



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
INSTITUTO DE QUIMICA

**Metabolitos Secundarios de Clusiaceae y Julianaceae con
Actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* y el Virus de
Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ROCIO GOMEZ CANSINO

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Instituto de Química, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dra. María G. Campos Lara
Hospital Infantil de México, Dr. Federico Gómez.
Dra. Clara I. Espitia Pinzón
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

MEXICO, D.F. SEPTIEMBRE DE 2015

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 2-4A del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química y el Laboratorio de Bioseguridad (BSL3) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Ricardo Reyes Chilpa, la Dra. María Guadalupe Campos Lara y la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón.

La presente investigación fue financiada por los proyectos “Compuestos antivirales (VIH-1) de Árboles Tropicales (Clusiaceae) de México: Estudio Químico y Toxicogenómico” PAPIIT-DGAPA-UNAM (IG 2005-13) y el proyecto “Nuevas Alternativas para el Tratamiento de Enfermedades Infecciosas” (NUATEI-IIB-UNAM).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca número 249620 (CVU 363314) otorgada para la realización de los estudios y al Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, por la formación que me brindó.

AGRADECIMIENTOS

- Quiero agradecer al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por todas sus enseñanzas, paciencia, confianza y amistad durante todo este tiempo, por apoyarme siempre y brindarme los recursos necesarios para la realización de este trabajo.
- Mi gratitud y admiración para la Dra. María Guadalupe Campos Lara por su amistad y ayuda durante mi formación académica, gracias por enseñarme que en la investigación siempre es necesario criticar nuestros hallazgos, que la puntualidad y la perseverancia son necesarias para alcanzar nuestras metas.
- A la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón por confiar en mí y permitirme tener libertad en mis actividades, por los recursos brindados y por su amistad.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio 2-4 por apoyarme siempre y hacer más ameno el trabajo, especialmente a ti Laura por tener la paciencia de enseñarme, a Edgar por acompañarme a las salidas de campo y porque al igual que Juan Carlos, Griselda, Yoscelina, Jorge, Nacho y Carlita alegraban mis días... gracias a todos por su amistad.
- A mis padres por su inmenso amor y confianza pero sobre todo porque siempre me enseñaron a trabajar, a luchar por mis sueños y no abandonar mis proyectos sin importar los obstáculos de la vida.
- A ti mamá Salva porque siempre has cuidado de nosotros y porque más que una abuela eres nuestra amiga y el pilar de la familia, sabes que te quiero y que este logro nunca hubiese sido posible sin ti.
- A mi hermana Ethel y Wilver por darme una sobrina como Lila y por cuidar de papá las veces que yo estuve ausente.
- A mis tíos Bernabé y GERALDA por demostrarme siempre su cariño e impulsarme para realizar este Doctorado.
- Finalmente a todos mis amigos: Gaby, Dago, Mari, Ice, Pau, Carlos por acompañarme en momentos de felicidad y tristeza.

A mi Padre, *in memoriam*

Cierro mis ojos para soñar contigo y en
mis sueños embriagarme con tu risa,
luego despierto para contemplarte y
recuerdo que ni siquiera la muerte podrá
evitar que ame tanto.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Tuberculosis	4
2.2 Pruebas <i>in vitro</i> de susceptibilidad micobacteriana	6
2.2.1 Discos de difusión en agar	6
2.2.2 Macro y micro dilución en agar	7
2.2.3 Radiorespirometría	7
2.2.4 Microdilución en medio líquido	7
2.2.4.1 Microdilución en Azul de Alamar (MABA)	7
2.2.4.2 Microdilución en Rezasurina (REMA)	8
2.3 Virus de Inmunodeficiencia Humana	8
2.3.1 Ciclo de replicación del VIH	8
2.3.2 Tratamiento del VIH-SIDA	11
2.3.3 Co- infección TB-VIH	12
2.4 Generalidades de la Familia Julianaceae	14
2.4.1 Genero <i>Amphipterygium</i>	15
2.4.2 Química y actividad biológica	15
2.5 Generalidades de la Familia Clusiaceae	16
2.5.1 <i>Calophyllum brasiliense</i>	16
2.5.2 Química y actividad biológica	17
3 JUSTIFICACIÓN	19
4 HIPÓTESIS	19
5 OBJETIVOS	20
5.1 General	20
5.2 Particulares	20

6	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
6.1	Colecta del material vegetal	22
6.2	Preparación de extractos	23
6.3	Actividad Anti-micobacteriana	23
6.4	Actividad Anti- RT-VIH-1	24
6.5	Determinación de la DL ₅₀	25
6.6	Evaluación de la citotoxicidad en macrófagos de la línea celular THP1	25
6.7	Análisis estadístico	26
6.8	Análisis de los extractos por Cromatografía en capa Fina CCF	26
6.9	Fraccionamiento del extracto de <i>A. simplicifolium</i>	27
6.9.1	Identificación de los compuestos aislados	28
6.9.2	Cuantificación de los extractos de Julianaceae y <i>C. brasiliense</i> por HPLC	30
6.9.2.1	Julianaceae	30
6.9.2.2	<i>C. brasiliense</i>	31
7	RESULTADOS	32
7.1	Actividad biológicas	32
7.1.1	Actividad anti-micobacteriana de extractos de Julianaceae y Clusiaceae	32
7.1.2	Actividad anti RT de extractos de Julianaceae y Clusiaceae	32
7.1.3	CI ₅₀ de extractos de Julianaceae y Clusiaceae	33
7.1.3.1	Actividad sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33
7.1.3.2	Actividad sobre RT de VIH-1	34
7.1.4	Actividad anti-micobacteriana de fracciones de <i>A. simplicifolium</i>	34
7.1.5	Actividad anti-RT de fracciones de <i>A. simplicifolium</i>	35
7.1.6	CI ₅₀ de fracciones de <i>A. simplicifolium</i>	35
7.1.7	Actividad anti-micobacteriana de compuestos aislados	36
7.1.8	Actividad anti-RT de compuestos aislados	36
7.1.9	CI ₅₀ de los compuestos aislados	37
7.1.10	Toxicidad Aguda del extracto de <i>A. simplicifolium</i>	38
7.1.11	Citotoxicidad de extractos de Clusiaceae, Julianaceae y	

