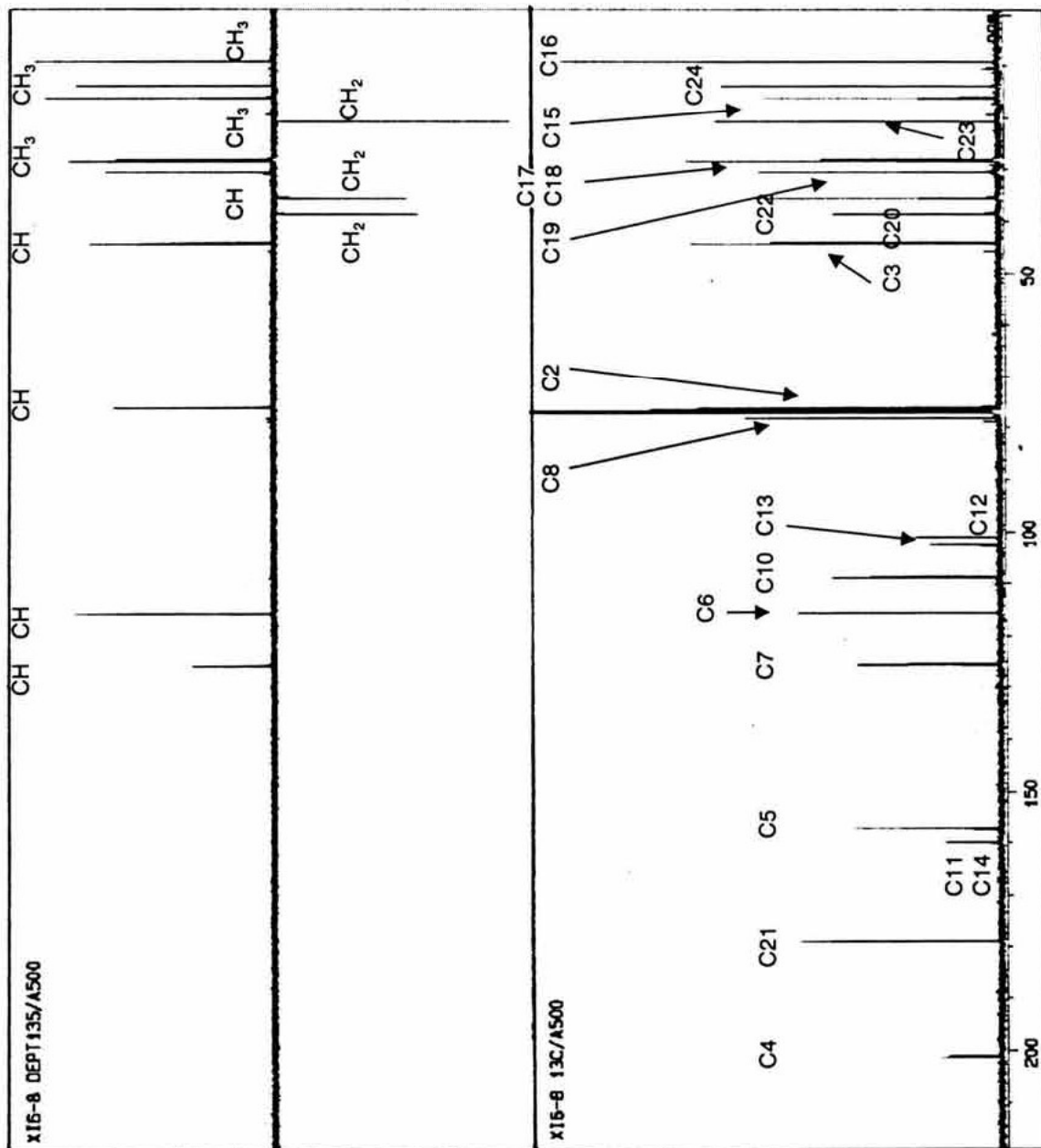
H6



Espectro 44. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido apetalico (3.5-7 ppm).



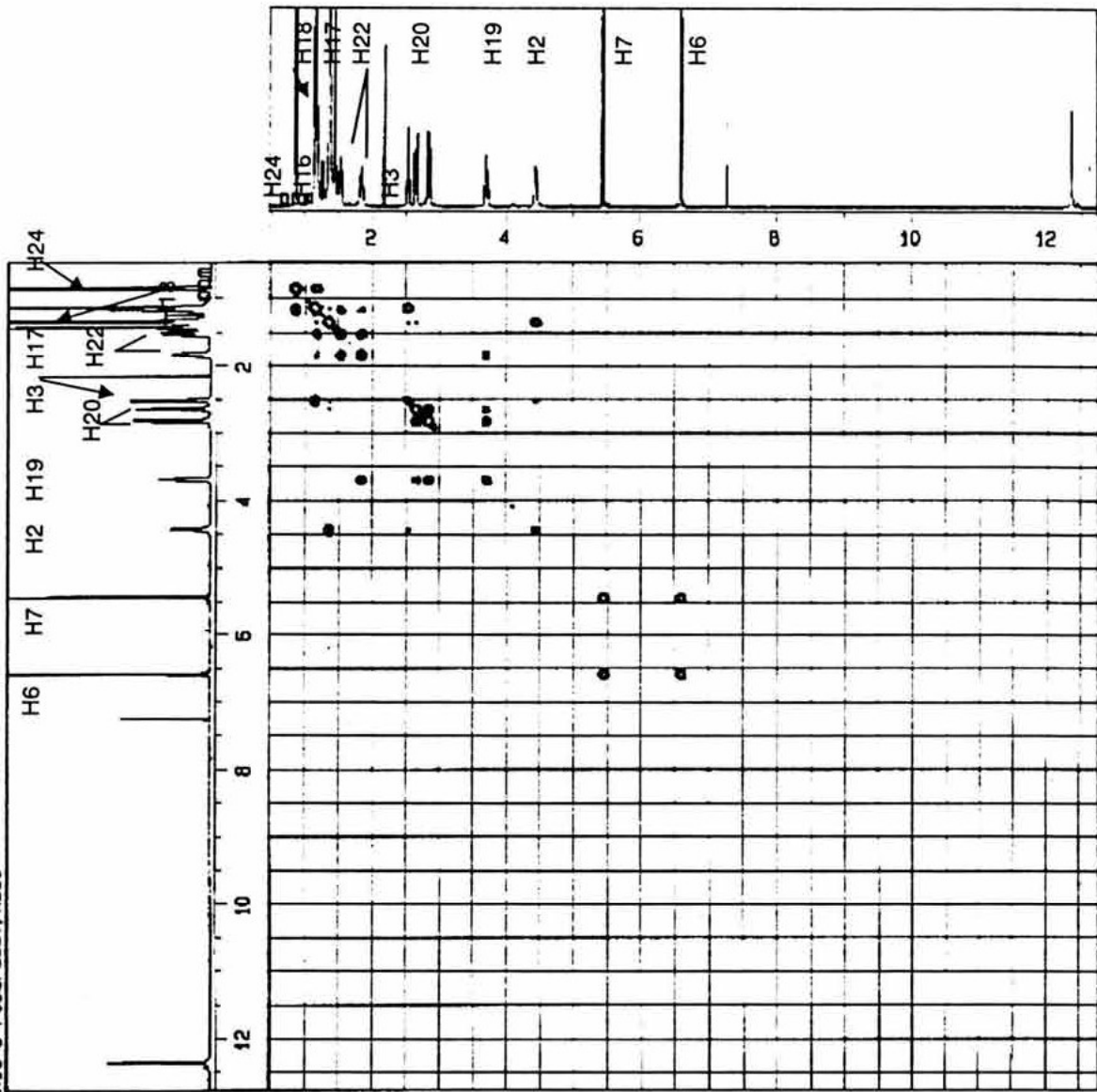
Espectro 45. Espectro de RMN<sup>13</sup>C del ácido apético.



Espectro 46. Espectro DEPT del ácido apetalico.

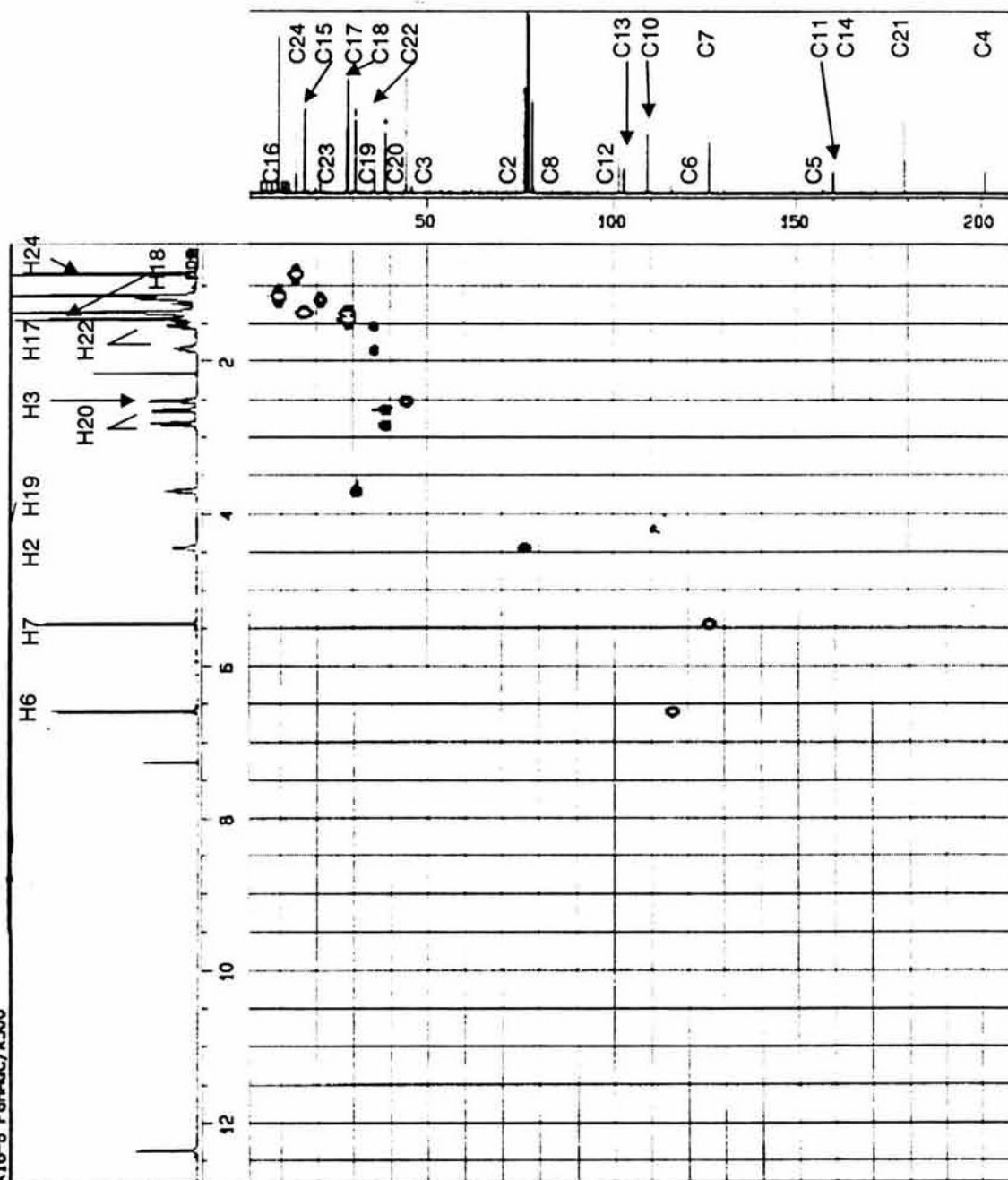


X15-B F600FCOSY/A500



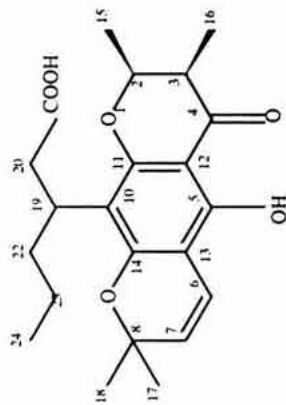
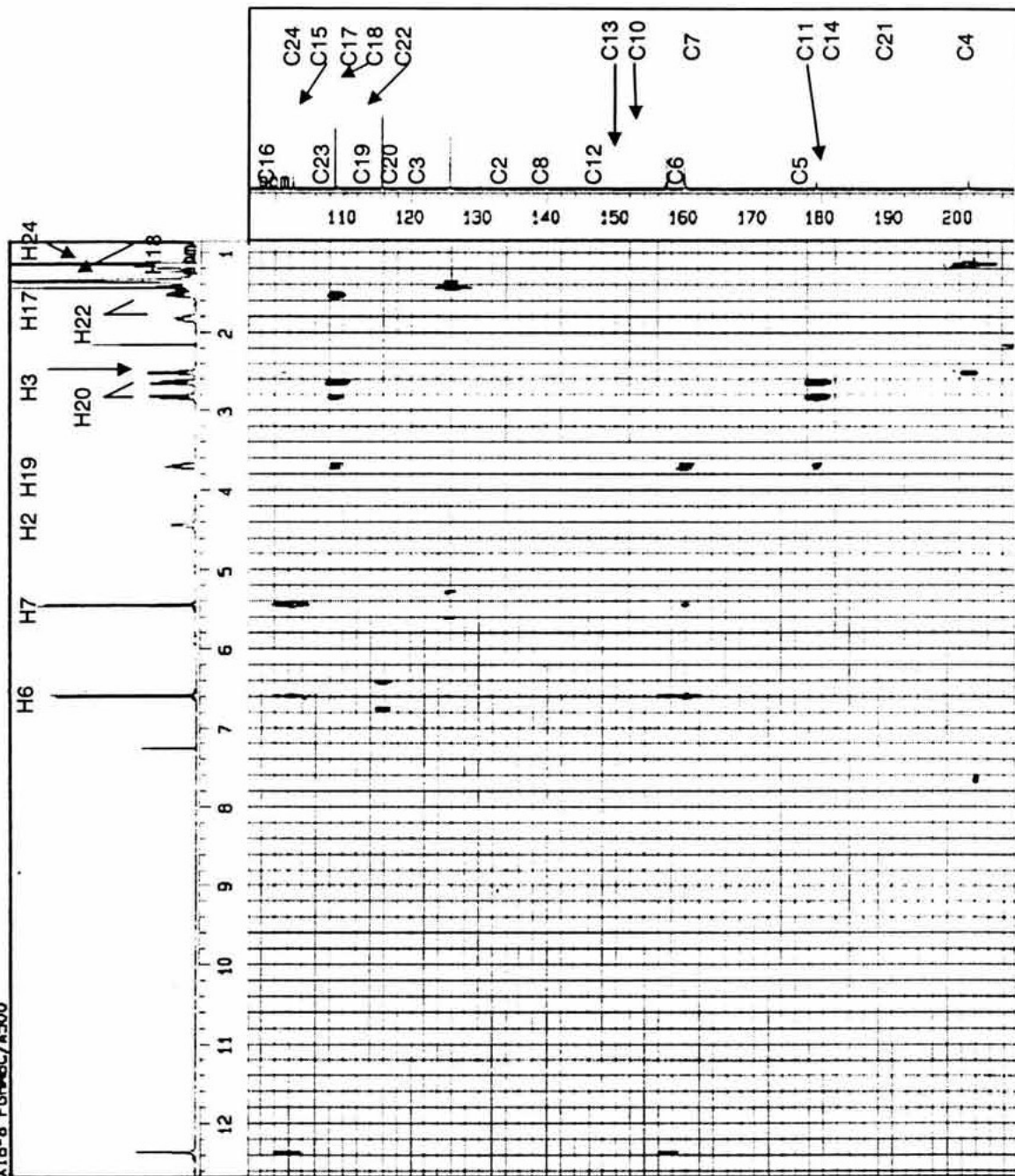
Espectro 47. Espectro COSY del ácido apético.

X16-8 FgHMOC/A500



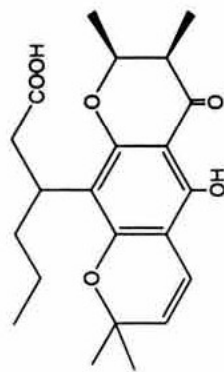
Espectro 48. Espectro HMQC del ácido apetalico.

X16-B FG-HMBC/A500

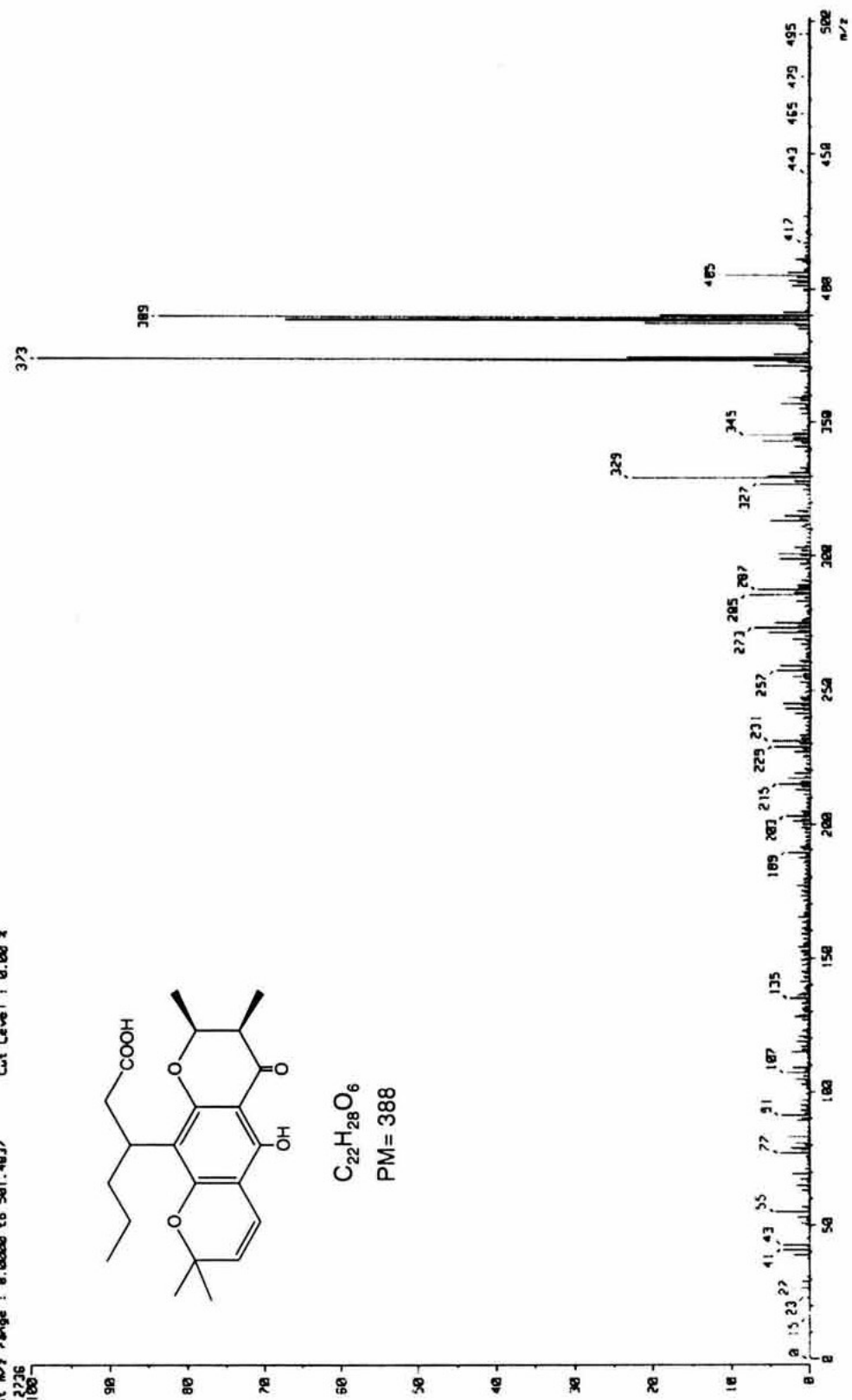


Espectro 49. Espectro HMBC del ácido apético.