fracciones de <i>A. simplicifolium</i>	38
7.1.12 Citotoxicidad de compuestos de <i>A. simplicifolium</i> y <i>C. brasiliense</i>	39
7.1.13 CC ₅₀ de compuestos aislados	41
7.2 Identificación de los compuestos aislados	41
7.2.1 Acido 3β-hidroximasticadienónico	43
7.2.2 Acido masticadienónico	47
7.2.3 Ácido 3α-hidroximasticadienónico	48
7.3 Análisis de extractos de Julianaceae y <i>C. brasiliense</i> por HPLC	48
8 DISCUSIÓN	51
9 CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56
ANEXOS	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo	Inh	Isoniazida
ADN	Acido desoxirribonucleico	IP	Inhibidores de Proteasa
ARN	Ácido Ribonucleico	IR	Espectroscopia de Infrarrojo
ARNm	ARN mensajero	ITR	Inhibidores de Transcriptasa Reversa
AZT	Zidovudina	ITRN	ITR Análogos Nucleosídicos
		ITRNN	ITR Análogos no Nucleosídicos
	B		M
BAAR	Bacilo Acido Alcohol resistente	MABA	Microdilución en Alamar Blue Assay
	C	MDR	Multidrogo Resistente
CC₅₀	Concentración Citotóxica media	MeOH	Metanol
CCF	Cromatografía en Capa Fina		O
CC-FN	Cromatografía en columna Fase Normal	OMS	Organización Mundial de la Salud
CCR5	C-C quimiocina Receptora tipo 5		P
CDC	Center for Disease Control and Prevention	PBS	Suero Fetal Bovino
CH₂Cl₂	Diclorometano		R
CH₃CN	Acetonitrilo	REMA	
CI₅₀	Concentración que inhibe el 50 %	Rif	Rifampicina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria	RMN	Resonancia Magnética Nuclear de
		¹³ C	Carbono
COSY	Correlación Homonuclear ¹ H- ¹ H bidimensional	RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de
			protón
CXCR4	Receptor de Quimiocinas CXC tipo 4	RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
	D		S
DEPT	Acrecentamiento sin distorsión por transferencia de Polarización	SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
DL₅₀	Dosis Letal del 50%	SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
DMSO	Dimetilsulfoxido		T
	E	TB	Tuberculosis
EM	Espectrometría de Masas	TEMA	
Emb	Etambutol	TMS	Tetrametilsilano
	F	TR	Transcriptasa Reversa
FDA	Food and Drug Administration	Tr	Tiempo de retención
	G		U
gp120	Glicoproteína 120	UFC	Unidades Formadoras de Colonia
gp41	Glicoproteína 41	UV	Ultra-Violeta
	H		V
HAART		Vif	Factor de infectividad Viral
Hex	Hexano	VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
HMBC	Correlación Heteronuclear ¹ H- ¹³ C bidimensional a larga distancia	Vpr	Proteína viral R
HPLC		Vpu	Proteína viral única
HSQC	Correlación Homonuclear ¹ H- ¹ H bidimensional		X
	I	XDR	Extremadamente Resistente
IF	Inhibidores de Fusión	Z	Pirazinamida
IIN	Inhibidores de Integrasa		

Unidades y Símbolos

°C	Grados centígrados
Cm	Centímetros
dd	Doble de doble
G	Gramos
H	horas
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamiento
M	Multiplete
m/z	Relación masa carga
MHz	Mega Hertz
Min	Minutos
mM	milimolar
Rpm	Revoluciones por minuto
S	singulete
td	Triple de dobles
Δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
mg	Microgramos
μg/mL	Microgramos por mililitro
μL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Blancos terapéuticos de los fármacos utilizados en tuberculosis, modificado de Zumla <i>et al.</i> , 2014.	6
Figura 2	Ciclo de replicación del VIH.	11
Figura 3	Ilustración de las diferencias morfológicas de un ejemplar A) femenino y B) masculino de <i>Amphipterygium simplicifolium</i> (Julianaceae).	14
Figura 4	Fotografías del árbol <i>Calophyllum brasiliense</i> , A) árbol, B) flores, C) hojas, D) frutos y E) corteza.	17
Figura 5	Estrategia experimental del proyecto.	21
Figura 6	Colecta del material vegetal: A) prensado de ejemplares de herbario, B) <i>Vismia baccifera</i> , C) <i>Amphipterygium simplicifolium</i> , D) <i>Clusia guatemalensis</i> , <i>Clusia lundellii</i> .	22
Figura 7	Cromatografía en capa fina-fase normal de los extractos de hojas de las especies de Julianaceae. (A) revelado bajo luz UV, 254nm; (B) revelado bajo luz UV, 366nm y (C) revelado con vainillina al 5% en etanol. 1) <i>A. amplifolia</i> ♂, 2) <i>A. molle</i> ♀, 3) <i>A. adstringens</i> ♂, 4) <i>A. glaucum</i> ♂, 5) <i>A. simplicifolium</i> . Concentración 50 µg/mL.	26
Figura 8	Cromatografía en capa fina-fase normal de los extractos de hojas de las especies de Julianaceae. (A) revelado bajo luz UV, 254nm; (B) revelado bajo luz UV, 366nm y (c) revelado con vainillina al 5% en etanol. 1) <i>A. amplifolia</i> ♂, 2) <i>A. amplifolia</i> ♀, 3) <i>A. molle</i> ♂, 4) <i>A. simplicifolium</i> , 5) <i>A. adstringens</i> ♂, 6) <i>A. glaucum</i> ♂, 7) <i>A. glaucum</i> ♀. Concentración 50 µg/mL.	27
Figura 9	Diagrama del fraccionamiento por Cromatografía en Columna del extracto y fracciones de <i>A. simplicifolium</i>	29
Figura 10	Citotoxicidad de los compuestos aislados de <i>A. simplicifolium</i> y <i>C. brasiliense</i> , los datos representan la media ($\bar{x} \pm EE$) para una n=5, vehículo DMSO (0.5%v/v); ANOVA, Tukey, p< 0.05.	39

Figura 11	Efecto del ácido 3 β -hidroximasticadienónico y soulatrólido (50 μ g/mL) sobre macrófagos THP1, a) macrófagos sin tratar, b) ac. 3 β -hidroximasticadienónico y c) soulatrólido.	40
Figura 12	Citotoxicidad de los compuestos aislados de <i>A. simplicifolium</i> y <i>C. brasiliense</i> los datos representan la media ($\bar{x} \pm EE$) para una n=5, vehículo DMSO (0.5%v/v); ANOVA, Tukey, p< 0.05.	40
Figura 13	Compuestos aislados de <i>A. simplicifolium</i> y <i>C. brasiliense</i> : ácido oleanólico (1), ácido masticadienónico (2), ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3), ácido 3 β -hidroximasticadienónico, ácido apetalico (5), calanólido B (6) y Soulatrólido (7).	42
Figura 14	Espectro de ¹³ C RMN (experimento DEPT) del ácido 3 β -hidroximasticadienónico.	43
Figura 15	Espectro de ¹ HRMN del ácido 3 β -hidroximasticadienónico.	44
Figura 16	Espectro de infrarrojo (IR, KBr/pastilla) del ácido 3 β OH-masticadienónico.	45
Figura 17	Estructura de rayos X del ácido masticadienónico (Jain <i>et al.</i> , 1995).	47
Figura 18	Estructura de rayos X del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (Jain <i>et al.</i> , 1995).	48
Figura 19	Cromatogramas de HPLC de los extractos de Julianaceae.	49
Figura 20	Perfil cromatográfico del extracto de <i>C. brasiliense</i> .	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la Tuberculosis.	5
Tabla 2	Medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento del VIH (FDA, 2014).	13
Tabla 3	Actividad anti-micobacteriana y anti-RT de los extractos de Julianaceae y Clusiaceae (50 µg/mL).	33
Tabla 4	CI ₅₀ (µg/mL) de la actividad anti-micobacteriana y anti-RT del VIH-1 de los extractos de Julianaceae y Clusiaceae.	34
Tabla 5	Actividad anti-micobacteriana y anti-RT de las fracciones de <i>A. simplicifolium</i> .	35
Tabla 6	CI ₅₀ de las fracciones del extracto de <i>A. simplicifolium</i> sobre la <i>M.tuberculosis</i> y la TR del VIH-1.	36
Tabla 7	Actividad anti-micobacteriana y anti-RT de los compuestos (50µg/mL) de <i>A. simplicifolium</i> y <i>C. brasiliense</i> .	37
Tabla 8	CI ₅₀ de los compuestos aislados de <i>A. simplicifolium</i> y <i>C. brasiliense</i> .	37
Tabla 9	Citotoxicidad a macrófagos THP1 de extractos de Julianaceae y Clusiaceae.	38
Tabla 10	CC ₅₀ de los compuestos aislados de <i>A. simplicifolium</i> y <i>C. brasiliense</i> .	41
Tabla 11	Datos del RMN ¹ H y ¹³ C del ácido Instipolinácico, δ en ppm, J en Hz	46
Tabla 12	Cuantificación de compuestos en las especies de Julianaceae.	50

RESUMEN

La re-emergencia de la tuberculosis relacionada con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) resalta la necesidad de disponer de medicamentos con menores efectos adversos, activos a cepas farmaco-resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, así como al VIH. Por este motivo, en esta tesis se probaron *in vitro* extractos de 14 especies de Julianaceae y 5 de Clusiaceae de México (50 µg/mL) contra *M. tuberculosis* H37Rv y la Transcriptasa Reversa del VIH (RT-VIH). Los extractos de corteza y hojas de Julianaceae inhibieron a *M. tuberculosis* (> 84.67%) y la RT-VIH (< 49.89%). Los extractos de hojas de Clusiaceae también inhibieron ambos blancos (> 58.3% y > 67.6%), respectivamente. Se determinaron los valores de CI₅₀ para seis extractos seleccionados y su citotoxicidad (50 µg/mL) a macrófagos THP1. *Amphipterygium glaucum*, *A. molle*, y *A. simplicifolium* inhibieron de manera potente *M. tuberculosis* con IC₅₀ de 1.87 a 2.35 µg/mL; pero su IC₅₀ contra la RT-VIH fue 59.25 a 97.83 µg/mL. *Calophyllum brasiliense*, *Vismia baccifera*, y *Vismia mexicana* tuvieron un efecto sobresaliente sobre *M. tuberculosis* y también inhibieron la RT-VIH. Los 6 extractos (50 µg/mL) presentaron baja toxicidad a macrófagos (< 23.8%). Los perfiles de HPLC de *A. glaucum*, *A. molle* y *A. simplicifolium* indican que su actividad antimicobacteriana no está relacionada con los ácidos masticadienónico, 3-alfa ó 3-beta- hidroximasticadienónico, sugiriendo que otros compuestos son responsables de la actividad observada o actúan sinérgicamente. La actividad antimicobacteriana y anti-RT-HIV inducidas por *C. brasiliense* se pueden atribuir a los calanólidos A, B, así como al soulatrólido.

ABSTRACT

The re-emergency of tuberculosis related with human immunodeficiency virus (HIV) highlight the need for drugs with less adverse effects, active against *Mycobacterium tuberculosis* drug resistant strains, and HIV. Therefore, in this thesis the extracts of 14 Julianaceae and 5 Clusiaceae species from Mexico were tested *in vitro* (50 µg/mL) against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and HIV reverse transcriptase (HIV-RT). The Julianaceae bark and leaf extracts inhibited *M. tuberculosis* (>84.67%) and HIV-RT (< 49.89%). The Clusiaceae leaves extracts also inhibited both targets (>58.3% and >67.6%), respectively. The IC₅₀ values for six selected extracts and their cytotoxicity (50 µg/mL) to human macrophages were then determined. *Amphipterygium glaucum*, *A. molle*, and *A. simplicifolium* fairly inhibited *M. tuberculosis* with IC₅₀ of 1.87–2.35 µg/mL; but their IC₅₀ against HIV- RT was 59.25–97.83 µg/mL. *Calophyllum brasiliense*, *Vismia baccifera*, and *Vismia mexicana* effect on *M. tuberculosis* was noteworthy (IC₅₀ 3.02–3.64 µg/mL) and also inhibited HIV-RT (IC₅₀ 26.24–35.17 µg/mL). These 6 extracts (50 µg/mL) presented low toxicity to macrophages (<23.8%). The HPLC profiles of *A. glaucum*, *A. molle*, and *A. simplicifolium* indicated that their antimycobacterial activity cannot be related to masticadienonic, 3-alpha- or 3-beta-hydroximasticadienonic acids, suggesting that other compounds may be responsible for the observed activity or synergy. The anti-HIV-RT and antimycobacterial activities induced by *C. brasiliense* can be attributed to calanolides A, B, as well as soulatrolide. Our results validate the popular use of Julianaceae species in the treatment of tuberculosis. *C. brasiliense* hexane extract and soulatrolide possess dual activity against *M. tuberculosis* and HIV- RT.

1 INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es la infección oportunista y transmisible de mayor importancia a nivel global (Tomioka, 2008, 2014). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, el agente etiológico de la TB. En 2012 se reportaron 8.6 millones de nuevos casos de TB y 1.3 millones de defunciones (incluyendo 320 000 muertes entre las personas VIH positivas). En México, de acuerdo con la evaluación externa del programa de control de Tuberculosis de la secretaria de salud, durante el 2012 se diagnosticaron 19 697 casos nuevos de TB de los cuales el 5.9 % está asociado al VIH.

El Centro para el Control de Enfermedades CDC de Atlanta, atribuye una tercera parte del incremento en los casos de TB a la propagación del Virus de Inmunodeficiencia Humana agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH/SIDA). En este contexto el VIH constituye uno de los desafíos más importantes de salud pública. A finales de 2009 se estimó que a nivel mundial 33.4 millones de personas vivían con el VIH. En América latina el número de infecciones alcanzó la cifra de 1.7 millones; las estadísticas ubican a México como el segundo país con aproximadamente 180 000 personas infectadas con VIH, solo por debajo de Brasil (García Zebadua, 2012; CENSIDA, 2014).

Actualmente existen 36 medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de América (FDA) y respaldados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el tratamiento del VIH/SIDA (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b; Hupfeld and Efferth, 2009; Pirrone *et al.*, 2011; DFA, 2015), así como 11 fármacos para el tratamiento de la tuberculosis. Sin embargo, cuando existe co-infección VIH-tuberculosis, los beneficios de estos recursos quimioterapéuticos se ven limitados por riesgos, tales como trastornos metabólicos y reacciones farmacológicas cruzadas, selección de cepas resistentes, toxicidad en el sistema cardiovascular, hígado, riñón, cerebro, páncreas y piel (Guaraldi *et al.*, 2003; Deffur *et al.*, 2013).

En la búsqueda de nuevos fármacos, los productos naturales han proporcionado sustancias químicas potencialmente útiles en el tratamiento de distintas enfermedades. A la fecha se han identificado aproximadamente 120 productos naturales anti VIH (Ng *et al.*,

1997; Vlietinck *et al.*, 1998; Matthee *et al.*, 1999) y 278 anti-micobacterianos (Garcia *et al.*, 2012). Estos compuestos se han extraído principalmente de plantas, pero también de bacterias, hongos, invertebrados terrestres y marinos. De estos compuestos solo el ácido betulínico y el (+)-calanólido A poseen actividad dual (TB/VIH) (Tomioka, 2008; Garcia *et al.*, 2012).