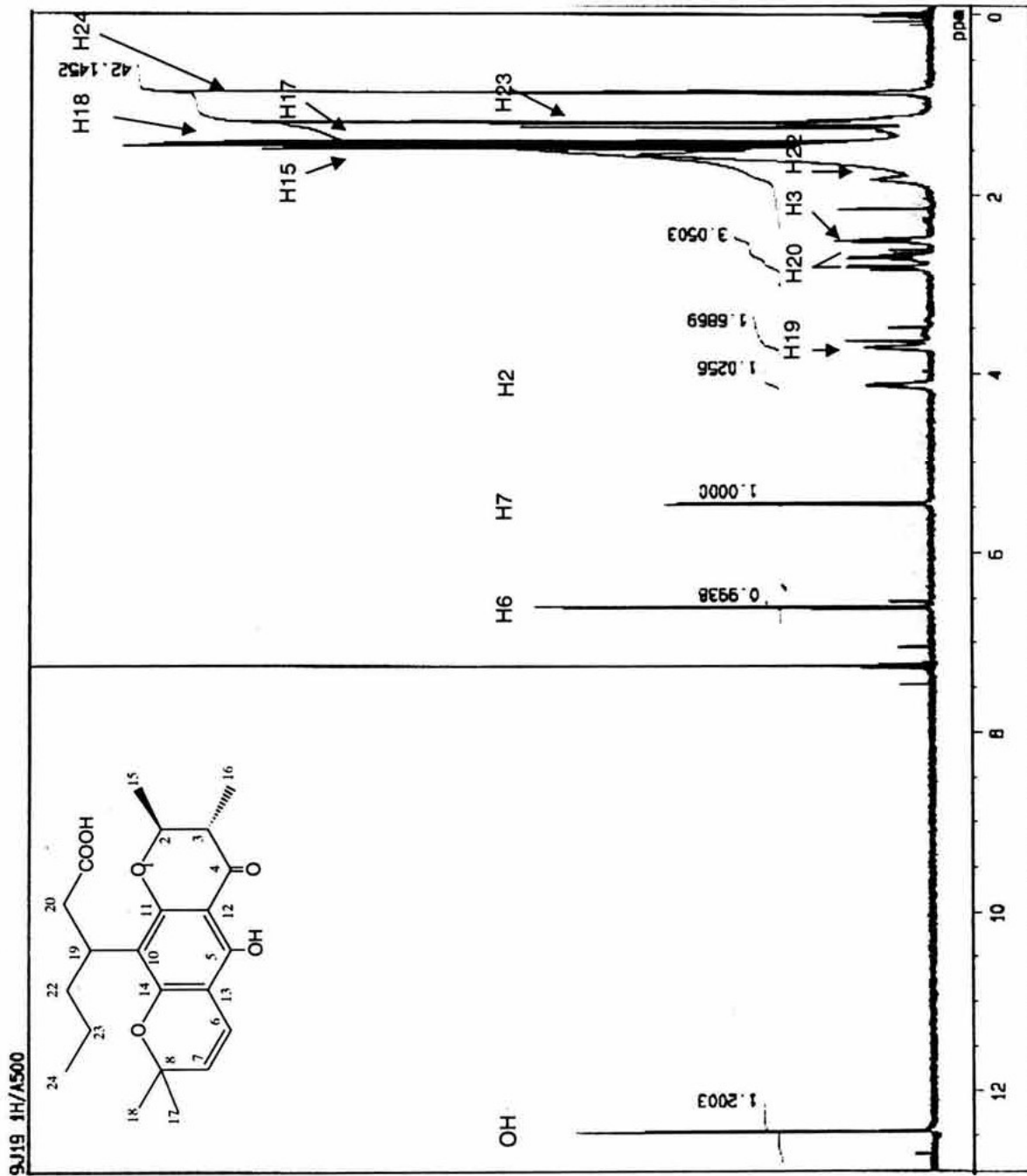
[ Mass Spectrum ]  
 Date : 24-Mar-2003 15:40  
 Data : Mar03  
 Sample: X15-81388)----FAB Pos  
 Note : n-NONA-MeOH  
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+  
 Spectrum Type : Normal Ion (F+Linear)  
 k1 : 0.38 min Scans : (3,8)  
 BP : m/z 373.0308 Int. : 954.89  
 Output m/z range : 8.0000 to 561.4037  
 Cut Level : 0.00 x



$C_{22}H_{28}O_6$   
 PM = 388

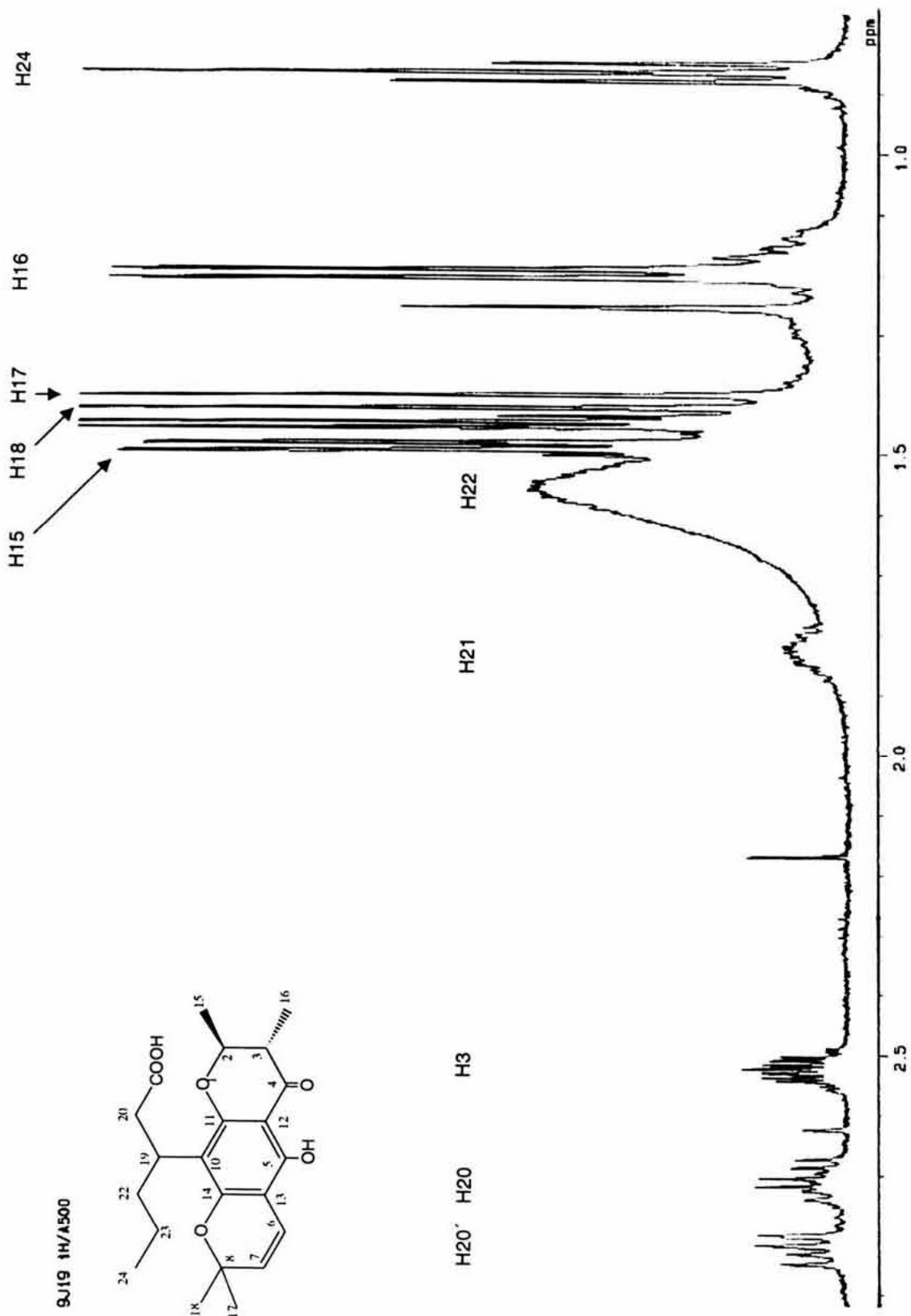


Espectro 50. Espectro de Masas (FAB) del ácido apetalico.



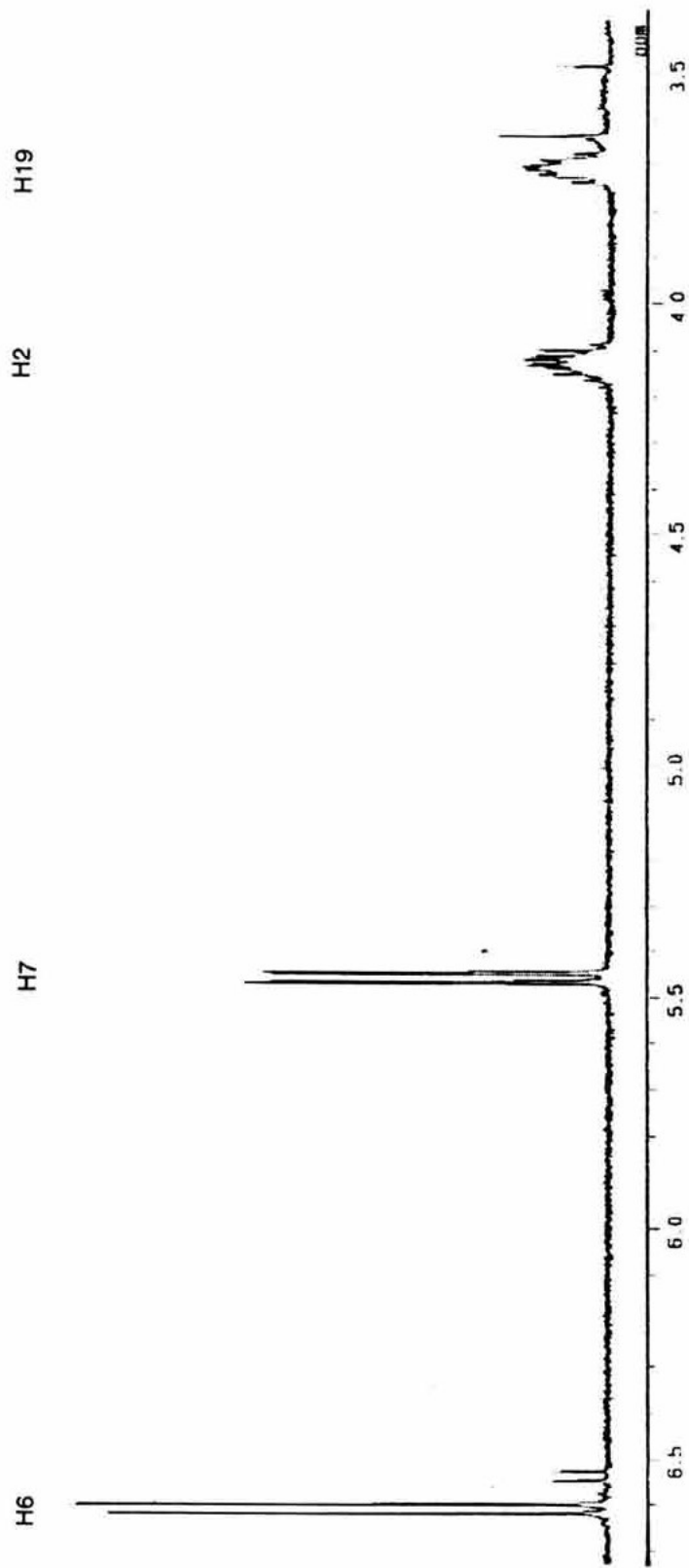
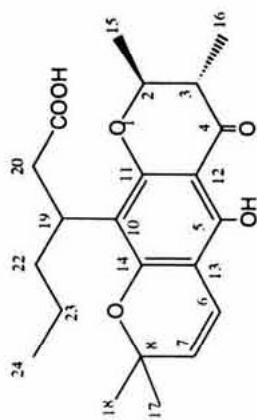
Espectro 51. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido isoapetalico.



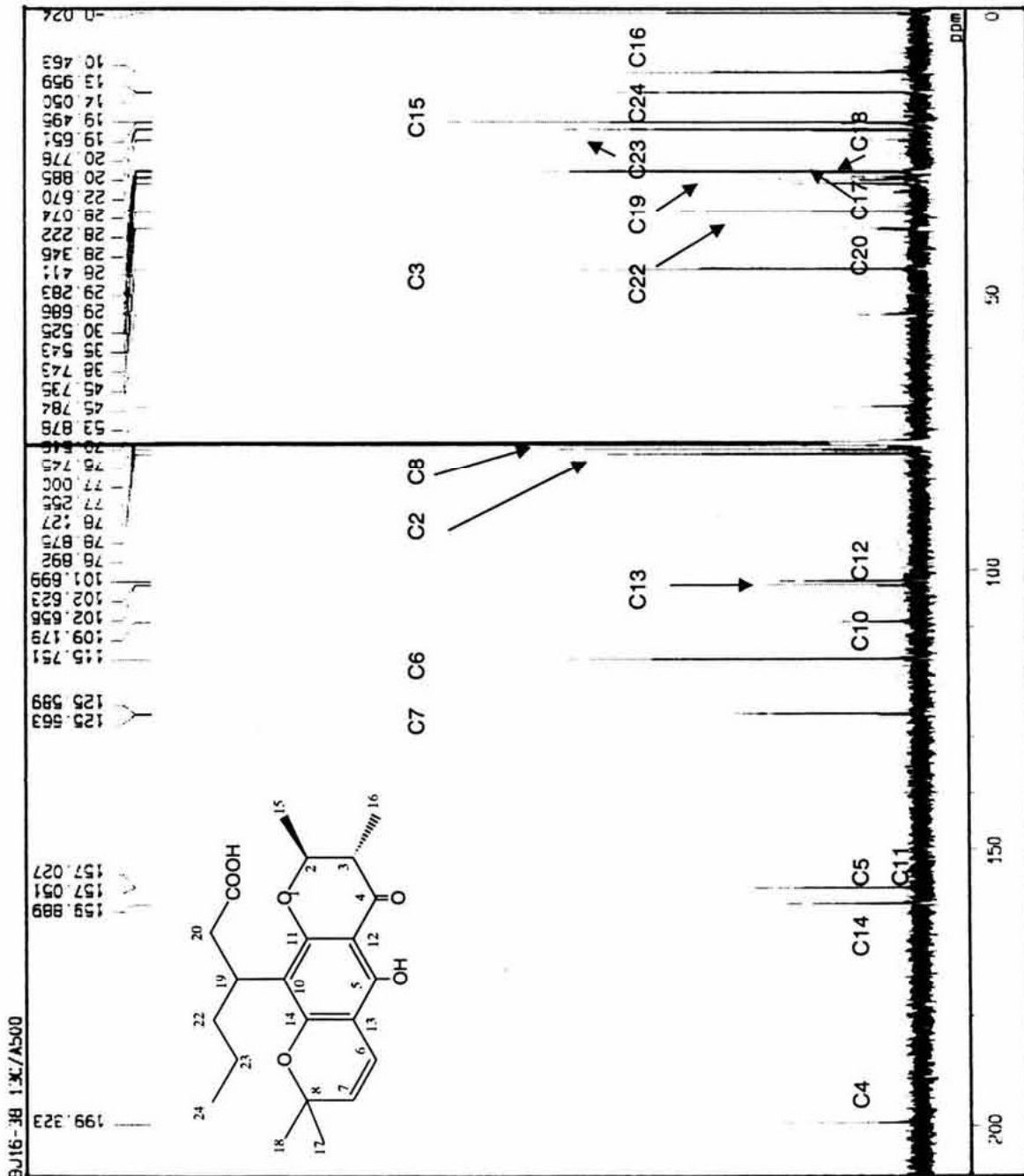


Espectro 52. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido isoapetálico (1-3 ppm).

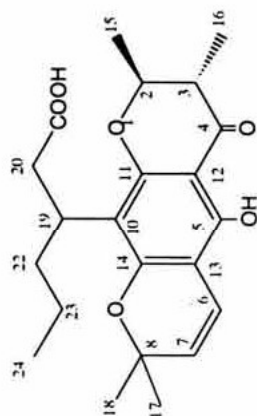
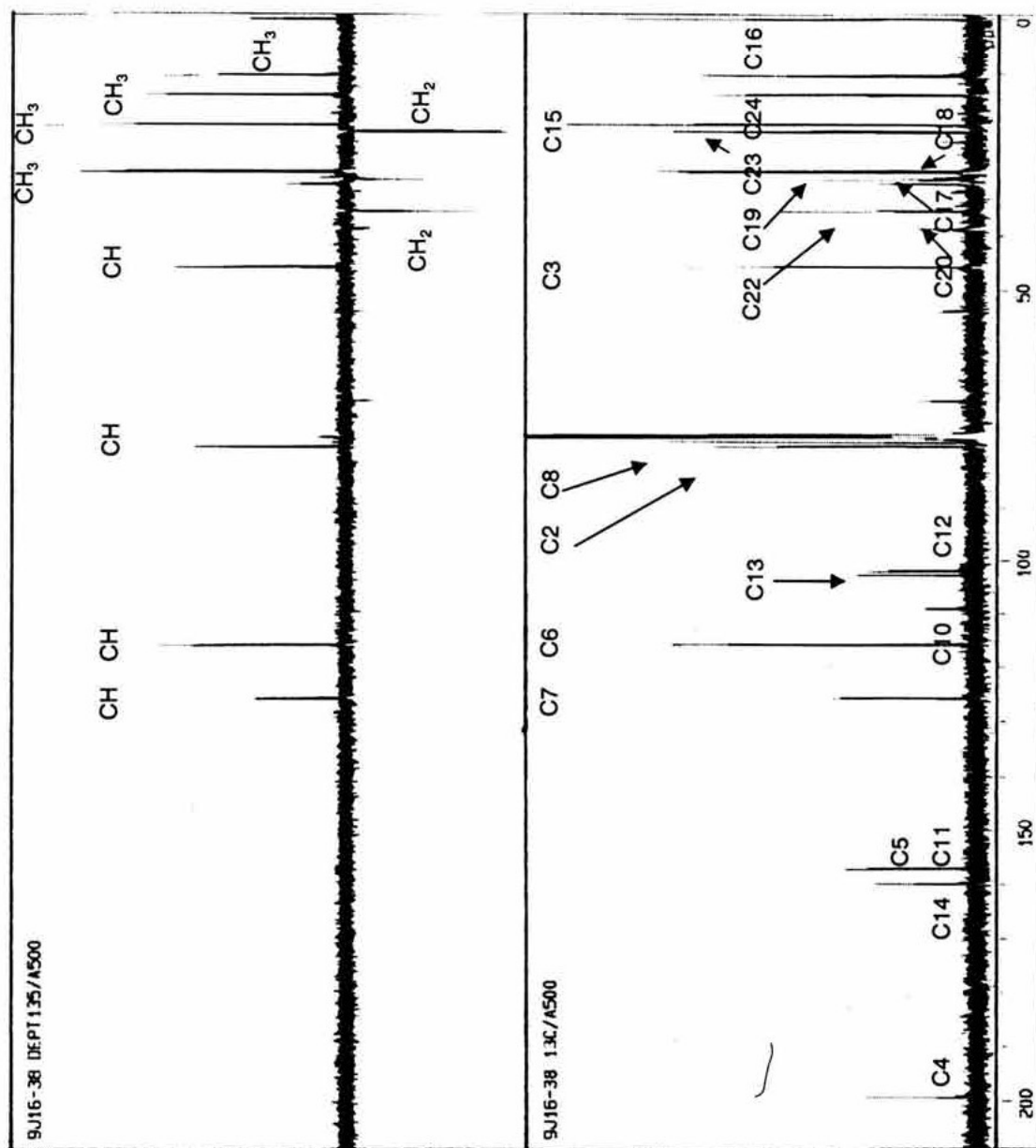
9J19 1H/A500



Espectro 53. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido isoapetalico (3.5-7 ppm).