El (+)-calanólido A es una dipiranocumarina tetracíclica extraída de las hojas del árbol tropical *Calophyllum lanigerum* (Clusiaceae), capaz de inhibir la transcriptasa reversa del VIH-1 (RT-VIH-1); actualmente se encuentra en fase II/III de evaluación clínica con pacientes de VIH-1+ (Kashman *et al.*, 1992; Butler, 2008). Recientemente se describió que el (+)-calanólido A también es capaz de inhibir la replicación intracelular *in vitro* de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, así como de otras cepas resistentes a rifampicina, isoniazida, estreptomycin y etambutol; esta propiedad se debe a su capacidad de inhibir la síntesis de ARN, ADN y lípidos micobacterianos (Xu *et al.*, 2004).

En México se conoce el uso etnomédico de algunas especies vegetales en el tratamiento de la tuberculosis, entre ellas se encuentra *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) (INI, 1994), conocida popularmente como Cuachalalate y con amplia distribución en el país (Cuevas Figueroa, 2005). El extracto de diclorometano-metanol (1:1) de la corteza de *A. adstringens* inhibió *in vitro* el crecimiento de la cepa referencia *M. tuberculosis* H37Rv (Rivero-Cruz *et al.*, 2005). Posteriormente se demostró que este extracto, además puede inhibir otras 4 cepas del complejo *M. tuberculosis* y se identificó el ácido masticadienónico de dicho extracto, el cual podría ser uno de sus principios activos (Gómez-Cansino, 2009).

La aparición de nuevos casos de tuberculosis, el incremento en la incidencia de cepas multirresistentes a fármacos, los efectos adversos de los fármacos de primera y segunda línea y el incremento de la tuberculosis asociada con las infecciones por VIH (co-infección TB/VIH), hacen necesario la búsqueda de nuevos compuestos que asociados a las nuevas técnicas de evaluación anti-micobacteriana puedan ser seleccionados como moléculas prototipo de nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades (Chung *et al.*, 1995; Orme and Program., 2001; Orme *et al.*, 2001). Los productos naturales también pueden ser la base para la elaboración de fitomedicamentos, esto es extractos

estandarizados química y farmacológicamente de menor costo que pudiesen ser distribuidos por el sistema de salud público.

Un estudio bioprospectivo de los extractos orgánicos de las hojas de las 21 especies de Clusiaceae de México indicó que cinco de estas poseen una alta actividad inhibitoria de la RT-VIH-1 (>70%); la mayor actividad la presentó *Calophyllum brasiliense*, identificando como sus principios activos los calanólidos A, B, C y soulatrólido (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a; Huerta-Reyes *et al.*, 2004b). Sin embargo, no se han identificado aún los compuestos activos de las otras cuatro especies. Por otro lado, de las cinco especies (*Amphipterygium adstringens*, *A. glaucum*, *A. molle*, *A. simplicifolium* y *A. amplifolia*) de la familia Julianaceae presente en México (Cuevas Figueroa, 2005), solo se tienen estudios fitoquímicos reportados en la literatura para *A. adstringens* y se desconoce si las especies restantes presentan actividad sobre *M. tuberculosis* y la RT del VIH-1.

Con la finalidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento contra TB y VIH, en el presente trabajo se planteó identificar compuestos con actividad para ambas patologías, a partir de las especies de las familias Clusiaceae y Julianaceae distribuidas en México, los cuales pudieran dar origen al desarrollo de fármacos y fitomedicamentos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa con tasas de morbilidad y mortalidad importantes. En 1993 fue declarada una emergencia sanitaria por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y en 2014 se consideró la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas en el mundo después del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (WHO, 2014). Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) el agente etiológico de la TB (Tomioka, 2008), *M. tuberculosis*, es una bacteria aeróbica estricta que como todas las micobacterias se distingue por sus lípidos de superficie que lo hacen resistente a la decoloración por el ácido-alcohol de ciertas tinciones, razón por la que se lo conoce también como bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) (OPS, 2010). En el 2013 se reportaron 9 millones de nuevos casos y 1.5 millones de muertes de las cuales 0.4 millones estuvieron relacionadas con pacientes VIH positivos, los cuales tienen de 50 a 100 veces más probabilidad de desarrollar la TB activa (Jiménez Arellanes *et al.*, 2010).

A la fecha se han aprobado por la FDA 11 fármacos para el tratamiento de la TB (Tabla 1), el tratamiento actual de la tuberculosis se basa en una multiterapia que emplea 4 fármacos de primera línea: isoniazida (Inh), Rifampicina (Rif), etambutol (Emb) y pirazinamida (Z). El costo anual del tratamiento por paciente con tuberculosis con estos fármacos es de 100 a 500 dólares/año. Sin embargo, el uso inadecuado de los fármacos como la rifampicina e isoniazida, el bajo apego al régimen de quimioprofilaxis, han dado lugar a la selección de cepas multidrogorresistentes (MDR). Ante esta situación el tratamiento se realiza con fármacos de segunda línea como capreomicina, kanamicina, amikacina y fluoroquinolonas; pero, tienen como desventaja ser poco específicos, con severos efectos adversos y con los que más fácilmente se observa resistencia, los tratamientos se prolongan por más tiempo (24 meses) y el costo promedio por paciente es de 9 535 a 48 533 dólares (Su, 2008; Zager and McNerney, 2008; WHO, 2014).

Tabla 1. Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la Tuberculosis

Fármacos de Primera Línea	Fármacos de Segunda Línea
Isoniazida	Cycloserina
Rifampicina	Etionamida
Rifapentina	Levofloxacino*
Rifabutina*	Moxifloxacino*
Ethambutol	Gatifloxacino*
Pirazinamida	Acido <i>p</i> -aminosalicilico
	Estreptomicina
	Capreomicina
	Amikacina/Kanamicina*

*Fármacos no aprobados por la FDA en el tratamiento de la Tuberculosis, pero respaldados por la OMS.

Otro factor de importancia en el incremento de la incidencia de TB se debe a la aparición de cepas extremadamente resistentes (XDR). Para estos últimos casos no existe alternativa de tratamiento y responden precariamente ante fármacos de primera y segunda línea, en consecuencia se ha determinado que estas cepas son resistentes a Rif e Inh, a uno o hasta tres fármacos inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina) y a una fluoroquinolona. Los casos de multiresistencia se han identificado en varios países incluyendo México y tienen un limitado índice de curación y altos índices de mortalidad (Jiménez Arellanes *et al.*, 2010). El desarrollo de fármacos anti TB durante las últimas cuatro décadas fue escaso. En 2012 la FDA aprobó el uso de rifamicinas de corto espectro y la bedaquilina (Zumla, Schito, *et al.*, 2014). En la búsqueda de nuevos fármacos se ha observado que los productos naturales y algunos de sus derivados exhiben notable actividad inhibitoria del crecimiento de *M. tuberculosis*, por lo que algunos de ellos han sido seleccionados como moléculas prototipo para el desarrollo de nuevos agentes antituberculosos (Figura 1). Cabe señalar que hasta el 2012 se había reportado el uso de al menos 8 compuestos en fase clínica II y 3 en fase clínica III (Engohang-Ndong, 2012; Zumla, Gillespie, *et al.*, 2014).

2.2.2 Macro y Microdilución en agar

Este método evalúa cuantitativamente la actividad anti-micobacteriana y determina mediante el uso de concentraciones conocidas la concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos o compuestos en agar (Negi *et al.*, 2010). El recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) es utilizado para calcular la CMI de cada extracto o compuesto en un lapso de 3 4 semanas.

2.2.3 Radiorespirometría

El crecimiento de micobacterias es determinado en el instrumento Bactec 460; este sistema detecta la relación de CO₂ radiactivo generado por la actividad metabólica de MTB en un medio selectivo adicionado con ¹⁴C-palmitato. Este método es costoso y utilizado para evaluar la susceptibilidad de fármacos en aislados clínicos (Franzblau *et al.*, 1998) que proporciona resultados rápidos (5 días) en comparación con los métodos convencionales (Newton *et al.*, 2000; Negi *et al.*, 2010).

2.2.4 Microdilución en medio líquido

Son pruebas colorimétricas que se basan en una reacción óxido-reducción de un colorante que puede ser Alamar Blue (MABA), rezasurina (REMA) o MTT (TEMA). Estos ensayos son adecuados para evaluar la sensibilidad a los medicamentos utilizando placas de 96 pozos. Los resultados se obtienen en promedio de 7 a 10 días con el uso un espectrofotómetro o fluorómetro (Palomino *et al.*, 2002; Gómez-Flores *et al.*, 2008; Negi *et al.*, 2010).

2.2.4.1 Microdilución en Azul de Alamar (MABA).

Es un método económico desarrollado por Collins y Franzblau en 1997, se utiliza frecuentemente para evaluar la actividad anti-micobacteriana de los extractos de plantas y compuestos. Se ha demostrado su eficacia con MTB H37Rv, H37Ra y *M. avium* cepa ATCC 25291, pero también es una técnica fiable con aislados clínicos de MTB. Este método funciona de modo colorimétrico simple con lectura visual (el cambio de azul a rosa indica la viabilidad), lectura en espectrofotómetro realizada a 570 y 600 nm (Collins and

Franzblau, 1997; Franzblau *et al.*, 1998) o lectura de alta sensibilidad con fluorómetro a través de la excitación a 530 y emisión a 590 nm. La CMI se calcula como la concentración más baja de un compuesto que reduce la absorbancia o transmitancia $\geq 90\%$ en comparación con los cultivos no tratados (Collins and Franzblau, 1997).

2.2.4.2 Microdilución en Rezasurina (REMA).

Para este ensayo se prepara una solución de rezasurina que se utilizada de la misma manera que el azul de alamar. Este método es sencillo y económico para la detección de resistencia a fármacos. El twenn 80 un agente tensoactivo es utilizado para mejorar la difusión de la rezasurina, la actividad anti-micobacteriana es interpretada mediante lecturas de absorbancia o fluorescencia (O'Brien *et al.*, 2000; Palomino *et al.*, 2002).

2.3 Virus de Inmunodeficiencia Humana

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), aislado por primera vez en 1983, es el agente causal del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), que representa la expresión clínica final de la infección. La característica más importante es la destrucción del sistema inmune, pero el VIH también origina una serie de manifestaciones neurológicas y tumorales. Esto es debido al doble tropismo del VIH; por un lado, como todos los lentivirus infecta las células de la estirpe macrofágica y por otro, presenta un tropismo especial por los linfocitos CD4. Se conocen 2 tipos de virus: VIH-1 y VIH-2, siendo VIH-1 el más predominante en el mundo mientras que el VIH-2 se presenta comúnmente en el África occidental, ambos causan SIDA y se transmiten de la misma manera (OPS, 2010).

2.3.1 Ciclo de replicación del VIH.

El ciclo biológico del VIH tiene una fase temprana, que culmina con la integración del ADN proviral en el genoma de la célula y una fase tardía, que implica la transcripción del genoma viral y la generación de una progenie infecciosa (Weiss, 2001).

El ciclo replicativo del VIH se divide en siete siguientes etapas (Figura 2): en las dos primeras ocurre el acoplamiento y fusión del virus con la célula huésped en donde el virus se une al receptor CD4 a través de la gp120, produciendo un cambio conformacional que permite la interacción con un correceptor (perteneciente a la familia de receptores de

quimiocinas). Esta interacción provoca un cambio en la gp41 que induce la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. El proceso de unión del virus a la membrana celular y entrada al citoplasma se conoce como “internalización” (Berger *et al.*, 1999; Doms, 2000).

En la etapa tres se lleva a cabo la Transcripción inversa o retrotranscripción, en donde se genera una copia de DNA lineal a partir del genoma de RNA vírico. La transcriptasa reversa cataliza la formación de la primera cadena de ADN, a partir del ARN viral. En la síntesis de la segunda cadena interviene la ribonucleasa H, generando un ADN de doble cadena. La alta tasa de error en la replicación ha proporcionado al virus la capacidad intrínseca de alterar el tropismo celular, de eludir el sistema inmune, desarrollar rápidamente resistencias a la terapia antiviral, así como de generar diversas cepas de VIH-1 (cuasiespecies) que han impedido hasta el momento el desarrollo de una vacuna eficaz (Hulme *et al.*, 2011; Waheed and Freed, 2012).

La fase cuatro incluye el transporte del DNA viral al núcleo y la integración, una vez sintetizado el ADN proviral este se acopla a distintos factores celulares y virales formando el “complejo de preintegración”. Este complejo se desplaza al núcleo para integrarse al azar en el genoma de la célula huésped, con la ayuda de la integrasa. A diferencia de otros retrovirus el VIH puede entrar al núcleo de células que no están en división como los macrófagos, lo que indica la presencia de un mecanismo para la localización y transferencia del genoma viral. Las dos proteínas virales importantes para el transporte de la membrana nuclear son la MA fosforilada y Vpr (Dismuke and Aiken, 2006).

El VIH puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o sufrir una replicación masiva que resulta en un efecto citopático para la célula infectada. En la mayoría de los linfocitos el virus está en forma latente. El paso de la fase de latencia a la de reactivación depende de factores celulares, como la proteína NF-kB que sólo es inducido en procesos de activación inmunológica. Tras dicha activación, el fenómeno de reactivación del estado de latencia es rápido y agresivo (Nisole and Saib, 2004).

La síntesis de proteínas virales comprende la quinta etapa y en esta el provirus mimetiza un gen. Al tratarse de un retrovirus complejo, en su regulación se implican tanto proteínas celulares, como proteínas reguladoras codificadas por el virus. Existe una expresión genética temprana (transcripción de los genes reguladores *tat*, *rev* *nef*) y una tardía (transcripción de los genes estructurales y enzimáticos codificados por *gag*, *pol* y *env*; así como los accesorios *vif*, *vpr* y *vpu*). Dos proteínas virales son esenciales en la síntesis y el procesamiento del ARN viral. *Tat*, activador potente de la transcripción, que permite la síntesis de la totalidad del ARN viral y *Rev*, regulador de la expresión del virión, que codifica una proteína que facilita el transporte de los ARNm del núcleo al retículo endoplasmático, donde son traducidos en proteínas por los ribosomas celulares. El ARNm del VIH se sintetiza como un único transcrito, que se transporta al citoplasma, donde es procesado en ARN de distintos tamaños (Nisole y Saib, 2004).