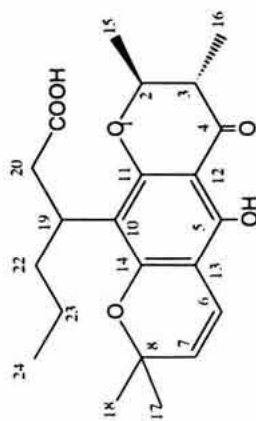
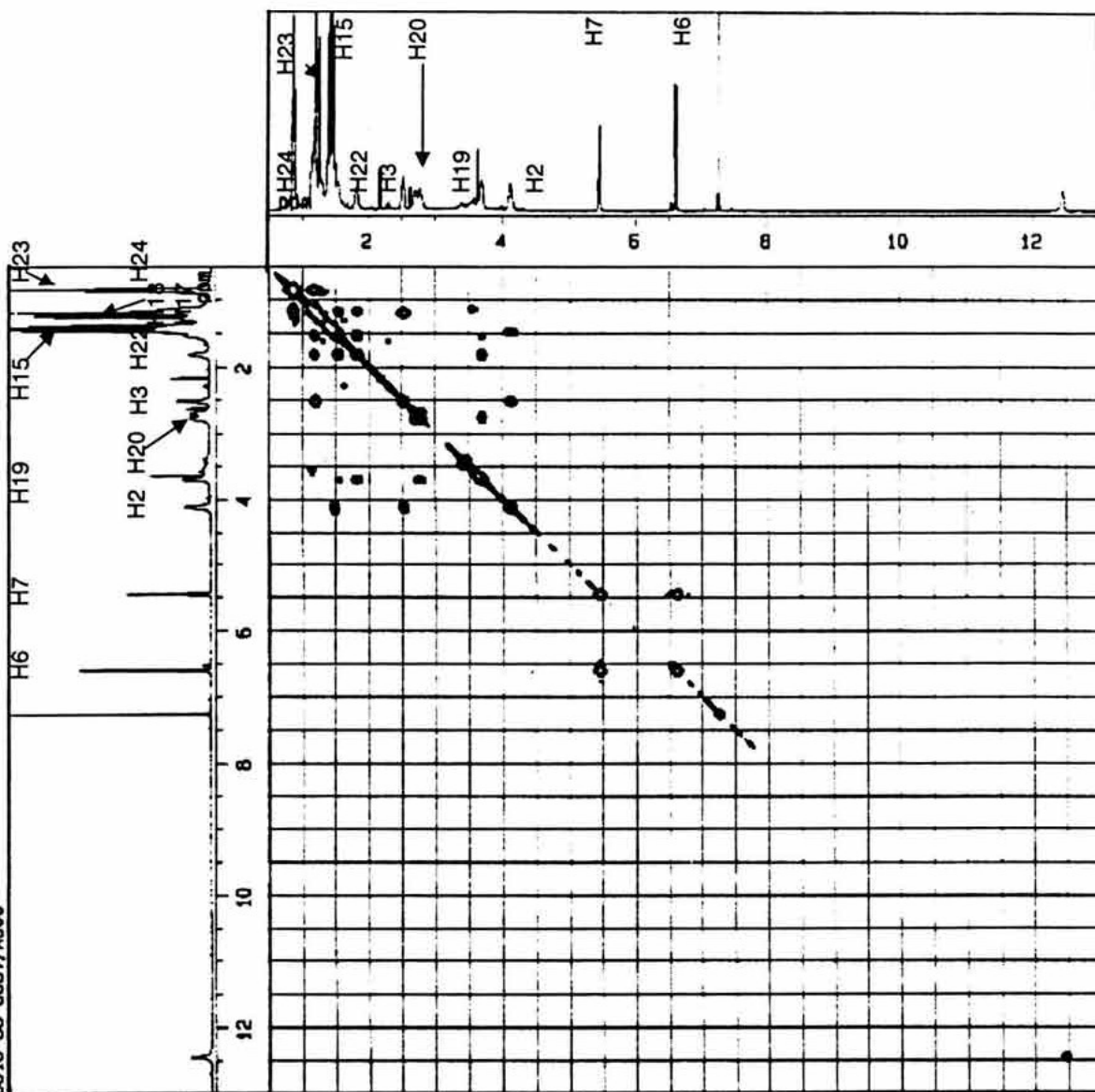


Espectro 54. Espectro de RMN<sup>13</sup>C del ácido isoapético.



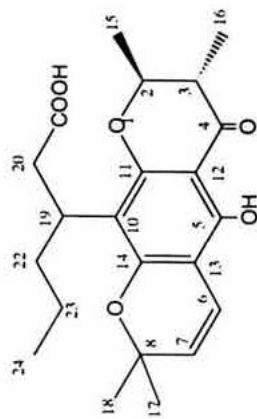
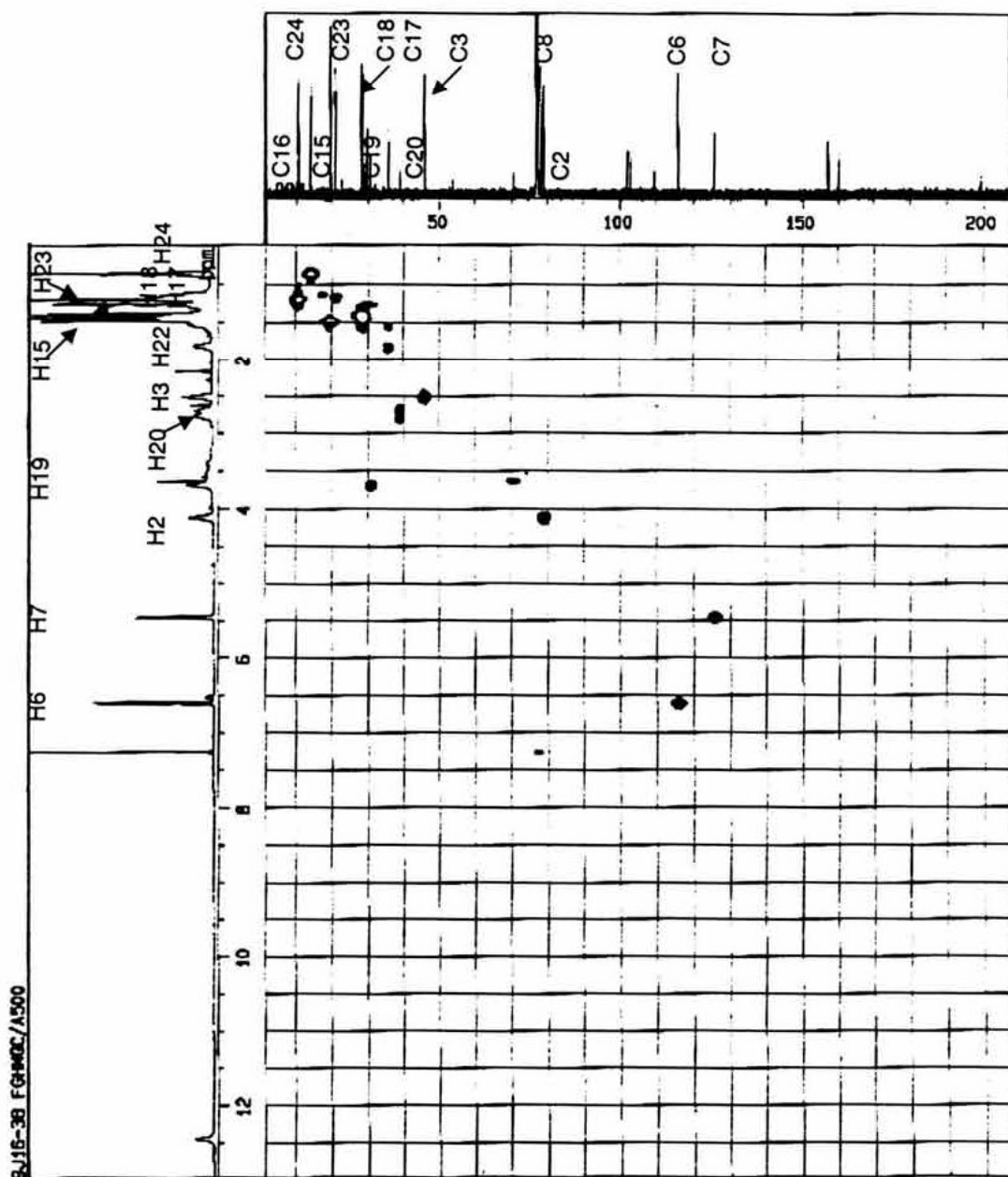
Espectro 55. Espectro de DEPT del ácido isoapetálico.

9J16-38 COSY/A500

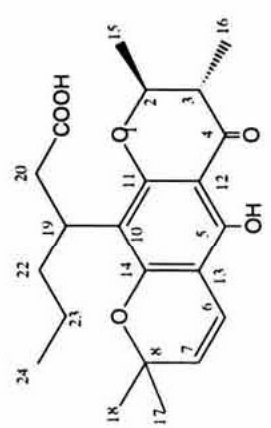
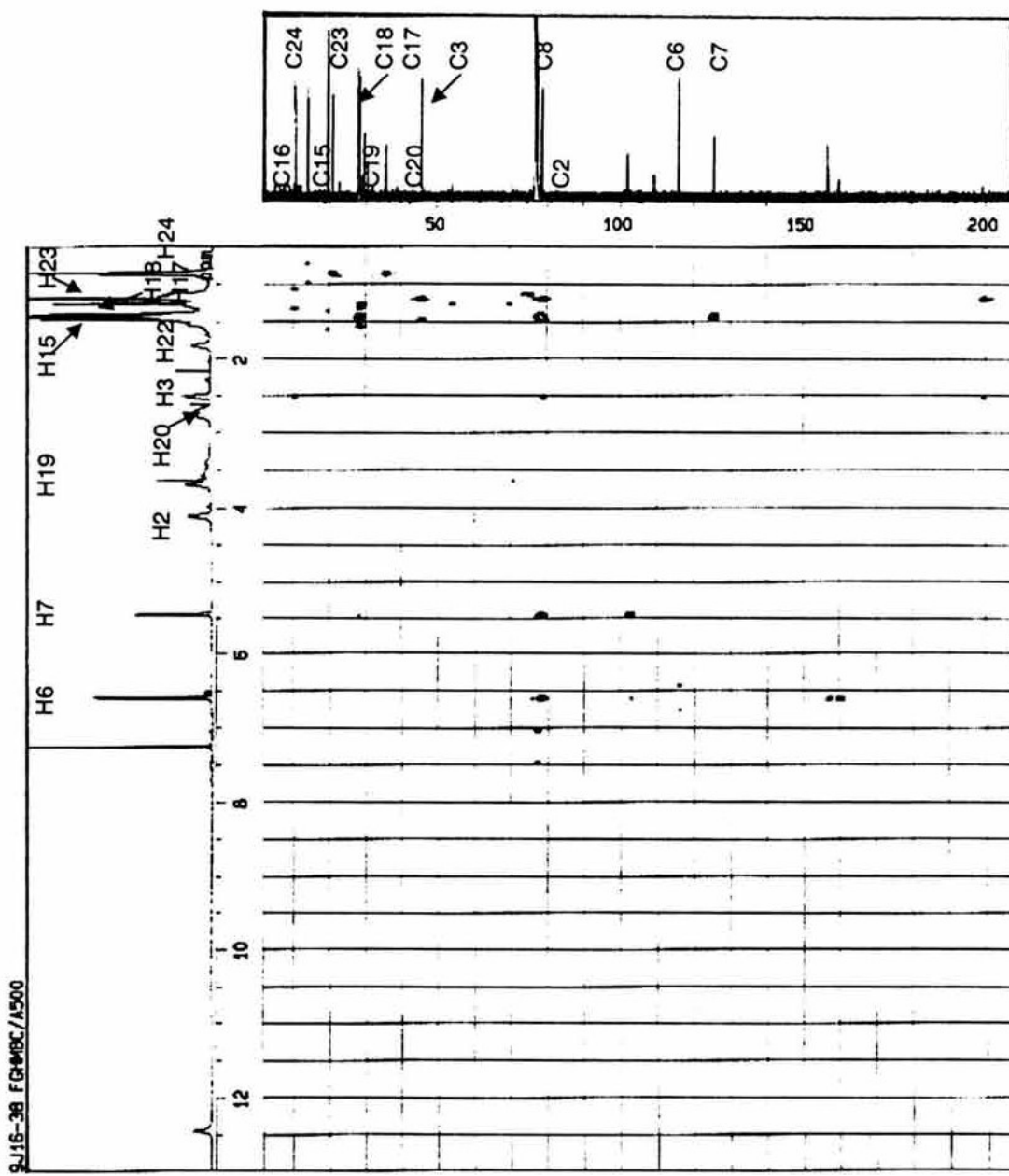


Espectro 56. Espectro COSY del ácido isoapetático.



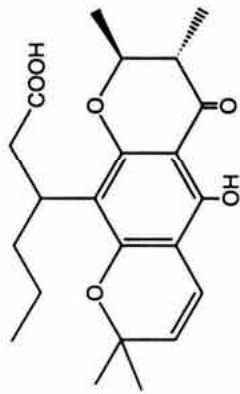


Espectro 57. Espectro HMQC del ácido isoapetático.

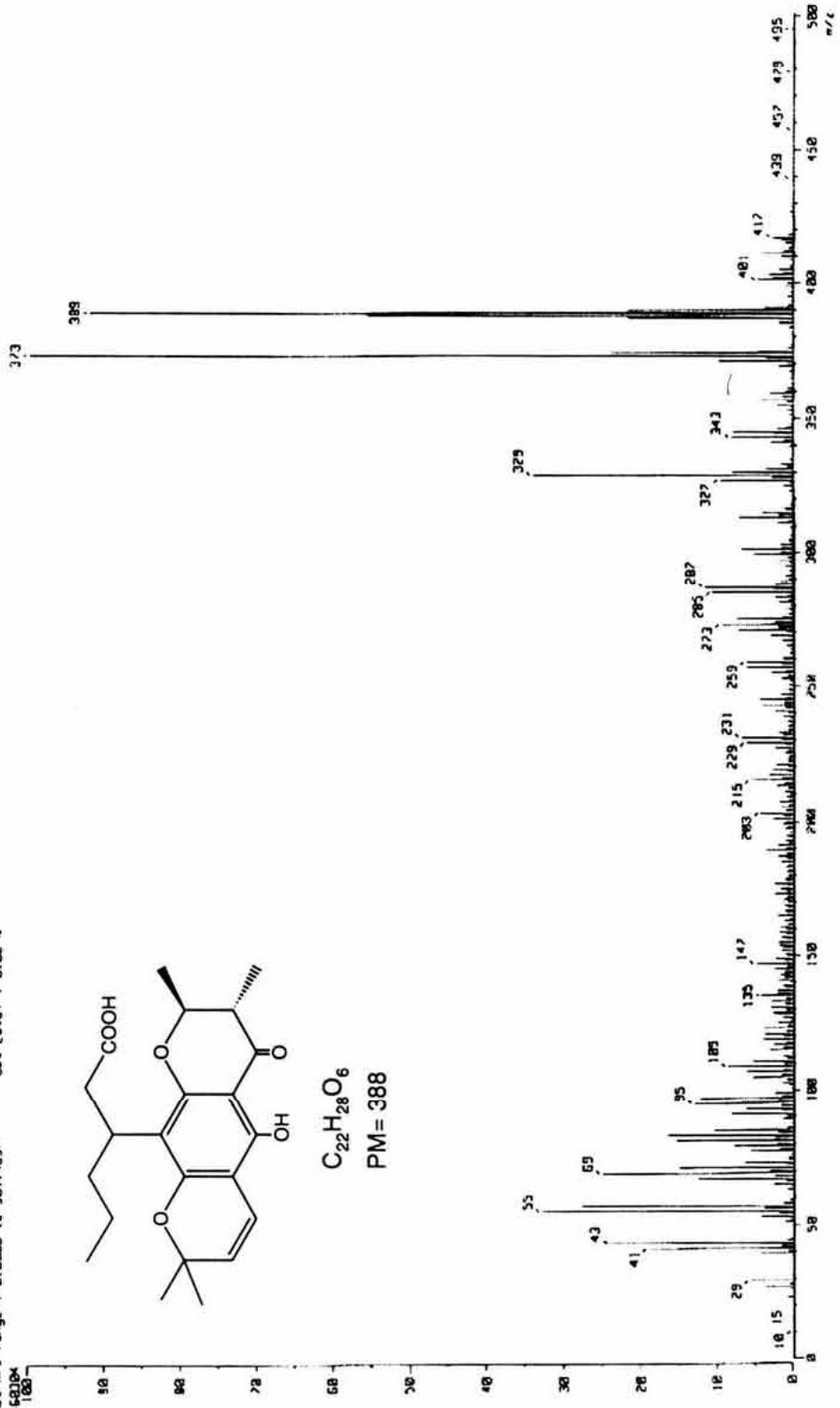


Espectro 58. Espectro HMBC del ácido isoacético.