Una vez sintetizadas las proteínas virales, deben ser procesadas de forma postraduccional antes de ensamblarse en partículas virales maduras. En este proceso que comprende las etapas seis y siete participan las proteínas virales *Vif*, *Vpu*, una proteasa celular que participa en el procesamiento de la *gp160* en *gp41* y *gp120* y la proteasa viral, que procesa la poliproteína precursora *gag-pol* (que produce proteínas del virus, como la proteína de la matriz, de la cápside, etc). El procesamiento por la proteasa viral es esencial en la maduración del VIH, por lo que supone una diana importante en el desarrollo de fármacos (Adamson *et al.*, 2009).

Finalmente, una vez que han madurado los viriones y se han ensamblado correctamente las proteínas virales, el nucleoide se desplaza a la membrana celular donde se recubre de la membrana lipídica y de glucoproteínas de superficie adheridas a ella y es liberado por gemación, ahora los nuevos viriones son competentes para iniciar un nuevo ciclo de infección.

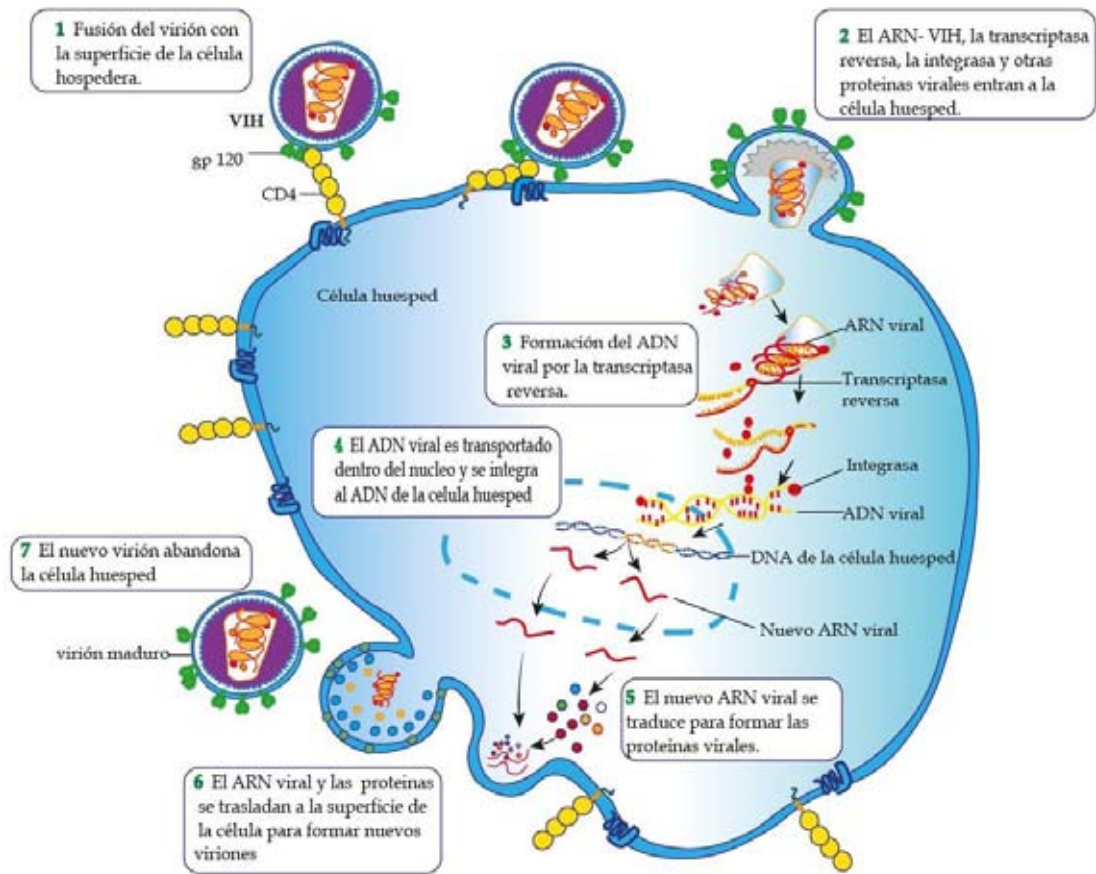


Figura 2. Ciclo de replicación del VIH, modificado de National Institute of allergy and infectious Diseases, NIAID.

2.3.2 Tratamiento del VIH-SIDA

Los fármacos antirretrovirales se clasifican en 4 grupos (Tabla 2) de acuerdo a su mecanismo de acción: I) inhibidor de la transcriptasa reversa (ITR), II) inhibidores de proteasa (IP), III) inhibidor de integrasa (IIN) e IV) inhibidores de fusión (IF). Los ITR se subdividen en dos grupos: los de tipo nucleósido (ITRN) que actúan sobre el sitio activo de la enzima y los no nucleósidos (ITRNN) que inhiben por la interacción con un sitio de unión alostérico; los IP se unen al sitio activo de la proteasa para evitar el procesamiento de

las proteínas virales a enzimas funcionales, mientras que los IIN evitan la integración del ADN viral en el material genético de la célula huésped; finalmente los fármacos IF actúan inactivando el virus o bloqueando la entrada y unión mediante la interacción directa con las proteínas virales (gp120 y gp41) o con los correceptores de la superficie celular (CD4, CXCR4 o CCR5) (Pirrone *et al.*, 2011).

Se han utilizado diferentes terapias para tratar el VIH, el desarrollo de la fármaco resistencia atribuido a la actividad enzimática de la RT, trajo consigo el reemplazo de la monoterapia con zidovudina (AZT) por el tratamiento combinado, mejor conocido como terapia antirretroviral altamente efectiva (HAART, por sus siglas en ingles). Esta terapia involucra el uso de tres o más medicamentos de por lo menos dos grupos distintos de antirretrovirales, mientras que la terapia HAART ha disminuido morbilidad y mortalidad asociadas con la infección por VIH-1, el inicio del tratamiento en pacientes con una cuenta elevada de linfocitos CD4 aún es desconocido (Grinsztejn *et al.*, 2014).

2.3.3 Co-infección TB-VIH.

La TB causa la muerte de una de cada tres personas con SIDA en el mundo. Una tercera parte del incremento en los casos de tuberculosis a nivel mundial se atribuye a la propagación del VIH. La co-infección TB/VIH, manifestada como infección tuberculosa latente o como enfermedad tuberculosa activa, es un problema significativo de salud pública a nivel mundial. El impacto de la co-infección TB/VIH es bidireccional, la tuberculosis al aumentar la carga viral, acelera la progresión de la infección por VIH a SIDA y con ello la muerte. Mientras que la infección por VIH, al conducir a la declinación de linfocitos CD4 (que son de crucial importancia en iniciar y mantener la respuesta inmune) afecta la manifestación clínica y evolución de la TB, favoreciendo de esta manera el desarrollo de TB extrapulmonar así como el incremento de la transmisión de la bacteria (Deffur *et al.*, 2013).

Para un tratamiento farmacológico adecuado en la co-infección es necesario tomar en cuenta las interacciones potenciales entre medicamentos que pueden causar ineffectividad de los fármacos antirretrovirales e incremento del riesgo de toxicidad. Por ejemplo: la rifampicina induce la actividad del citocromo P450, un sistema enzimático hepático que

metaboliza los Inhibidores de Proteasa (IP) disminuyendo sus niveles séricos significativamente y comprometiendo la terapia antirretroviral efectiva. Los Inhibidores No Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INNTR) son metabolizados en menor grado. Tanto los IP como los INNTR pueden también afectar este mismo sistema enzimático y aumentar los niveles de rifampicina incrementando el riesgo de hepatotoxicidad. La isoniazida y los Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INTR) estavudina (d4T) y didanosina (ddI), pueden causar neuropatía periférica. Existe entonces el potencial de toxicidad concomitante si se añade isoniazida a un régimen anti-retroviral con cualquiera de esos INTR. Es por ello, que es importante dada la prioridad que tiene el tratamiento antituberculoso y el de cualquier infección oportunista diferir la terapia antirretroviral o escoger cuidadosamente el momento para el tratamiento simultáneo de la tuberculosis y el VIH (Schwander *et al.*, 1995; Pozniak *et al.*, 1999; Driver *et al.*, 2001; Pirrone *et al.*, 2011).

Tabla 2. Medicamentos aprobados para el tratamiento del VIH, (FDA, 2014).

ITRTN	IP	IIN	IF	Combinación de dos o más anti-retrovirales
Zidovudina	Amprenavir	Dolutegravir	Infuvirtida	Abacavir/lamivudina
Didanosina	Indinavir	Elvitegravir	Maraviroc	Abacavir/dolutegravir/lamivudina
Zalcitabina	Nelfinavir	Raltegravir		Atazanavir/covisistad
Estavudina	Atazanavir			Efavirenz/emtricitabina/tenofovir
Lamivudina	Saquinavir			Elvitegravir/cobisistad/emtricitabina/tenofovir
Abacavir	Duranavir			Emtricitabina/rilpivirina/tenofovir
Emtricitabina	Fosamprenavir			Emtricitabina/tenofovir
ITRNN	Tipranavir			Lamivudina/Zidovudina
Nevirapina	Lopinavir			Lopinavir/ritonavir
Delavirdina				
Efavirenz				
Etravirina				
Tenofovir				
Rilpivirina				

2.4 Generalidades de la familia Julianaceae.

Julianaceae es una familia de árboles pequeños o arbustos dioicos, con ramas resinosas y hojas caducas agrupadas en el extremo de las ramas, presenta hojas simples o compuestas, imparipinadas con margen dentado, crenado o acerrado. La inflorescencia masculina en panícula con flores apétalas y actinomorfas mientras que la inflorescencia femenina habitualmente en grupos de cuatro en un receptáculo (Figura 3). Los frutos son pendulares en racimo, nuez indehiscente y pedicelo comprimido en un ala. Esta familia comprende dos géneros: *Orthopterygium* presente en Perú y *Amphipterygium* que se distribuye en México y América Central (Cuevas-Figueroa, 2005).

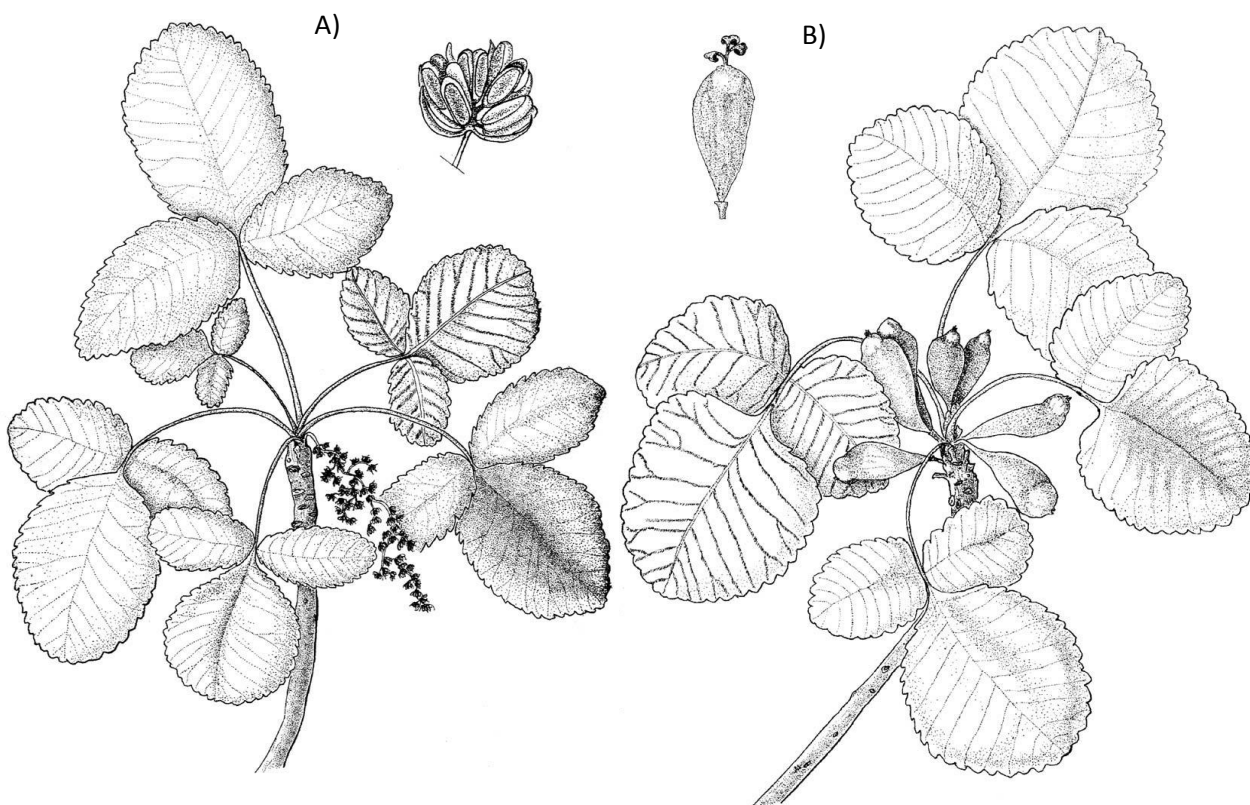


Figura 3. Ilustración de las diferencias morfológicas de un ejemplar A) femenino y B) masculino de *Amphipterygium simplicifolium* (Julianaceae). Dibujos cortesía de la Dra. Xochitl Cuevas.

2.4.1 Genero *Amphipterygium*.

El género *Amphipterygium* se distribuye en nuestro país desde la vertiente del Pacífico hasta Costa Rica. En 1923 el botánico Paul C. Standley propone que cuatro especies integran el género: *A. glaucum*, *A. amplifolia*, *A. molle* y *A. adstringens*. De esta última Standley describe una nueva subespecie en el estado de Oaxaca (*A. adstringens* ssp. *simplicifolium*) que más tarde ascendería a especie como *A. simplicifolium* (Cuevas-Figueroa, 2005).

La mayoría de estas especies son conocidas como “cuachalalate”, que es la hispanización del náhuatl (cuachalalatl) que significa árbol de las chachalacas, pero también se conocen como “cuachalalá, cuachinalá, matixerán, papueco y palo santo”. La corteza de todas las especies del género se utiliza desde épocas prehispánicas en la medicina tradicional para curar afecciones estomacales, malaria, padecimientos del pulmón como la tisis y otras afecciones respiratorias, así como afecciones de la piel y padecimientos de la mujer (Hernández *et al.*, 1946; INI, 1994).