( Mass Spectrum )  
 Date : 11-Mar-2003 11:12  
 Data : Mar02  
 Sample: C6-1(388)----FAB Pos  
 Note : m-MS/MOH  
 Inlet : Direct Ion Pass : FAB+  
 Spectrum Type : Normal Ion [M-Linear]  
 RT : 8.58 min Scan : (3,6)  
 BP : m/z 372.8888 Int. : 336.88  
 Output m/z range : 8.8888 to 501.4837 Cut Level : 0.00 x

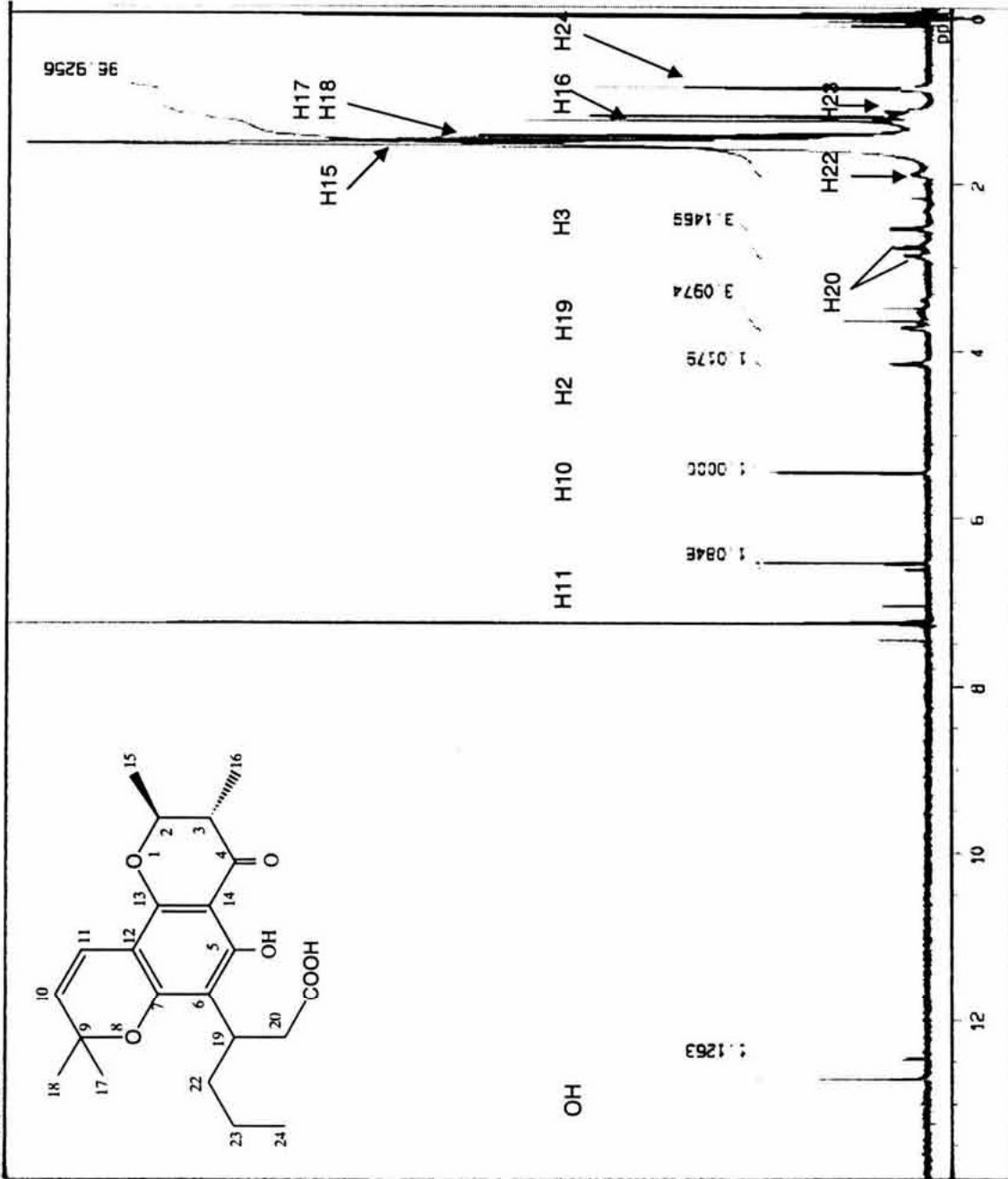


$C_{22}H_{28}O_6$   
 PM = 388



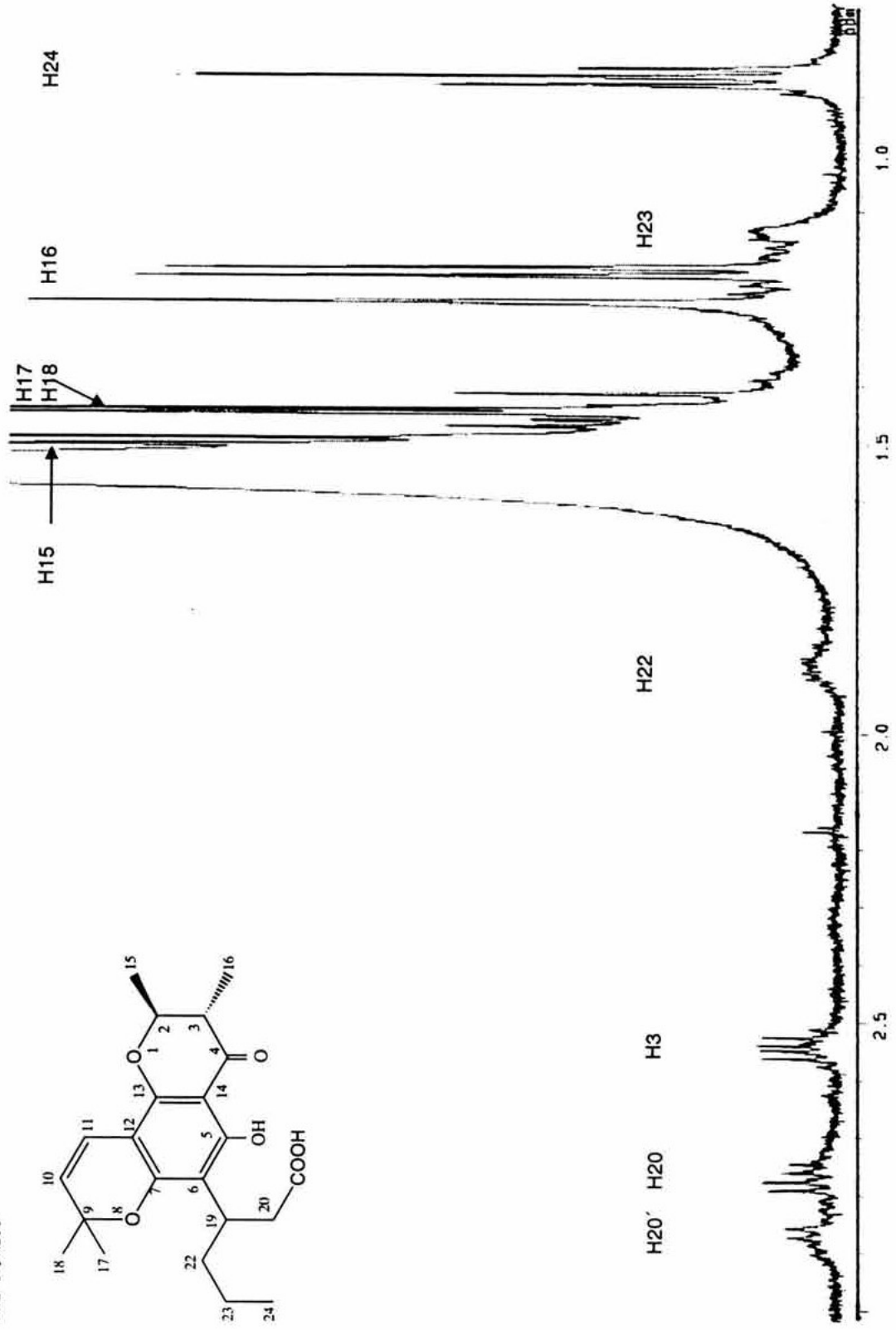
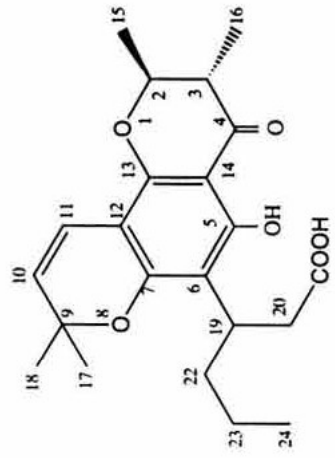
Espectro 59. Espectro de Masas (FAB) del ácido isoapetálico.

9J5 1H/A500



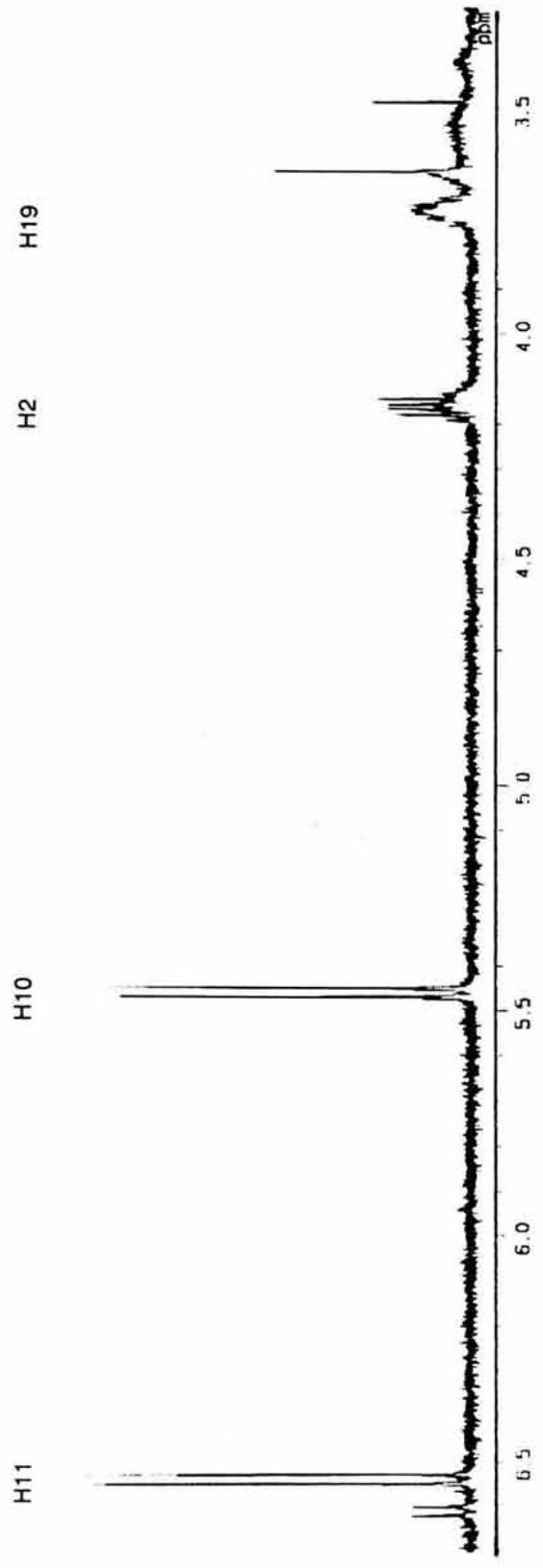
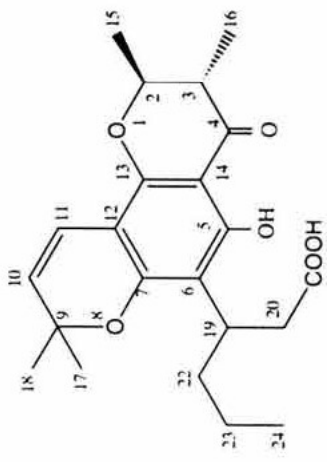
Espectro 60. Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  del isómero estructural del ácido isopetético.

9J5 1H/A500



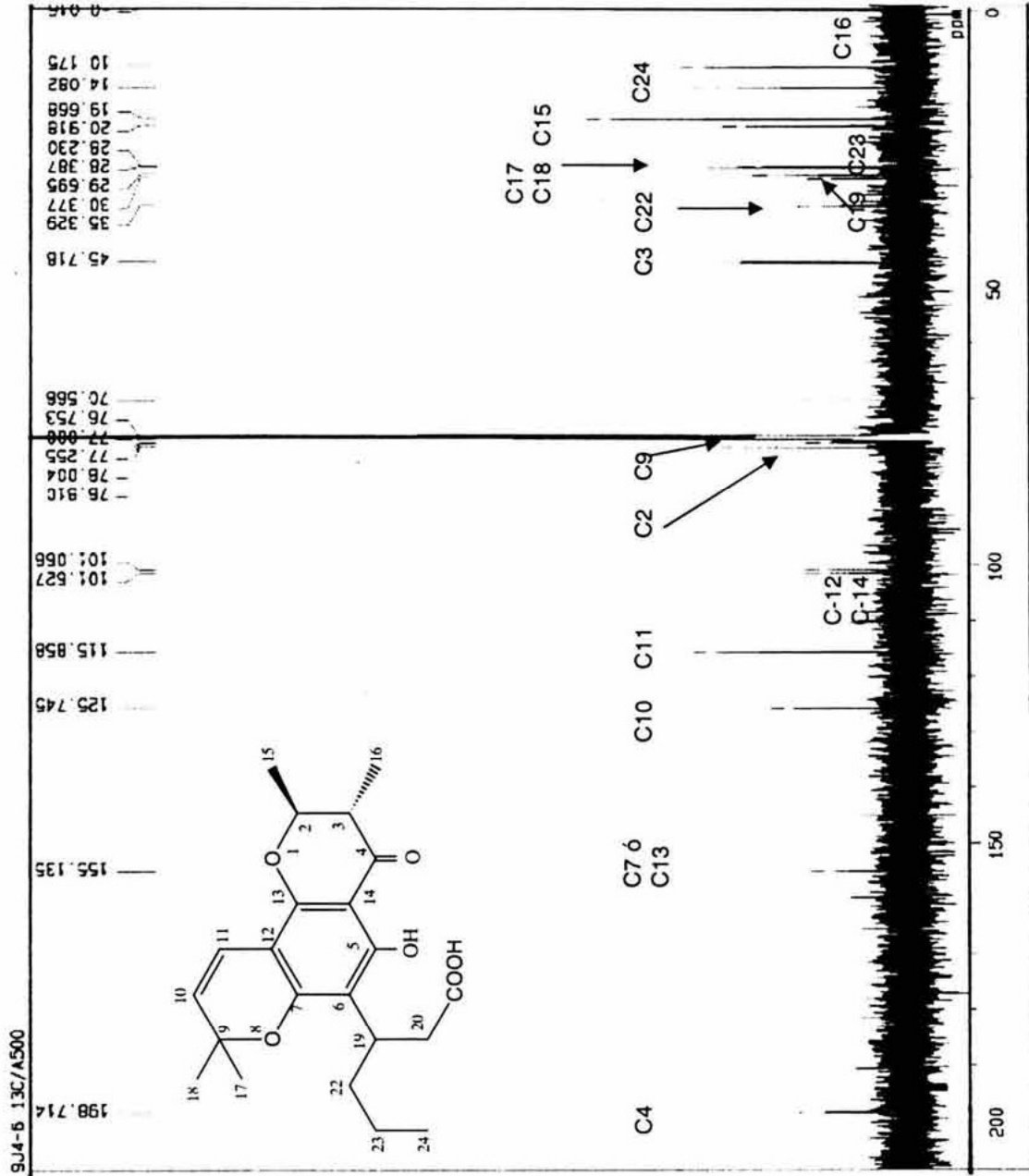
Espectro 61. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del isómero estructural del ácido isoapetálico (1-3 ppm).

9J5 1H/A500

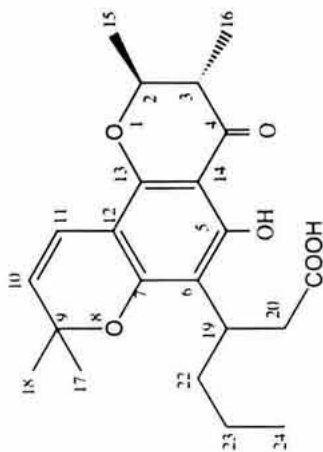
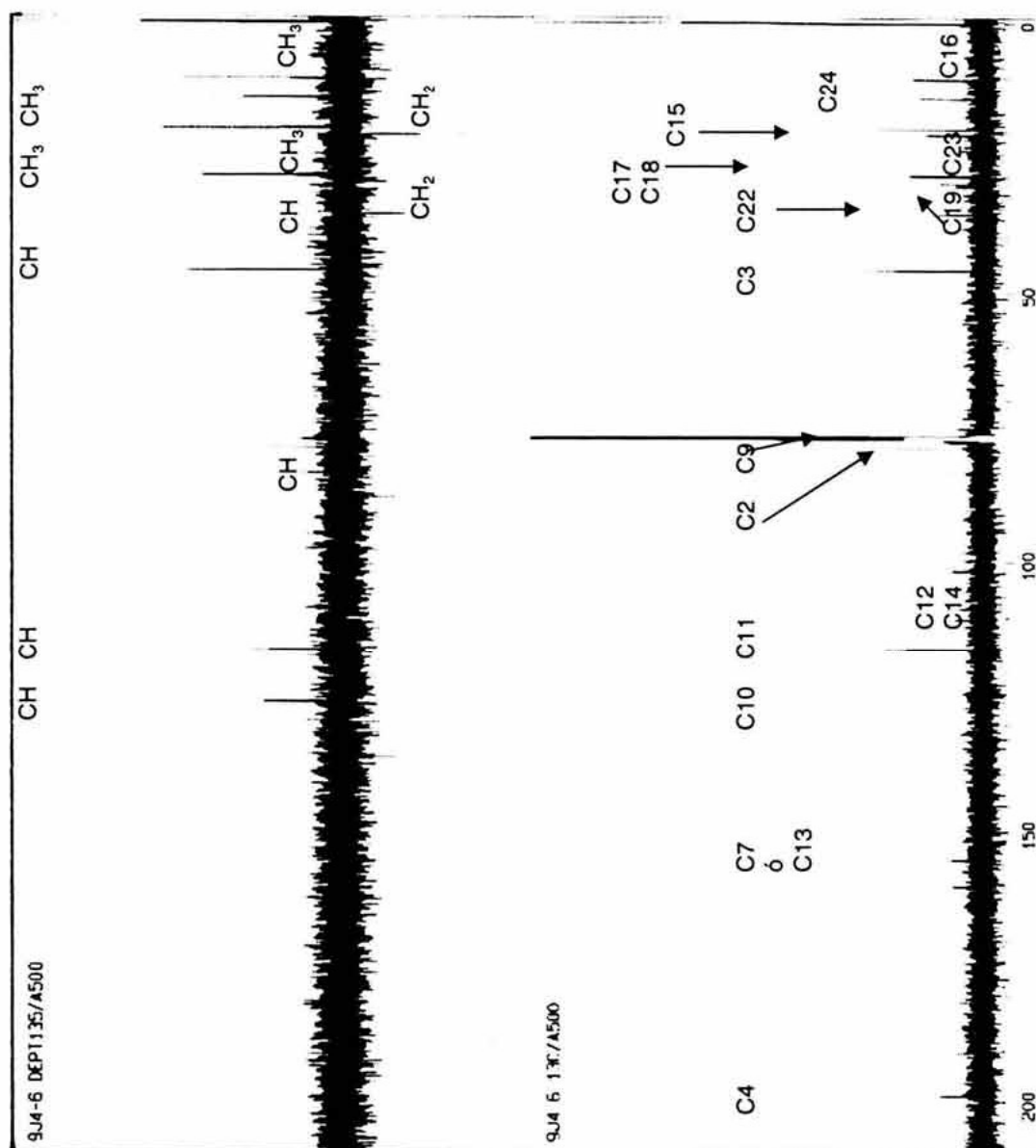


Espectro 62. Ampliación del espectro de RMN<sup>1</sup>H del isómero estructural del ácido isoapetalico (3.5-7 ppm).



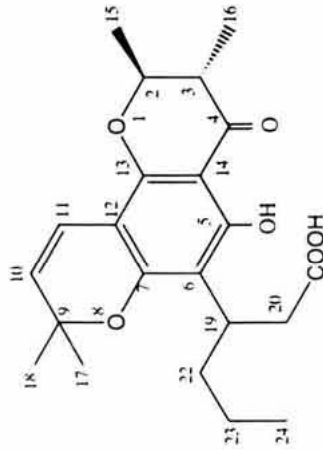
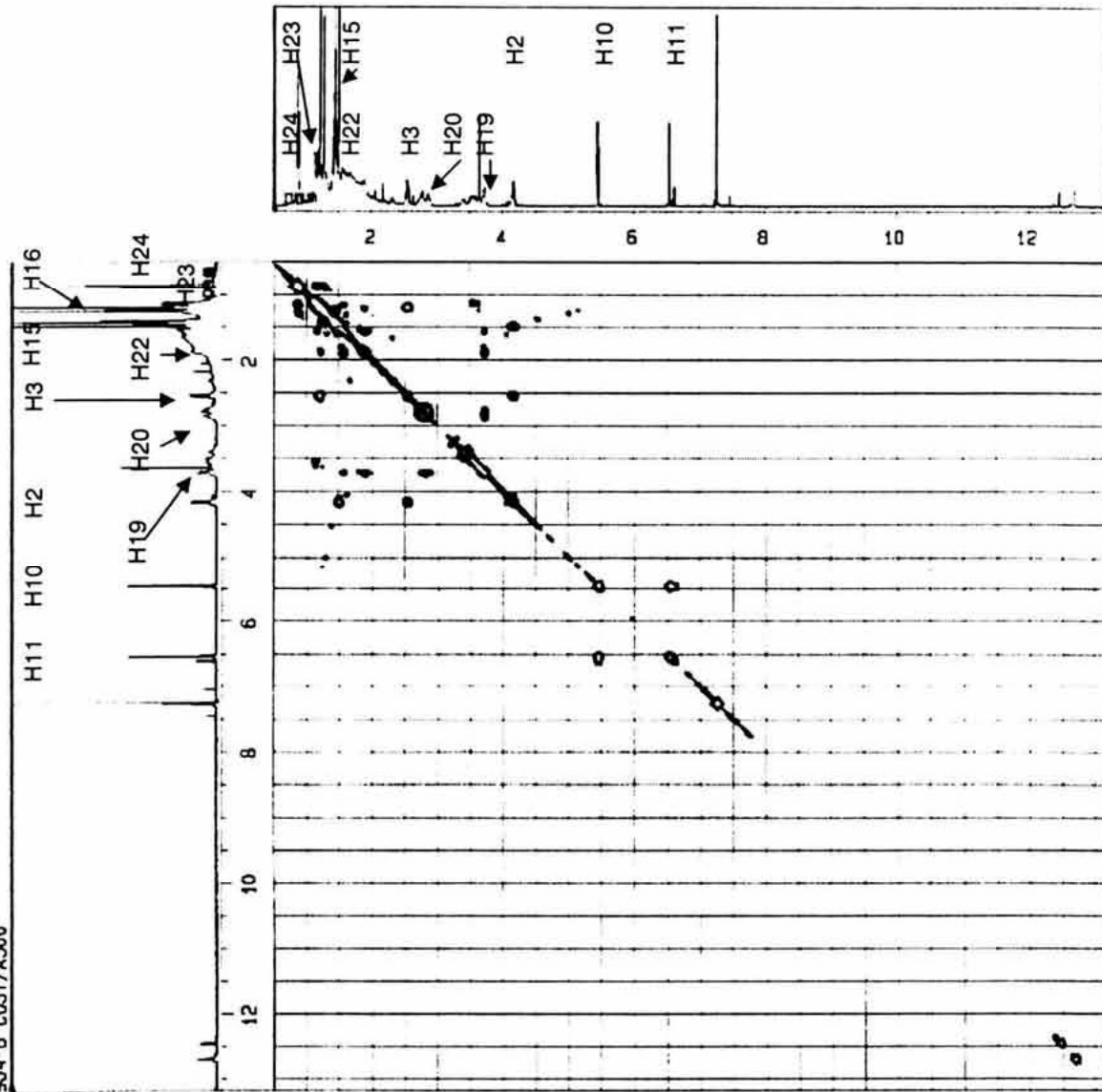


Espectro 63. Espectro de RMN<sup>13</sup>C del isómero estructural del ácido isoapetático.



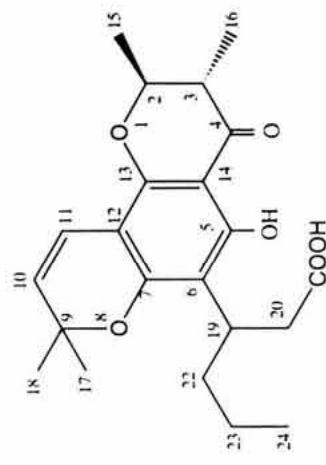
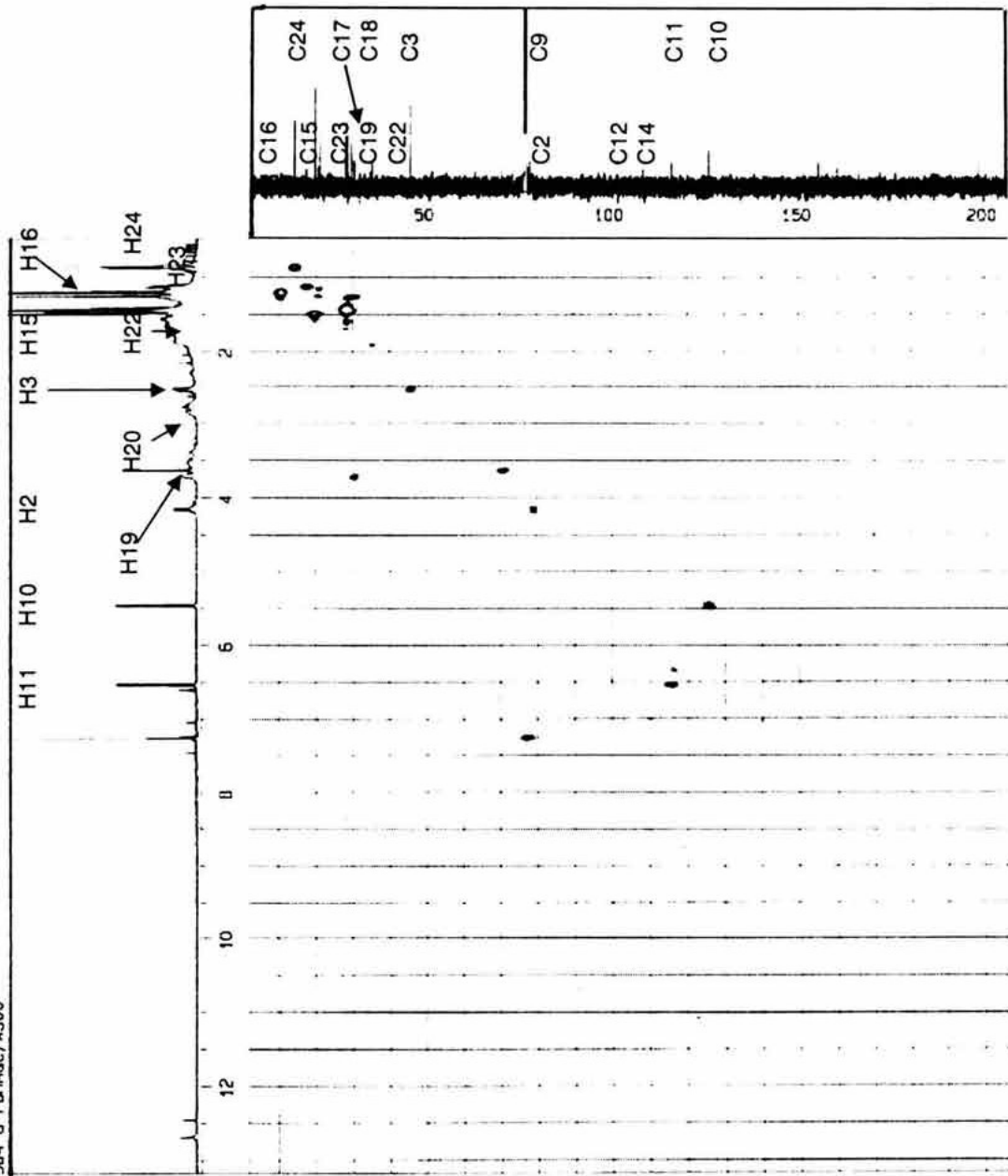
Espectro 64. Espectro DEPT del isómero estructural del ácido isoapetálico.

9JA-6 COSY/A500

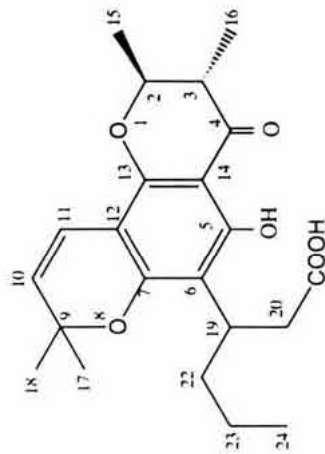
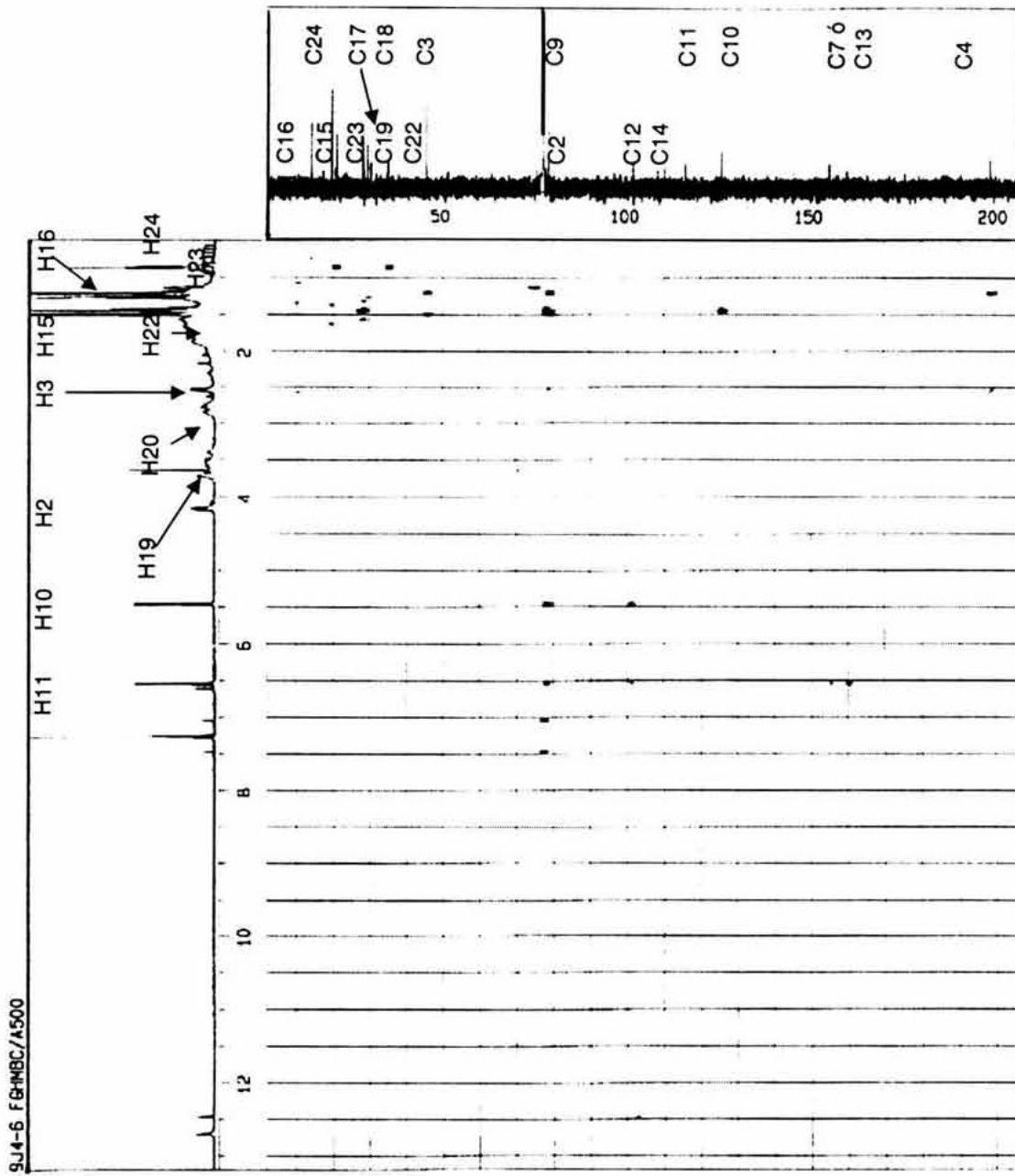


Espectro 65. Espectro COSY del isómero estructural del ácido isopetético.

9J4-6 FgHMOC/4500

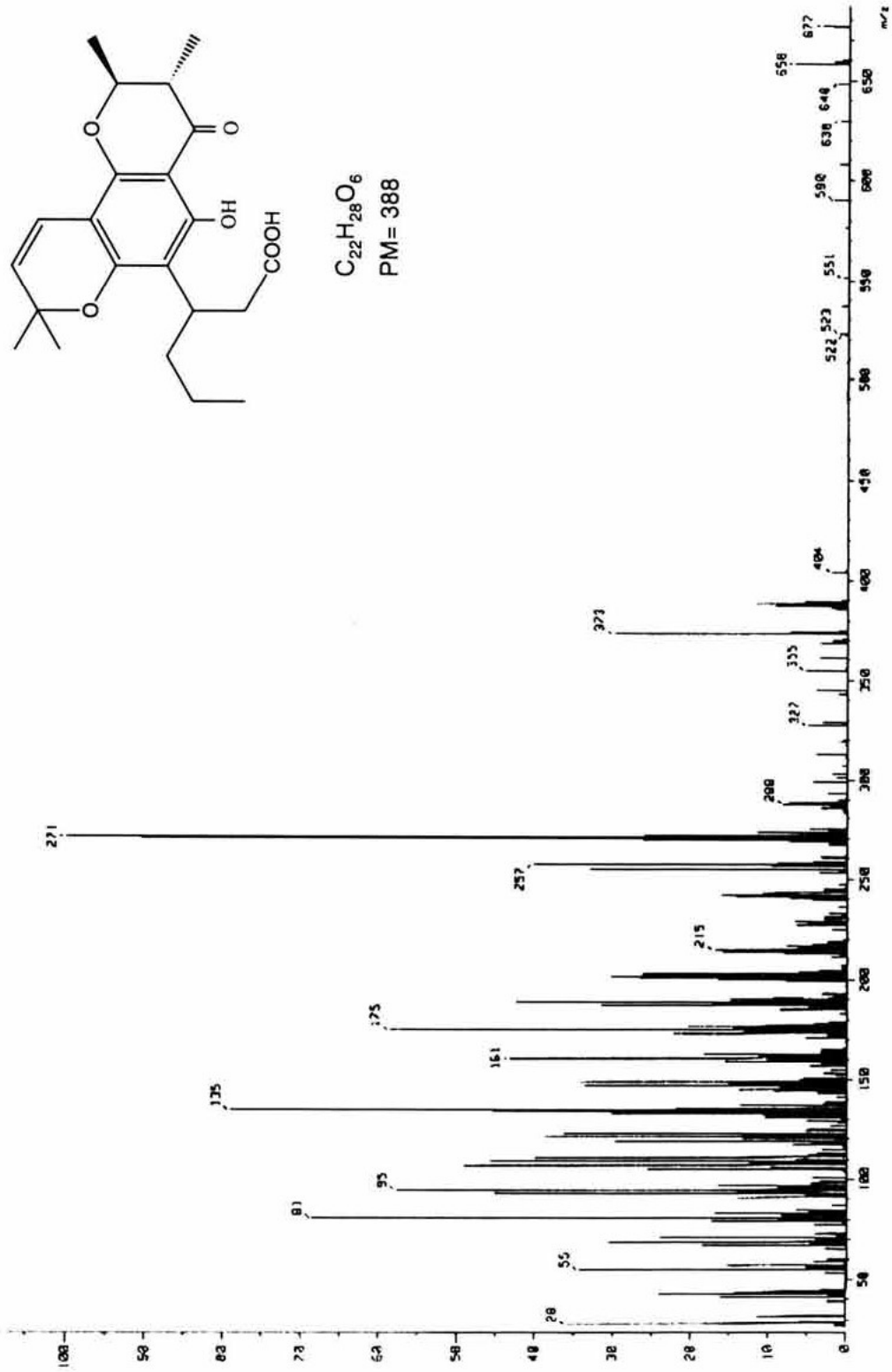


Espectro 66. Espectro HMQC del isómero estructural del ácido isoapetalico.



Espectro 67. Espectro HMBC del isómero estructural del ácido isoapetálico.

( Mass Spectrum )  
 Data : DP-Ricardo-Reyes-Ch-043 Date : 28-Nov-12 14:05  
 Sample : 281103-06 9J-4-E  
 Note : Luis-Velasco  
 Inlet : Direct Ion Mode : E+  
 Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)  
 RT : 1.98 min Scan : (53,68)  
 BP : m/z 271.0000 Int. : 97.97  
 Output m/z range : 25.0000 to 687.4599 Cut Level : 0.00 %  
 1122293



Espectro 68. Espectro de Masas (IE) del isómero estructural del ácido isoapético.



## APÉNDICE III

## HIV-1 Inhibition by Extracts of Clusiaceae Species from Mexico

Maira HUERTA-REYES,<sup>a</sup> Maria del Carmen BASUALDO,<sup>b</sup> Lucio LOZADA,<sup>c</sup> Manuel JIMENEZ-ESTRADA,<sup>a</sup> Carmen SOLER,<sup>b</sup> and Ricardo REYES-CHILPA\*<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Natural Products, Institute of Chemistry, National University of Mexico; <sup>b</sup> HIV/AIDS Section, Institute of Biomedical Sciences, National University of Mexico; and <sup>c</sup> Faculty of Sciences, National University of Mexico; Ciudad Universitaria, 04510, Mexico D. F., Mexico. Received November 28, 2003; accepted February 7, 2004

The organic plant extracts of 21 species of Clusiaceae from Mexico were screened for anti HIV-1 reverse transcriptase activity in a non-radioactive immuno colorimetric assay. The extracts of 5 species (23.8%) exhibited significant inhibition ( $\geq 70\%$ ) of HIV-1 RT activity; of these, only 4 extracts showed reduced toxicity to human lymphocytic MT2 cells and were further tested as inhibitors of HIV-1 IIIb/LAV replication in a cellular system. The best extracts were *Calophyllum brasiliense* (hexane) and *Clusia quadrangula* ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH) which inhibited HIV-1 RT ( $\text{IC}_{50}=29.6 \mu\text{g/ml}$  and  $42 \mu\text{g/ml}$ ), and showed an  $\text{EC}_{50}=92.5 \mu\text{g/ml}$  and  $91 \mu\text{g/ml}$ , respectively, on MT2 cells. However, only *Calophyllum brasiliense* hexane extract showed significant inhibition on viral replication ( $\text{ED}_{50}=37.1 \mu\text{g/ml}$ ), while *Clusia quadrangula* was less active ( $\text{ED}_{50}=124 \mu\text{g/ml}$ ). These results support the idea that plant extracts represent a valuable source of potential anti HIV compounds.

**Key words** Clusiaceae; HIV-1; reverse transcriptase; HIV-1 inhibition; *Calophyllum brasiliense*

HIV has been identified as the etiological agent of AIDS.<sup>1,2</sup> The disease is characterized by opportunistic pathogen infections, accompanied by a drastic decrease in the number of CD4 T cells. It is now accepted that there are two types of HIV: HIV-1 and HIV-2. Most AIDS worldwide is caused by HIV-1.<sup>3</sup> The replicative cycle of HIV has been extensively studied to determine specific processes that can serve as drug targets. One of the most critical steps is the reverse transcription of viral RNA into a cDNA copy, which is catalyzed by enzyme reverse transcriptase (RT).<sup>4</sup> Many strategies have focused on the search for inhibitors against this viral enzyme; these compounds should also be non-toxic to uninfected cells.<sup>5</sup> However, in spite of the number and variety of anti-HIV drugs, the rapid development of HIV resistance necessitates continuation of the search for new drugs including synthetic and natural products.<sup>6</sup>

In this context, highly active anti-retroviral therapy (HAART) has proved to be very beneficial to HIV infected patients, especially triple-drug combinations (3 RT inhibitors; 2 RT inhibitors+1 protease inhibitors) over mono and bi-drug combinations. HAART has provided a sustained reduction of the plasma viral load, increased the CD4 T cells counts, and also delayed disease progression to AIDS.<sup>7</sup> However, these benefits are limited by important risks associated with prolonged use of this treatment, such as metabolic disturbances, cross pharmacological reactions with other drugs, and low adherence to long or permanent treatment; these could subsequently induce the rapid development of viral resistance, as well as deep toxicity effects recognized on the cardio-vascular system, liver, kidney, brain, pancreas and skin.<sup>7,8</sup> For all these reasons and the fact that RT inhibitors are always used in triple-drug therapy, new substances with possible different toxic or resistant induction sites could offer alternative options in HIV RT therapeutics.

In the search for HIV-1 RT inhibitors, screening of plant extracts is a valuable method to discover new compounds potentially useful in therapeutics.<sup>9,10</sup> Coumarins and benzophenones with these antiviral properties have been isolated from several plant species of the Clusiaceae family through bioguided fractionation. Among the most important coumarins

able to inhibit HIV-1 RT with low cytotoxicity on uninfected cells are: (+)-calanolide A, (–)-calanolide B,<sup>11,12</sup> (+) inophyllum B and P,<sup>13,14</sup> soulattrolide;<sup>15</sup> (+)-cordatolide A and (–)-cordatolide B.<sup>16</sup> All these substances were isolated from *Calophyllum* species. The most outstanding compound is (+)-calanolide A, which showed potent and specific anti HIV-1 RT activity in *in vitro* as well as in *in vivo* pharmacological tests.<sup>17–20</sup> This compound is currently in Phase I/II clinical trials.<sup>21</sup> In the case of benzophenones, guttiferone A isolated from *Garcinia livingstonei*, guttiferone E and isoxanthochymol isolated from *Garcinia ovalifolia*<sup>22</sup> showed anti HIV-1 RT activity *in vitro*, but their cytotoxic effects on human lymphocytic cell lines precluded further studies.

Since species from the Clusiaceae family represent a potential source of new chemical identities able to inhibit HIV-1 RT,<sup>23</sup> we have carried out a screening of Clusiaceae species that thrive in Mexico. In this study we report the evaluation of organic extracts of 21 species in their capacity for HIV-1 RT inhibition *in vitro*, their toxicity effects on human lymphocytes and their inhibition of HIV-1 replication in a cellular system.

### MATERIALS AND METHODS

**Plant Material** To establish which species should be included in this study, a preliminary taxonomic review was carried out with herbaria specimens. Clusiaceae samples were collected by us or obtained by donation from collectors or herbaria. Collections were performed in the states of Guerrero, Veracruz and Oaxaca in Mexico. Vouchers are deposited at the IMSS Medicinal Herbarium (IMSSM), National University of Mexico (MEXU), the Faculty of Sciences (FCME) and the Institute of Ecology (XAL). Taxonomical identity of each species was confirmed by one of the authors, Lucio Lozada.

**Preparation of Extracts** Plant material, preferably leaves, was dried at room temperature, powdered and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1). The extracts were evaporated to dryness. In the case of *Calophyllum brasiliense*, hexane, acetone and methanol extracts were also prepared.

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: chilpa@servidor.unam.mx

**Biological Assays** Antiviral activities of Clusiaceae extracts were evaluated by three successive assays. HIV-1 RT inhibition was first screened, and those extracts that showed inhibition over 70% were selected for the next bioassay. Cytotoxic effect of the extracts was examined on human lymphocyte cell lines. Non-toxic extracts were selected for the last bioassay, which consisted of determining inhibition of HIV-1 IIIb/LAV replication. Concentration-dependent activity of the most active extracts was performed in the three biological assays. Nevirapine, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) was used as positive control.

**HIV-1 RT Inhibition** HIV-1 RT inhibition by extracts was evaluated by a non-radioactive immuno and colorimetric assay (Lenti RT Activity Assay, Cavid Tech).<sup>24</sup> Assay was performed according to the protocol provided by the manufacturer. Each extract was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and tested at 50 µg/ml.

**Toxic Effect on Human Lymphocytes Cell Line** The cytotoxic effect of anti HIV-1 RT active extracts was determined on human lymphocytic MT2 cells. The assay was performed as follows: MT2 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 0.25 µg/ml of streptomycin and 100 µg/ml of penicillin G, in the presence of the plant extracts. Culture was maintained at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. Plant extracts were dissolved in DMSO and tested at 50 µg/ml. After 48 h, cellular death was assessed by direct microscopic examination of trypan blue stained cells. Results were compared with a control of MT2 free of extract.

**Inhibition of HIV-1 IIIb/LAV Replication** Inhibition of viral replication by plant extracts was measured in a coculture of IIIb/LAV-Molt4 cells and non-infected MT2 cells in the presence of the plant extracts. Concentration of extracts and conditions of culture were the same as those described for the toxicity assay. After 48 h inhibition of viral replication was measured by a p24 antigen enzyme immunoassay (Genetic Systems HIV-1Ag EIA, Bio-Rad) performed in the culture supernatant.

## RESULTS

**Plant Material** Clusiaceae from Mexico was reviewed for the last time eighty years ago,<sup>25</sup> and 4 genera and 11 species were reported. Our taxonomic investigation in herbaria and in the field revealed that Clusiaceae in Mexico is now composed of 8 genera and 21 species (Table 1). Extracts of all the species of Clusiaceae were prepared and tested at least in the HIV-1 RT screening assay. Although the species *Marila laxiflora* is present in Mexico, it was not possible to collect it and bioassays were performed with leaves of this species collected in Peru (South America).

**HIV-1 RT Inhibition** Extracts prepared from the leaves of 21 species of Clusiaceae were screened for anti-HIV-1 RT activity (Table 1). Five species (23.8%) showed a high anti HIV-1 RT ( $\geq 70\%$  inhibition), while 7 species (33.3%) were moderately active (50 to 70% inhibition) and 9 species showed less than 50% inhibition (Table 1). The three most active extracts belong to the same species, *Calophyllum brasiliense*: hexane (77.9%), acetone (81.3%) and methanol (83.3%). Extracts of *Clusia massoniana* and *Vismia mexicana* produced a 72.9% inhibition of the enzyme, while *Clu-*

*sia guatemalensis* and *Vismia camparaguey* showed 70.8% inhibition. The anti-HIV-1 RT activity of extracts from other plant organs is also shown in Table 1. In this case, the highest inhibitory activity found was 64.1% inhibition for the flower extract of *Marila laxiflora*.

**Toxic Effect on Human Lymphocytes Cell Line** The lymphocyte toxicity assay was performed only with the most active extracts ( $\geq 70\%$ ) and *C. quadrangula*. Only five of the nine selected extracts were non-toxic to lymphocytes MT2: *Calophyllum brasiliense* (hexane, methanol and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH), *Vismia mexicana* and *Clusia quadrangula* (Fig. 1). Non-toxicity criteria were established based on no difference in cell number between control and treatment (ANOVA  $p < 0.05$ ).

**Inhibition of HIV-1 IIIb/LAV Replication** The hexane extract of *Calophyllum brasiliense* inhibited HIV-1 IIIb/LAV replication in 74.5%, while the methanol extract of *Calophyllum brasiliense*, *Vismia mexicana* and *Clusia quadrangula* extracts exhibited less than 52% inhibition (Fig. 2).

**Concentration-Dependent Effects** Since *Calophyllum brasiliense* hexane extract was the best in the 3 biological assays, its concentration-dependent effects were determined. The range of concentrations tested was 10–120 µg/ml. The HIV-1 RT IC<sub>50</sub> was 29.6 µg/ml, while ED<sub>50</sub> for HIV-1 IIIb/LAV replication was 37.1 µg/ml. EC<sub>50</sub> on MT2 cells was observed at 92.5 µg/ml. For comparison with *C. brasiliense* hexane extract, concentration-dependent assay was also performed for *Clusia quadrangula* extract. The IC<sub>50</sub> (42 µg/ml) and EC<sub>50</sub> (91 µg/ml) were similar to *Calophyllum brasiliense* hexane extract, but ED<sub>50</sub> was 3 times lower (ED<sub>50</sub> = 124 µg/ml) (Fig. 3). Nevirapine control showed EC<sub>50</sub> = >200 µM and ED<sub>50</sub> = 0.03 µM; these values were very similar to those reported in the literature for this compound with MT4 cells and HIV-1 IIIb.<sup>26</sup>

## DISCUSSION

A number of anti HIV-1 plant extract screenings have been performed during the last years and several active plants and secondary metabolites have been recognized, most of them able to act specifically on enzymatic targets.<sup>27,28</sup> Nevertheless, none of these substances is completely innocuous.<sup>29</sup> Therefore, evaluation of cytotoxicity is necessary towards the development of effective anti-HIV drugs. Several screenings include HIV-1 RT inhibition and cytotoxicity, but few also involve inhibition of viral replication in cellular systems.<sup>30,31</sup> This study offers an evaluation of these three parameters for selected extracts.

The present screening comprised the 8 genera and 21 species belonging to Clusiaceae that thrive in Mexico. Twelve species (57.1%) showed high to moderate anti HIV-1 RT activity, supporting the idea of Clusiaceae as a valuable source of HIV inhibitory natural product leads.<sup>23</sup> In this study *Calophyllum brasiliense* hexane extract showed the best performance in the three bioassays. Another interesting extract, *Clusia quadrangula* overcame the two former tests. Thus we performed concentration–response experiments with both extracts and contrasted them with published data (Fig. 3).

Regarding the HIV-1 RT inhibitory properties of plant extracts, some authors have pointed out that an IC<sub>50</sub>  $\leq 50$  µg/ml

Table 1. Screening of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH Extracts (50 µg/ml) of HIV-1 RT Inhibition by Clusiaceae that Thrive in Mexico

Species	Collector	State	Herbarium	Part used	% inhibition of HIV-1 RT
<i>Calophyllum brasiliense</i> CAMBESS.	R. Reyes-Chilpa s/n 10 Sept 1999	Veracruz (Los Tuxtlas)	IMSSM	Leaf	70.3±3.1
					77.9±0.5 <sup>a)</sup>
					81.3±1.9 <sup>b)</sup>
					83.3±1.0 <sup>c)</sup>
<i>Chrysochlamys guatemalteca</i> DONNELL-SMITH	T. Went <i>et al.</i> 2642	Veracruz	MEXU	Leaf	60.4±1.0
<i>Chrysochlamys nicaraguensis</i> (OERSTED, PLANCHON & TRIANA) HEMSLEY	B. Ortiz and Martiniano 170	Veracruz	FCME	Leaf	58.7±0.5
				Flower	31.0±2.0
<i>Clusia flava</i> JACQ.	R. Reyes-Chilpa s/n	Veracruz	IMSSM	Leaf	1.0±0.4
<i>Clusia guatemalensis</i> HEMSL.	A. Mendez 9593	Chiapas	MEXU	Leaf	70.8±1.2
<i>Clusia lundellii</i> STANDL.	L. Lozada 2424	Oaxaca	IMSSM	Leaf	48.0±1.5
				Peel of fruit	59.4±1.6
				Seed	50.0±1.0
				Stem	27.8±3.4
				Leaf	72.9±1.4
				Flower	53.6±2.4
<i>Clusia massoniana</i> LUNDELL.	E. Ramirez 414	Oaxaca	FCME	Leaf	56.1±1.1
<i>Clusia minor</i> L.	T. P. Ramamoorthy 2395	Oaxaca	FCME	Leaf	37.6±0.6
<i>Clusia pringlei</i> LUNDELL.	J. Panero 3923	Guerrero	MEXU	Leaf	65.6±1.2
<i>Clusia quadrangula</i> BARTLETT	L. Lozada 2428	Oaxaca	IMSSM	Leaf	51.9±1.2
				Peel of fruit	56.6±0.6
				Seed	59.7±1.9
				Stem	16.9±2.0
<i>Clusia rosea</i> JACQ.	C. Beutelspacher 15 March 1969	Veracruz	MEXU	Leaf	43.6±1.5
<i>Clusia salvinii</i> DONN. SM.	L. Lozada 2427	Oaxaca	IMSSM	Leaf	53.2±1.6
				Peel of fruit	47.3±1.9
				Seed	52.4±2.4
				Stem	39.6±2.0
<i>Clusia tetra-trianthera</i> MAGUIRE	D. E. Breedlove 28177	Chiapas	MEXU	Leaf	55.1±3.3
<i>Garcinia intermedia</i> (PITTIER) HAMMEL	C. Gallardo 326	Guerrero	FCME	Leaf	22.2±6.7
				Leaf	11.2±3.8
<i>Garcinia macrophylla</i> MART.	T. Wendt <i>et al.</i> 3304	Oaxaca	MEXU	Leaf	
<i>Mammea americana</i> L.	R. Reyes-Chilpa 27 February 1999	Veracruz	IMSSM	Leaf	64.7±1.3
				Flower	64.1±1.6
<i>Marila laxiflora</i> RUSBY	J. Schunke 6389	Peru	XAL	Leaf	17.1±4.2
<i>Symphonia globulifera</i> L. f.	M. A. Magaña and S. Zamudio 266	Tabasco	FCME	Leaf	
<i>Vismia baccifera</i> (L.) TRIANA & PLANCHON	L. Lozada 2435	Oaxaca	IMSSM	Leaf	57.8±1.9
				Stem	62.4±0.2
<i>Vismia camparaguey</i> SPRAGUE & RILEY	A. Campos 2573	Oaxaca	MEXU	Leaf	70.8±1.5
<i>Vismia mexicana</i> SCHLTDL.	E. Martinez 18999	Chiapas	FCME	Leaf	72.9±1.1
				Flower	56.8±2.8

a) Hexane extract. b) Acetone extract. c) Methanol extract. Values are means±S.D., n=3.

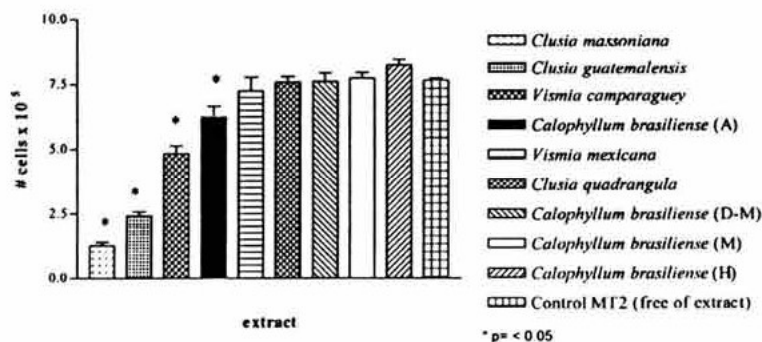


Fig. 1. Effect of Clusiaceae Extracts (50 µg/ml) on MT2 Cell Viability (A) acetone, (M) methanol, (D-M) dichloromethane-methanol, (H) hexane.



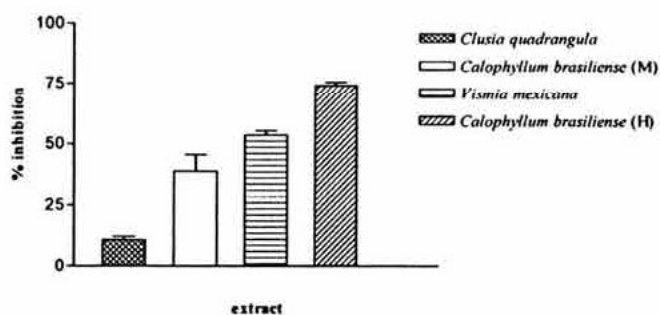


Fig. 2. Effect on HIV-1 IIIb/LAV Replication by Clusiaceae Extracts (50  $\mu\text{g/ml}$ ) (M) methanol, (H) hexane.

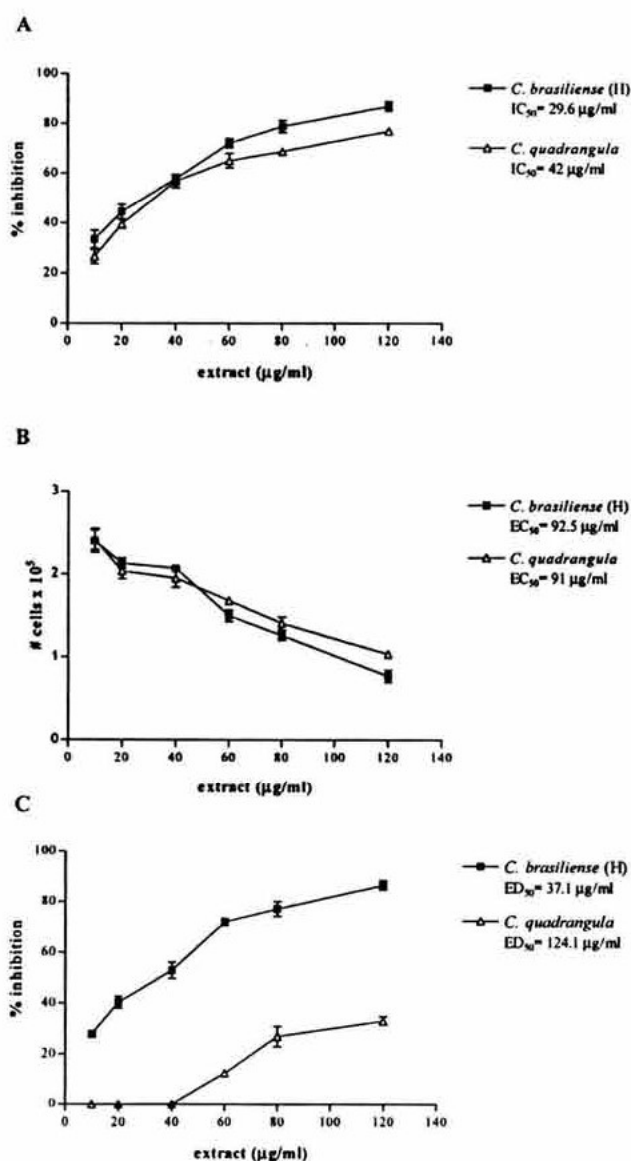


Fig. 3. Concentration-Response Curve of *Calophyllum brasiliense* Hexane and *Clusia quadrangula* Extracts

(A) Inhibition rates on HIV-1 RT. (B) Cell viability of lymphocytes MT2. (C) Inhibition of HIV-1 IIIb/LAV replication rates. Each point represents the mean of quadruplicate determinations.  $\pm$  S.D. of the respective means.

is considered significant.<sup>28,31)</sup> Therefore, *Calophyllum brasiliense* hexane extract ( $IC_{50}=29.6 \mu\text{g/ml}$ ) and *Clusia quadrangula* ( $IC_{50}=42 \mu\text{g/ml}$ ) can be included in this category (Fig. 3A). In relation to inhibition of HIV-1 replication in cellular systems by extracts, it was reported that *Crinum asiaticum* var. *japonicum* (Amaryllidaceae) showed significant anti HIV-1 activity ( $ED_{50}=12.5 \mu\text{g/ml}$ ).<sup>31)</sup> Our data show that *Calophyllum brasiliense* hexane extract required an  $ED_{50}=37.1 \mu\text{g/ml}$ , that still can be considered as significant. In contrast, *Clusia quadrangula* required a concentration almost 10 times higher ( $ED_{50}=124.1 \mu\text{g/ml}$ ). Concerning cytotoxicity, it has been indicated that an  $EC_{50}>200 \mu\text{g/ml}$  is a low cytotoxic profile.<sup>31)</sup> In our study, *Calophyllum brasiliense* hexane extract and *Clusia quadrangula* have an  $EC_{50}=92.5 \mu\text{g/ml}$  and  $91 \mu\text{g/ml}$ , respectively; in consequence, their performance in this parameter was poor (Fig. 3B).

Our data suggest that *Calophyllum brasiliense* hexane extract possesses anti-HIV activities. Curiously, this species was omitted in previous studies of the evaluation of anti HIV properties by McKee *et al.*<sup>32)</sup> These authors performed a chemotaxonomic study of *Calophyllum* species, mainly collected in Malaysia, in order to search for dipyrano-coumarins with HIV-1 RT inhibitory properties. Their method included a TLC test for detecting dipyrano-coumarins by a characteristic deep blue spot, using (-)-calanolide B and soulattrolide as standards, and positive extracts were further fractionated. *Calophyllum brasiliense* was not included as a candidate because of the absence of dipyrano-coumarins on TLC. We recently detected the existence of two chemotypes of *Calophyllum brasiliense* in Mexico. The first one is included in this study and showed high inhibitory value for hexane, acetone and methanol extracts in HIV-1 RT assay, suggesting that they may contain HIV-1 inhibitory substances. Bioguided fractionation of these extracts is currently in progress to determine the active constituents. The second chemotype contains mamea type coumarins, all of them inactive against HIV-1 RT, and these will be reported in an independent paper at a later date.

**Acknowledgments** This research was supported by grant IN207301 from DGAPA-UNAM and a CONACyT fellowship to Maira Huerta. The authors are grateful to Teresa Ramirez Apan for laboratory facilities and are particularly indebted to Herbaria curators Mario Sousa (MEXU), Francisco Lorea (XAL) and Abigail Aguilar (IMSSM) for donations.

REFERENCES AND NOTES

- 1) Barré-Sinoussi F, Cherman J. C., Rey F, Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vézinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L., *Science*, **220**, 868–871 (1983).
- 2) Gallo R. C., Salahuddin S. Z., Popovic M., Shearer G. M., Kaplan M., Haynes B. F., Palker T. J., Redfield R., Oleske J., Safai B., White G., Foster P., Markham P. D., *Science*, **224**, 500–503 (1984).
- 3) Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchick M., "Immunobiology," 5th ed., Chap. 11, Garland Publishers, New York, 2001.
- 4) Turner B. G., Summers M. F., *J. Mol. Biol.*, **285**, 1–32 (1999).
- 5) Borkow G., Barnard J., Nguyen T. N., Belmonte A., Wainberg M. A., Parniak M. A., *J. Virol.*, **71**, 3023–3030 (1997).
- 6) Raulin J., *Progr. Lipid Res.*, **41**, 27–65 (2002).
- 7) De Clercq E., "Antivirals against AIDS," Chap. 4, ed. by Unger R. E.,

- Kreuter J., Rübsamen-Waigmann H., Marcel Dekker, Inc., N. Y., 2000, pp. 107—150.
- 8) Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA CEN-SIDA.: (<http://www.salud.gob.mx/conasida/medicos/guias/medica/guia2004.pdf>), Secretaría de Salud, Gobierno de México, 20 January 2004.
  - 9) Vanden D. A., Vlietinck A. J., "Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plants," Vol. 6, ed. by Dey P. M., Harborne J. B., Academic Press, San Diego, 1991, pp. 47—69.
  - 10) Lednicer D., Narayan V. L., "Acquisition and Screening of Natural Products as Potential Anticancer and AIDS Antiviral Agents," ed. by Colegate S. M., Molyneux R. J., CRC Press, N. W. Boca Raton, Florida, 1993, pp. 160—172.
  - 11) Kashman Y., Gustafson K. R., Fuller R. W., Cardellina J. H. II, McMahon J. B., Currens M. J., Buckheit R. W., Jr., Hughes S. H., Cragg G. M., Boyd M. R., *J. Med. Chem.*, **35**, 2735—2743 (1992).
  - 12) Galinis D. L., Fuller R. W., McKee T. C., Cardellina J. H. II, Gulankowski R. J., McMahon J. B., Boyd M. R., *J. Med. Chem.*, **39**, 4507—4510 (1996).
  - 13) Patil A. D., Freyer A. J., Eggleston D. S., Haltiwanger R. C., Bean M. F., Taylor P. B., Caranfa M. J., Breen A. L., Bartus H. R., Johnson R. K., Hertzberg R. P., Westley J. W., *J. Med. Chem.*, **36**, 4131—4138 (1993).
  - 14) Spino C., Dodier M., Sotheeswaran S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 3475—3478 (1998).
  - 15) Pengsuparp T., Serit M., Hughes S. H., Soejarto D. D., Pezzuto J. M., *J. Nat. Prod.*, **59**, 839—842 (1996).
  - 16) Dharmaratne H. R. W., Wanigasekera W. M. A., Mata-Greenwood E., Pezzuto J. M., *Planta Med.*, **64**, 460—461 (1998).
  - 17) Currens M. J., Gulakowski R. J., Mariner J. M., Moran R. A., Buckheit R. W., Jr., Gustafson K. R., McMahon J. B., Boyd M. R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **279**, 645—651 (1996).
  - 18) Currens M. J., Mariner J. M., McMahon J. B., Boyd M. R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **279**, 652—661 (1996).
  - 19) Xu Z., Hollingshead M. G., Borgel S., Elder C., Khilevich A., Flavin M. T., *Bioorg. Med. Lett.*, **9**, 133—138 (1999).
  - 20) Creagh T., Ruckle J. L., Tolbert D. T., Giltner J., Eiznhamer D. A., Dutta B., Flavin M. T., Xu Z., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1379—1386 (2001).
  - 21) Sarawak MediChem Pharmaceuticals, Inc.: (<http://www.sarawak-medicchem.com/cala/dev.htm>), Advances Life Sciences, Inc. and Sdn Bhd Web, 21 November 2003.
  - 22) Gustafson K. R., Blunt J. W., Munro M. H. G., Fuller R. W., McKee T. C., Cardellina J. H. II, McMahon J. B., Cragg G. M., Boyd M. R., *Tetrahedron*, **48**, 10093—10102 (1992).
  - 23) Fuller R. W., Westergaard C. K., Collins J. W., Cardellina J. H. II, Boyd M. R., *J. Nat. Prod.*, **62**, 67—69 (1999).
  - 24) Shao X., Ekstrand D. H. L., Bhikhabhai R., Kallander C. F. R., Gronowitz J. S., *Antivir. Chem. Chemother.*, **8**, 149—159 (1997).
  - 25) Standley P. C., *Contribut. Unit. Stat. Nat. Herb.*, **23**, 824—827 (1923).
  - 26) Merluzzi V. J., Hargrave K. D., Labadia M., Grozinger K., Skoog M., Wu J. C., Shih C. K., Eckner K., Hattox S., Adams J., Rosethal A. S., Faanes R., Ecner R. J., Koup R. A., Sullivan J. L., *Science*, **250**, 1411—1413 (1990).
  - 27) Tan G. T., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D., *J. Nat. Prod.*, **54**, 143—154 (1991).
  - 28) El-Mekawy S., Meselhy M. R., Kusumoto I. T., Kadota S., Hattori M., Namba T., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 641—648 (1995).
  - 29) Bedoya L. M., Sanchez-Palomino S., Abad M. J., Bermejo P., Alami J., *J. Ethnopharmacol.*, **77**, 113—116 (2001).
  - 30) Hnatyszyn O., Broussalis A., Herrera G., Muschietti L., Coussio J., Martino V., Ferraro G., Font M., Monge A., Martinez-Irujo J. J., Sanromán M., Cuevas M. T., Santiago E., Lasarte J. J., *Phytother. Res.*, **13**, 206—209 (1999).
  - 31) Min B. S., Kim Y. H., Tomiyama M., Nakamura N., Miyashiro H., Otake T., Hattori M., *Phytother. Res.*, **15**, 481—486 (2001).
  - 32) McKee T. C., Covington C. D., Fuller R. W., Bokesch H. R., Young S., Cardellina J. H. II, Kadushin M. R., Soejarto D. D., Stevens P. F., Cragg G. M., Boyd M. R., *J. Nat. Prod.*, **61**, 1252—1256 (1998).



## HIV-1 Inhibitory Compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves

Maira HUERTA-REYES,<sup>a</sup> Maria del Carmen BASUALDO,<sup>b</sup> Fumiko ABE,<sup>c</sup> Manuel JIMENEZ-ESTRADA,<sup>a</sup> Carmen SOLER,<sup>b</sup> and Ricardo REYES-CHILPA<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup> Department of Natural Products, Institute of Chemistry, National University of Mexico; <sup>b</sup> HIV/AIDS Section, Institute of Biomedical Sciences, National University of Mexico; Ciudad Universitaria, 04510, Mexico D. F., Mexico; and <sup>c</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan.

Received April 5, 2004; accepted June 26, 2004

The hexane, acetone and methanol extracts of *Calophyllum brasiliense* leaves were fractionated following a three bioassay guide: high HIV-1 RT inhibition, low cytotoxicity on MT2 cells and high inhibition of HIV-1 IIIb/LAV replication. This led to the isolation of three anti HIV-1 dipyrano-coumarins: calanolides A and B and soulattrolide. In contrast, other isolated compounds such as apetalic acid, isoapetalic acid, a structural isomer of isoapetalic acid, friedelin, canophyllol and amentoflavone were devoid of HIV-1 RT inhibitory activity. Calanolide C was also obtained as a natural product and showed moderate inhibitory properties.

**Key words** *Calophyllum brasiliense*; HIV-1 RT; calanolide

The dipyrano-coumarin (+)-calanolide A (6) has potent activity against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (HIV-1 RT). This compound was first isolated from the tropical rainforest tree *Calophyllum lanigerum* var. *austrororiaceum* (Clusiaceae) in 1992.<sup>1)</sup> The chemical constituents of *Calophyllum* species have been actively studied and yielded a number of dipyrano-coumarins with strong anti HIV-1 RT activity, for instance: (–)-calanolide B (7) isolated from *C. lanigerum* var. *austrororiaceum*;<sup>1)</sup> inophyllums B and P isolated from *C. inophyllum*;<sup>2)</sup> soulattrolide isolated from *C. inophyllum*<sup>3)</sup> and *C. teysmanii*.<sup>4)</sup>

The genus *Calophyllum* consists of 180 species with a pantropical distribution. Species studied for anti HIV activity have been collected mainly in Malaysia and Sri Lanka. In the American Continent, *Calophyllum* is represented by 8 species;<sup>5)</sup> among them, *Calophyllum brasiliense* is the widest distributed species from Brazil to Mexico.<sup>6)</sup> Previous chemical studies of *C. brasiliense* leaves from Brazil have reported hyperin, amentoflavone, quercetin, gallic and protocatechuic acids.<sup>7)</sup> We have previously reported that the organic extracts of *C. brasiliense* leaves collected in Los Tuxtlas, Mexico, showed significant inhibition on HIV-1 RT and HIV replication.<sup>8)</sup> We are now reporting the bioguided isolation of the active compounds of this species.

### MATERIALS AND METHODS

**Plant Materials and Extracts Preparation** *C. brasiliense* leaves were collected at Río Chumiapan, in San Andrés Tuxtla, state of Veracruz, Mexico. A voucher was deposited with the number 14425 at Herbarium of Mexican Institute for Social Security (IMSSM) in Mexico City. Leaves were dried at room temperature and powdered (945.5 g). Extracts were prepared with hexane, acetone and methanol at room temperature. The solvent was concentrated *in vacuo*.

**Isolation of the Active Constituents** Bioguided chromatography was carried out with hexane, acetone and methanol extracts previously reported with anti HIV-1 properties.<sup>8)</sup> Identification of pure compounds was performed by spectroscopic methods (500 MHz for <sup>1</sup>H-NMR and 125 MHz for <sup>13</sup>C-NMR) and high resolution MS FAB. Bidimensional spectra and comparison with published data (HMQC and

HMBC) were relevant for identification, as well as [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>.

**Hexane Extract:** The extract was concentrated in a rotary evaporator (32 g). Two triterpens, friedelin<sup>9)</sup> (1, 1.82 g) and canophyllol<sup>9)</sup> (2, 1.64 g) precipitated spontaneously during solvent evaporation. Part of the extract (16 g) was fractionated by silica gel (70–230 mesh) column chromatography (CC) eluting with hexane–ethyl acetate (1:0 to 0:1). A total of 270 fractions were collected and monitored by TLC. Similar fractions were combined to give 27 pooled fractions which were tested for anti HIV-1 RT properties. Active fractions 18 and 19 were eluted with hexane–ethyl acetate (9:1). Fraction 18 was subjected to chromatography column (silica gel C-18) using acetone–water (7:3 to 1:0). Apetalic acid (3, 520 mg) was obtained in subfractions 5–6 eluted with acetone–water (7:3). The remaining subfractions 7–8 were rechromatographed on silica gel C-18 eluting with acetonitrile–water (9:1 to 1:0). Final purification was achieved by preparative HPLC (column: Shiseido Silica Gel AG 80 Å, 5  $\mu$ m, size 10 mm i.d.  $\times$  250 mm; flow: 3 ml/min) using an isocratic elution (hexane–ethyl acetate 5:5) obtaining successively soulattrolide (9, 10 mg), (–)-calanolide B (7, 90 mg), (+)-calanolide C (8, 30 mg) and (+)-calanolide A (6, 10 mg). The other active fraction, 19 was chromatographed by CC (silica gel C-18) using acetone–water (7:3 to 1:0). Fractions 4–9 eluted with acetone–water (7:3) were combined and subjected to CC (silica gel C-18) eluting with methanol–water, acidified with acetic acid 1% (8:2). The structural isomer of isoapetalic acid (5, 20 mg), and isoapetalic acid (4, 20 mg) were obtained.

**Acetone Extract:** After concentrating the extract (46 g), part of it (5 g) was subjected to CC with Diaion (HP20) eluting successively with methanol–water 6:4 (fr. 1), methanol (fr. 2) and ethyl acetate (fr. 3). Fractions 1 and 3 were inactive. From fraction 2 (245 mg), amentoflavone<sup>10)</sup> (10, 30 mg) precipitated spontaneously. The remaining material from this fraction inhibited HIV-1 RT. The analysis by TLC showed the presence of calanolides ( $R_f=0.42$ ; acetone–water 8:2, deep blue spot; stained with 2% Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> in 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, reference (–)-calanolide B).

**Methanol Extract:** Part of the extract (500 mg) was passed through a polyamide column in order to remove tannins according with Tan *et al.*, 1991.<sup>11)</sup> The column was first soaked

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: chilpa@servidor.unam.mx

in water overnight. Elution started with water, followed by 50% methanol, and finally, absolute methanol. The eluates were collected, combined and evaporated to dryness. The other part of the methanol extract was macerated with EtOAc obtaining an insoluble fraction. This material was positive for tannins with 1% gelatine-NaCl solution, and 3% ferric chloride-30% sulfuric acid.

**Compound 3 (Apetalic Acid):** Yellow oil. HR-FAB-MS  $m/z$ : 389.1963 (Calcd for  $C_{22}H_{29}O_6$ : 389.1965). FAB-MS  $m/z$ : 389 ( $M^+ + 1$ ), 373, 329.  $[\alpha]_D^{25} - 53^\circ$  ( $c = 1.5$ ,  $CHCl_3$ ).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) and  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ) data were found to be in good agreement with the literature values.<sup>12</sup>

**Compound 4 (Isoapetalic Acid):** Yellow oil. HR-FAB-MS  $m/z$ : 389.1963 (Calcd for  $C_{22}H_{29}O_6$ : 389.1965). FAB-MS  $m/z$ : 389 ( $M^+ + 1$ ), 373, 329.  $[\alpha]_D^{25} - 16.1^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $CHCl_3$ ).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) and  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ) data were found to be in good agreement with the literature values.<sup>13</sup>

**Compound 5 (Structural Isomer of Isoapetalic Acid):** Yellow oil.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.86 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz, 24- $CH_3$ ), 1.14 (2H, m, 23- $CH_2$ ), 1.2 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, 16- $CH_3$ ), 1.44 (3H, s, 18- $CH_3$ ), 1.44 (3H, s, 17- $CH_3$ ), 1.49 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz, 15- $CH_3$ ), 1.88 (2H, m, 22- $CH_2$ ), 2.54 (1H, dq,  $J = 11$ , 7 Hz, 3-H), 2.76 (1H, dd,  $J = 15.0$ , 7.0 Hz, 20-H), 2.86 (1H, dd,  $J = 15.0$ , 8.0 Hz, 20'-H), 3.74 (1H, m, 19-H), 4.16 (1H, m, 2-H), 5.45 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, 10-H), 6.53 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, 11-H), 12.70 (1H, s, 5-OH).  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 10.1 (C-16), 14.0 (C-24), 19.6 (C-15), 20.9 (C-23), 28.2 (C-17), 28.3 (C-18), 30.3 (C-19), 35.3 (C-22), 45.7 (C-3), 78.0 (C-9), 78.8 (C-2), 101.0 (C-12), 101.6 (C-14), 115.8 (C-11), 125.7 (C-10), 155.1 (C-7, C-13), 198.7 (C-4). EI-MS  $m/z$ : 389 ( $M^+ + 1$ ), 373, 271.  $[\alpha]_D^{25} - 28^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $CHCl_3$ ).

**Compound 6 ((+)-Calanolide A):** Yellow oil. HR-FAB-MS  $m/z$ : 393.1680 (Calcd for  $C_{22}H_{26}O_5Na$ : 393.1678). FAB-MS  $m/z$ : 371 ( $M^+ + 1$ ), 353, 299.  $[\alpha]_D^{25} + 48.2^\circ$  ( $c = 0.5$ ,  $CHCl_3$ ).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) and  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ) data were found to be in good agreement with the literature values.<sup>1</sup>

**Compound 7 ((-)-Calanolide B):** White needles, mp 176–179 °C. HR-FAB-MS  $m/z$ : 393.1680 (Calcd for  $C_{22}H_{26}O_5Na$ : 393.1678). FAB-MS  $m/z$ : 371 ( $M^+ + 1$ ), 353, 299.  $[\alpha]_D^{25} - 38.6^\circ$  ( $c = 0.5$ , acetone).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) and  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ) data were found to be in good agreement with the literature values.<sup>1</sup>

**Compound 8 ((+)-Calanolide C):** Yellow oil. HR-FAB-MS  $m/z$ : 393.1685 (Calcd for  $C_{22}H_{26}O_5Na$ : 393.1678). FAB-MS  $m/z$ : 371 ( $M^+ + 1$ ), 353, 299.  $[\alpha]_D^{25} + 96.3^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $CHCl_3$ ).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) and  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ) data were found to be in good agreement with the literature values.<sup>14</sup>

**Compound 9 (Soulattrolide):** Light yellow needles, mp 177–181 °C. HR-FAB-MS  $m/z$ : 427.1526 (Calcd for  $C_{25}H_{24}O_5Na$ : 427.1521). FAB-MS  $m/z$ : 405 ( $M^+ + 1$ ), 387, 371.  $[\alpha]_D^{25} - 14^\circ$  ( $c = 0.25$ ,  $CHCl_3$ ).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) and  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ) data were found to be in good agreement with the literature values.<sup>3</sup>

**Biological Assays** Antiviral activity of *C. brasiliense* fractions were evaluated by three successive assays. HIV-1 RT inhibition was first screened, and those fractions that showed inhibition over 70% were selected for the next bioassay. Cytotoxic effect of the fractions was examined on human lymphocytes cell lines. Non toxic fractions were selected for the last bioassay, which consisted on determining inhibition of HIV-1 IIIb/LAV replication. Nevirapine, a non nucleoside

reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) was used as positive control.

**HIV-1 RT Inhibition Assay** Fractions and pure compounds were evaluated by a non-radioactive immuno and colorimetric assay (Lenti RT Activity Assay, Cavid Tech).<sup>15</sup> Assay was performed according to the protocol provided by manufacturers. Each fraction was dissolved in DMSO and tested at 50  $\mu$ g/ml. Concentration tested for pure compounds was 1 mM.  $IC_{50}$  values were calculated for most active compounds (over 70%).

**Toxic Effect on Human Lymphocytes Cell Line** The cytotoxic effect of anti HIV-1 RT active fractions were determined on human lymphocytic MT2 cells. The assay was performed as follows: MT2 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.25  $\mu$ g/ml of streptomycin and 100  $\mu$ g/ml of penicillin G, in presence of the fractions. Culture was maintained at 37 °C under 5%  $CO_2$  humidified atmosphere. Fractions were dissolved in DMSO and tested at 50  $\mu$ g/ml. After 48 h, cellular death was assessed by direct microscopic examination of trypan blue stained cells. Results were compared with a control of MT2 free of extract.

**Inhibition of HIV-1 IIIb/LAV Replication** Inhibition of viral replication by fractions was measured in a coculture of IIIb/LAV-Molt4 cells and non-infected MT2 cells in the presence of the fractions. Concentration of fractions and conditions of culture were the same as those described for the toxicity assay. After 48 h inhibition of viral replication was measured by a p24 antigen enzyme immunoassay (Genetic Systems HIV-1Ag EIA, Bio-Rad) performed in the culture supernatant.

## RESULTS

Most of the fractions obtained from the *C. brasiliense* hexane leaves extract showed low HIV-1 RT inhibition, however, fractions 18 and 19 showed high inhibition (over 70%) (Table 1). Both fractions were non toxic to MT2 human lymphocytes (Fig. 1A), and also strongly inhibited IIIb/LAV replication (Fig. 1B). Isolation of the pure compounds from these fractions was performed by chromatography, obtaining compounds 3 to 9 (Fig. 2). All of them were tested, but only compounds 6, 7 and 9 showed a potent inhibition on HIV-1 RT.  $IC_{50}$  were calculated for these compounds, that were

Table 1. Evaluation of HIV-1 Inhibitory Properties of Fractions from *Calophyllum brasiliense* Leaves Extracts

Fraction/extract	HIV-1 RT inhibition (%)
Hexane	
1–17	<40
18	74.8 ± 3.3
19	75.5 ± 3.7
20–27	<40
Acetone	
1	12.7 ± 3.1
2	59.5 ± 3.5
3	28.2 ± 1.7
Methanol	
EtOAc insoluble fraction	74.2 ± 1.6
Extract after polyamide column	38.6 ± 4.9

Values are means ± S.D.,  $n = 3$ .



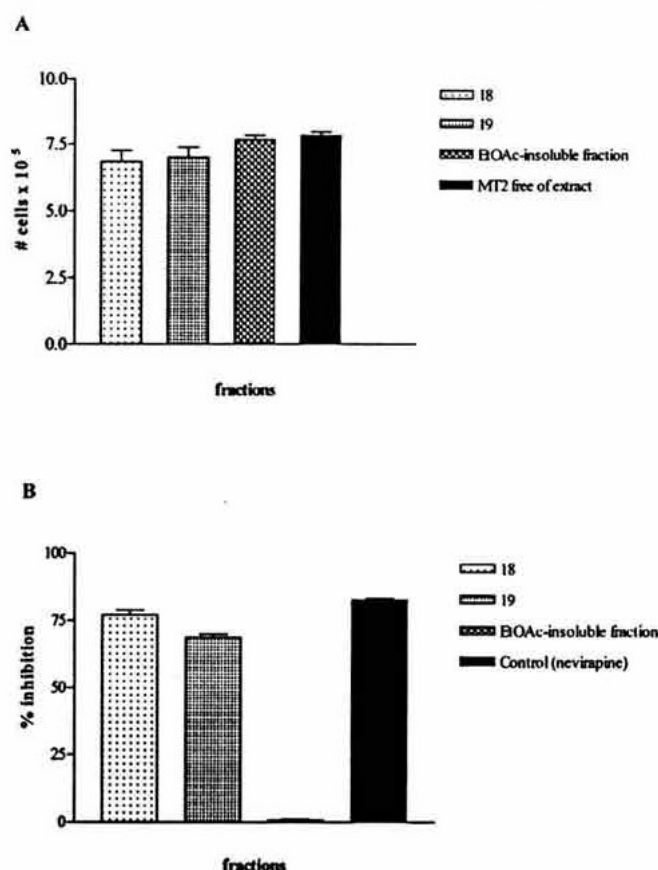


Fig. 1. Toxic and Antiviral Effect of Active Fractions from Hexane and Methanol Extracts from *Calophyllum brasiliense* Leaves

(A) Cell viability of lymphocytes MT2. (B) Inhibition of HIV-1 IIIb/LAV replication.

0.34, 0.5 and 0.66  $\mu\text{M}/\text{ml}$ , respectively. Compound 8 was moderately active (50 to 70% inhibition), while compounds 4 and 5 exhibited low inhibition. Compound 3 was inactive (Table 2). Compounds 1 and 2 were also isolated from the hexane extract, but any of them was able to inhibit HIV-1 RT (Table 2).

Regarding to acetone extract, fractions 1, 2 and 3 were evaluated for HIV-1 RT inhibition but only fraction 2 showed moderate activity (Table 1). This fraction analyzed by TLC suggested that contains traces of calanolides. Amentoflavone (10) was also obtained from fraction 2 and tested, showing low HIV-1 RT inhibition (Table 2). This compound showed a very strong cytotoxic effect on MT2 cells ( $<2.0 \times 10^5$  cells) when we compared with control free of substance.

The methanol extract showed high HIV-1 RT inhibitory activity (83.3%), however, this value decreased to 38.6% after tannin removal (Table 1). EtOAc insoluble fraction from methanol extract was able to inhibit HIV-1 RT activity and showed low cytotoxicity (Fig. 1A), nevertheless it was not able to inhibit IIIb/LAV replication (Fig. 1B).

## DISCUSSION

The chemical analysis indicates that main compounds of *C. brasiliense* hexane extract from the leaves are two triterpenes, friedelin (1) and canophyllol (2), and three chromanone carboxylic acids, apetalic acid (3), isoapetalic acid (4) and a structural isomer of isoapetalic acid (5). The minor-

ity compounds are four dipyrano-coumarins, (+)-calanolide A (6), (-)-calanolide B (7), (+)-calanolide C (8) and soulattrolide (9).

The apetalic acid (3) has been previously isolated as its methyl ester from the bark of *C. brasiliense* seed kernels.<sup>12</sup> Isoapetalic acid (4) and its structural isomer (5) have been isolated as their methyl esters from the bark of *C. bracteatum*, *C. calaba* var. *calaba*, *C. moonii* and *C. trapezifolium*.<sup>13</sup>

It is interesting to note that the main compounds, triterpenes and chromanone carboxylic acids, found in the hexane extract were inactive or showed a low inhibition on HIV-1 RT (Table 2). On the other hand, the minority compounds (+)-calanolide A (6), (-)-calanolide B (7) and soulattrolide (9) were identified as the active compounds against HIV-1 RT. These compounds have been previously isolated from the fruit, twigs, bark and latex of different *Calophyllum* Asiatic species.<sup>1,3,4</sup> Recently, (+)-calanolide A (6) and (-)-calanolide B (7) were isolated from the stem bark of *C. brasiliense* from Brazil,<sup>16</sup> however, this is the first time that these dipyrano-coumarins are found in the leaves. Both calanolides are considered as non nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) that can inhibit primarily HIV-1 RT, but fail to inhibit HIV-2 RT. They interact allosterically with the RT, altering its structural conformation, resulting in a partial or total disruption of the RT catalytic complex, template-primer, and the substrate.<sup>17</sup> Specifically, (+)-calanolide A inhibits HIV-1 RT by binding two sites, one competitive and other noncompetitive.<sup>18</sup> It is considered as a unique inhibitor among NNRTIs,<sup>19</sup> since it is able to inhibit the AZT resistant variant which bears two mutations at codon 181, tyrosine  $\rightarrow$  cysteine (Y181C), and codon 131, leucine  $\rightarrow$  asparagine (L103N).<sup>20</sup> Most NNRTIs are not able to inhibit the variant bearing the Y181C amino acid mutation.<sup>21</sup> The importance of ring D (2,3-dimethylchroman-4-ol) for HIV-1 inhibitory properties of calanolides A and B, inophyllums and cordatolides has been thoroughly demonstrated.<sup>22,23</sup> Highest inhibitory activity of HIV-1 RT has been observed for calanolide A that posses *trans* configuration between methyl groups at C-10 and C-11, while other configurations led to a reduction in potency. An oxygenated function at C-12, and substituents at C-4 are also relevant for HIV-1 RT inhibitory activity following the series propyl > phenyl > methyl.<sup>24</sup>

Regarding compound 8, Kashman *et al.*, 1992<sup>11</sup> reported the isolation of (+)-calanolide C from the fruit and twigs of *C. lanigerum*. However, the proposed structure was reviewed and corrected by McKee *et al.*, 1995 after obtaining the synthetic product.<sup>14</sup> The original assignments for (+)-calanolide C proposed by Kashman *et al.*, 1992<sup>11</sup> are actually those of pseudocalanolide C.<sup>14</sup> The NMR chemical shifts observed for the compound 8 here isolated, led to its identification as (+)-calanolide C according to data reported by McKee *et al.*, 1995.<sup>14</sup> Diagnostic signals were 6.62 for H-8 and 5.07 for H-12 as well as 116.6 for C-8, 106.5 for C-8a, 62.9 for C-12 and 105.8 for 12a. To our best knowledge, this is the first time that (+)-calanolide C (8) is obtained as a natural product, and evaluated against HIV-1 RT. Although compound 8 exhibits the pharmacophoric ring D, as well as a propyl group on C-4, it did not show potent inhibition on HIV-1 RT. This could be due to the  $\beta$ -*cis* orientation of methyl groups on C-10 and C-11 (Fig. 2). Therefore our results support

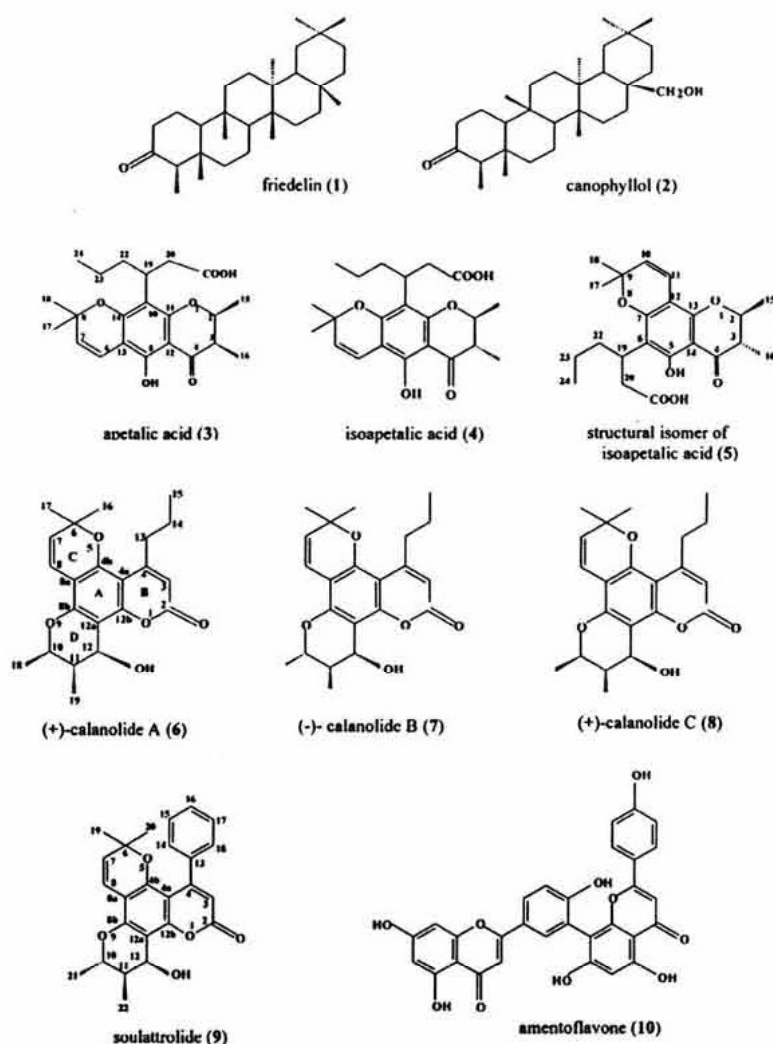


Fig. 2. Isolated Compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves

Table 2. Evaluation of Pure Compounds Isolated from *Calophyllum brasiliense* Leaves against HIV-1 RT

Compounds	HIV-1 RT inhibition (%)
1	20.2±1.6
2	7.6±2.1
3	2.0±0.6
4	20.6±3.2
5	29.7±1.7
6	81.5±0.9
7	76.2±2.2
8	50.7±2.0
9	77.7±1.6
10	17.5±2.4
Control (nevirapine)	82.6±3.1

Values are means±S.D., *n*=3.

the structure-activity relationships (SAR) of *Calophyllum* dipyrano-coumarins proposed to date.<sup>24,25)</sup>

Concerning to the acetone extract, we previously reported that this extract had an inhibitory effect on HIV-1 RT, but it was also cytotoxic to MT2 human lymphocytes.<sup>8)</sup> The former activity could be probably due to traces of calanolides. Meanwhile, amentoflavone (10) which was devoid of inhibitory activity on HIV-1 RT, was cytotoxic to MT2 cells

and therefore could be responsible of the overall acetone extract toxicity.

It is known that polar extracts may contain tannins and others like polyphenol compounds able to inhibit HIV-1 RT,<sup>11,26)</sup> DNA polymerase,<sup>27)</sup> DNA topoisomerase I and II,<sup>28)</sup> and the binding of HIV-1 gp120/CD4 T-cell receptor.<sup>11,29)</sup> Since tannins show high affinity for proteins and affect a number of biochemical reactions, they are generally considered as unselective inhibitors.<sup>30)</sup> In our case, the methanol extract of *C. brasiliense* leaves showed HIV-1 RT inhibition<sup>8)</sup> that could be attributed to tannins.

Our data indicate that anti-HIV properties of *C. brasiliense* leaves extracts are due to the presence of (+)-calanolide A (6), (+)-calanolide B (7), and soulattrolide (9). Interestingly, dipyrano-coumarins were not detected in *C. brasiliense* in a previous study performed by other authors, using a TLC screening.<sup>31)</sup> This could arise from the existence of chemotypes in the species. In Mexico, we have found two populations of *C. brasiliense* that differ in the chemistry of their leaves. One chemotype with chromanones and calanolides was object of this paper, while second chemotype that we have recently reported, contains mammea type coumarins such as mammea A/BA, A/BB, isomammeigin, mammea B/BA, B/BB, C/OA, C/OB, B/BA cyclo F and B/BB cyclo F,

all of them inactive against HIV-1 RT.<sup>32)</sup>

## CONCLUSION

The chemical analysis of the extracts of *Calophyllum brasiliense* leaves collected in San Andres Tuxtla, state of Veracruz, showed that the minority compounds dipyrano-coumarins, (+)-calanolide A, (-)-calanolide B, and soulattrolide are the responsible of its anti-HIV properties. On the other hand, the majority compounds, the chromanone carboxylic acids, triterpens and biflavonoid were inactive against HIV-1 RT.

**Acknowledgments** This research was supported by grant IN207301 from DGAPA-UNAM. Maira Huerta is grateful with CONACyT for providing a fellowship and also with The Nagai Foundation Tokyo for an International Fellowship. Authors are grateful with M. C. Antonio Nieto, the staff of Natural Products and Pharmacology Laboratory at Fukuoka University for laboratory facilities and with Ms. Y. Iwase and Mr. H. Hanazono for the NMR and MS measurements. We are also grateful with Nieves Zavala Segovia, Rocío Patiño Maya, Luis Velasco Ibarra, Javier Pérez Flores and Eréndira García for recording some of the spectra.

## REFERENCES AND NOTES

- 1) Kashman Y., Gustafson K. R., Fuller R. W., Cardellina II J. H., McMahon J. B., Currens M. J., Buckheit R. W. Jr., Hughes S. H., Cragg G. M., Boyd M. R., *J. Med. Chem.*, **35**, 2735—2743 (1992).
- 2) Patil A. D., Freyer A. J., Eggleston D. S., Haltiwanger R. C., Bean M. F., Taylor P. B., Caranfa M. J., Breen A. L., Bartus H. R., Johnson R. K., Hertzberg R. P., Westley J. W., *J. Med. Chem.*, **36**, 4131—4138 (1993).
- 3) Gunasekera S. P., Jayatilake G. S., Selliah S. S., Sultanbawa M. U. S., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1977**, 1505—1511 (1977).
- 4) Pengsuparp T., Serit M., Hughes S. H., Soejarto D. D., Pezzuto J. M., *J. Nat. Prod.*, **59**, 839—842 (1996).
- 5) Stevens P. F., *J. Arnold Arbor.*, **61**, 117—171 (1980).
- 6) Pennington T. D., Sarukhán J., "Manual para la Identificación de Campo de los Principales Árboles Tropicales de México," 2nd. ed., Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, México, 1998.
- 7) daSilva K. L., dos Santos A. R., Mattos P. E., Yunes R. A., Delle-Monache F., Cechinel-Filho V., *Therapie*, **56**, 431—434 (2001).
- 8) Huerta-Reyes M., Basualdo M. C., Lozada L., Jiménez-Estrada M., Soler C., Reyes-Chilpa R., *Biol. Pharm. Bul.*, **27**, 916—920 (2004).
- 9) Ahmad V. U., Rahman A. U., "Pentacyclic Triterpenoids. Handbook of Natural Products Data," Vol. 2., Elsevier, The Netherlands, 1994.
- 10) Hörhammer L., Wagner H., Reinhardt H., *Naturwissenschaften*, **52**, 161 (1965).
- 11) Tan G. T., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D., Hughes S. H., *J. Nat. Prod.*, **54**, 143—154 (1991).
- 12) Plattner R. D., Spencer G. F., Weisleder D., Kleiman R., *Phytochemistry*, **13**, 2597—2602 (1974).
- 13) Samarawecra U., Sothceswaran S., Sultanbawa M. U. S., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1983**, 703—706 (1983).
- 14) McKee T. C., Cardellina II J. H., Dreyer G. B., Boyd M. R., *J. Nat. Prod.*, **58**, 916—920 (1995).
- 15) Shao X., Ekstrand D. H. L., Bhikhabhai R., Källander C. F. R., Gronowitz J. S., *Antivir. Chem. Chemother.*, **8**, 149—159 (1997).
- 16) Ito C., Itoigawa M., Mishina Y., Filho C. V., Enjo, F., Tozuda H., Nishino H., Furukawa H., *J. Nat. Prod.*, **66**, 368—371 (2003).
- 17) Gussio R., Pattabiraman N., Zaharevitz D. W., Kellogg G. E., Topol I. A., Rice W. G., Schaeffer C. A., Erickson J. W., Kurt S. K., *J. Med. Chem.*, **39**, 1645—1660 (1996).
- 18) Currens M. J., Mariner J. M., McMahon J. B., Boyd M. R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **279**, 652—661 (1996).
- 19) Buckheit W. R., Boltz V. F., Yeagy-Bargo S., Weislow O., Mayers D. L., Boyer P. L., Hughes S. H., Pan B. C., Chu S. H., Bader J. P., *Virology*, **210**, 186—193 (1995).
- 20) Yang S. S., Cragg G. M., Newman D. J., Bader J. P., *J. Nat. Prod.*, **64**, 265—277 (2001).
- 21) Richman D. D., Shih C. K., Lowy I., Rose J., Prodanovich P., Goff S., Griffin J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 11241—11245 (1991).
- 22) McKee T. C., Fuller R. W., Covington C. D., Cardellina J. H., Gulakowski R. J., Krepps B. L., McMahon J. B., Boyd M. R., *J. Nat. Prod.*, **59**, 754—758 (1996).
- 23) Ishikawa T., Oku Y., Kotake K. I., *Tetrahedron*, **53**, 14915—14928 (1997).
- 24) Ishikawa T., *Heterocycles*, **53**, 453—473 (2000).
- 25) Flavin M. T., Rizzo J. D., Khilevich A., Kucherenko A., Sheinkam A. K., Vilaychack V., Lin L., Chen W., Greenwood E. M., Pengsuparp T., Pezzuto J. M., Hughes S. H., Flavin T. M., Cibulski M., Boulanger W. A., Shones R. L., Xu Z. Q., *J. Med. Chem.*, **39**, 1303—1313 (1996).
- 26) Nishizawa M., Yamagishi T., Dutschman G. E., Parker W. B., Bodner A. J., Kilkuskie R. E., Cheng Y. C., Lee K. H., *J. Nat. Prod.*, **52**, 762—768 (1989).
- 27) Nakane H., Fukushima M., Ono K., *J. Nat. Prod.*, **53**, 1234—1240 (1990).
- 28) Kashiwada Y., Nonaka G., Nishioka I., Lee K. J., Bori I., Fukushima Y., Bastow K. F., Lee K. H., *J. Pharm. Sci.*, **82**, 487—492 (1993).
- 29) Collins R. A., Ng T. B., Fong W. P., Wan C. C., Yeung H. W., *Life Sci.*, **60**, 345—351 (1997).
- 30) Au T. K., Lam T. L., Ng T. B., Fong W. P., Wan D. C. C., *Life Sci.*, **68**, 1687—1694 (2001).
- 31) McKee T. C., Covington C. D., Fuller R. W., Bokesch H. R., Young S., Cardellina II J. H., Kadushin M. R., Soejarto D. D., Stevens P. F., Cragg G. M., Boyd M. R., *J. Nat. Prod.*, **61**, 1252—1256 (1998).
- 32) Reyes-Chilpa R., Estrada-Muñiz E., Ramirez-Apan T., Amekraz B., Aumelas A., Jankowsky C., Vazquez-Torres M., *Life Sci.*, **75**, 1635—1647 (2004).