2.4.2 Química y actividad biológica

De la corteza de *A. adstringens* se han aislado, triterpénos, como el ácido anacárdico, aldehídos y fenoles de cadena larga que poseen actividad anti-inflamatoria, hipocolesterolemica, anti-ulcerosa y anti-tuberculosa (Mata *et al.*, 1991; Olivera-Ortega *et al.*, 1999; Arrieta *et al.*, 2003; Makino *et al.*, 2004; Oviedo-Chavez *et al.*, 2004; Navarrete *et al.*, 2005; Rivero-Cruz *et al.*, 2005; Acevedo *et al.*, 2006; Rosas-Acevedo *et al.*, 2011; Castillo-Juarez *et al.*, 2013).

El efecto gastroprotector de los triterpenos de esta planta se ha demostrado en modelos animales, siendo los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, 3-epioleanólico y el β -sitosterol responsables de esta actividad (Arrieta *et al.*, 2003; Navarrete *et al.*, 2005; Castillo-Juarez *et al.*, 2007), mientras que los ácidos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico poseen actividad anti-inflamatoria y citotóxica sobre células de leucemia (Itokawa *et al.*, 1987; Makino *et al.*, 2004; Chavez *et al.*, 2005). Por otra parte se han atribuido a los ácidos anacárdicos diferentes actividades fisiológicas como: la inhibición de enzimas de importancia médica y antitumoral, efecto anti-microbiano, anti-

acne, moluscicida y actividad anti-alimentaria (Mata *et al.*, 1991; Chavez *et al.*, 2005; Acevedo *et al.*, 2006; Castillo-Juarez *et al.*, 2007; Castillo-Juarez *et al.*, 2013), los ácidos 6-nonadecil salicílico, 6-metil nonadecil salicílico son responsables de la actividad antitumoral y no ocasionan daño genotóxico (Itokawa *et al.*, 1987; Acevedo *et al.*, 2006; Rosas-Acevedo *et al.*, 2011). Ensayos con el extracto total de la planta mostraron inhibición del 95 % del crecimiento de *M. tuberculosis* cepa H37Rv, mientras que dos compuestos: (14b, 24E) 3-oxolanosta-7,24-dien-26-oico y (14b, 24E) 3-hidroxilanosta-7,24-dien-26-oico presentaron una CMI de 32 y 64 µg/mL respectivamente (Rivero-Cruz *et al.*, 2005).

2.5 Generalidades de la Familia Clusiaceae.

Clusiaceae (Guttiferae) es una familia de árboles o arbustos, raras veces hierbas, con jugos resinosos o glándulas oleosas, de distribución pantropical, presenta hojas opuestas o verticiladas, simples y engrosadas, de márgenes enteros, que por lo general se conservan siempre verdes. Sus flores son actinomorfas, perfectas o imperfectas en plantas separadas, solitarias o en inflorescencias cimosas; mientras que sus frutos son drupas o bayas (Rodríguez *et al.*, 2009). En México la familia Clusiaceae estaba integrada por 8 géneros y 21 especies (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a) de los cuales los géneros *Clusia*, *Vismia* y *Calophyllum* son los más importantes (García-Zebadúa *et al.*, 2014). Recientemente *Vismia* fue segregada de Clusiaceae e integrada a Hypericaceae, mientras que *Calophyllum* fue reconocida como familia Calophyllaceae (Group., 2009).

2.5.1 *Calophyllum brasiliense*.

Calophyllum brasiliense Cambess (Figura 4) es un árbol tropical caducifolio que mide 20-30 metros, es dioico y es el único representante de su género en México (CONABIO, 2014). Etimológicamente, *Calophyllum* significa “hoja bonita” y *brasiliense* “de Brasil”, por el origen geográfico del primer ejemplar descrito (García-Zebadúa *et al.*, 2014). Este árbol se conoce comúnmente como “Barí, Santa María, o Guaya” en los estados de Chiapas y Tabasco, “Palo María” en Nayarit o “Guanadi” en Brasil (CONABIO, 2014) y se utiliza en la medicina tradicional para tratar enfermedades como: bronquitis, problemas hepáticos o gástricos, dolor, inflamación, úlceras crónicas, hipertensión, reumatismo, herpes, diabetes y lombrices o diarrea (García-Zebadúa *et al.*, 2014).

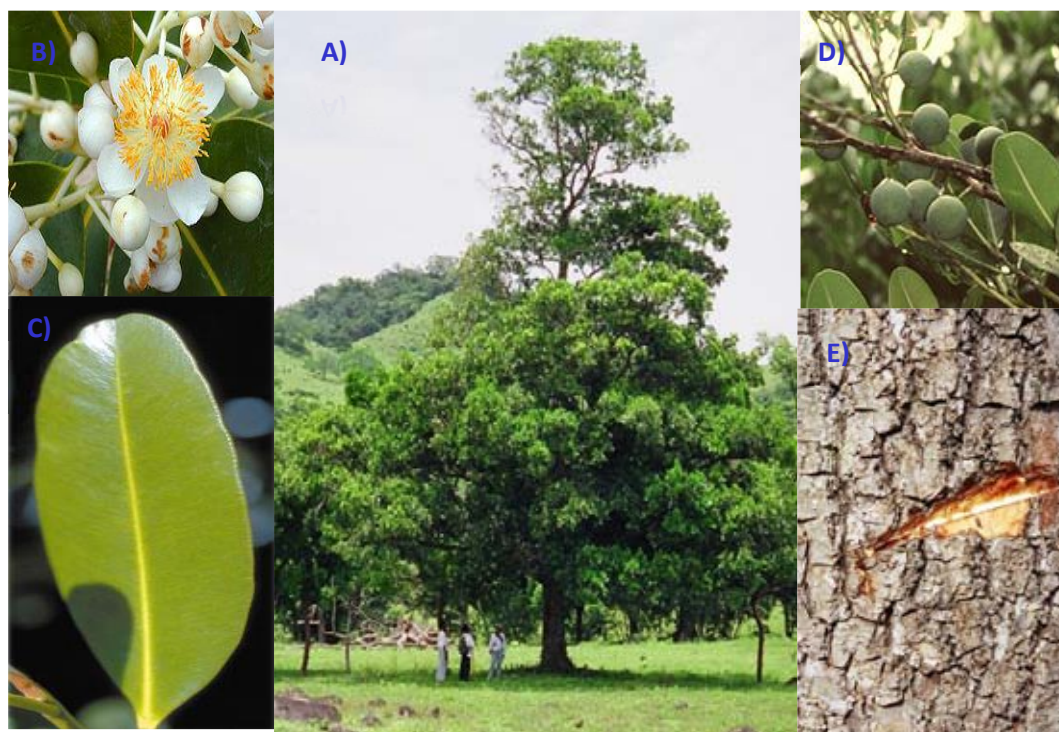


Figura 4. Fotografías del árbol *Calophyllum brasiliense*, A) árbol, B) flores, C) hojas, D) frutos y E) corteza.

2.5.2 Química y actividad biológica.

Los compuestos aislados del árbol tropical *C. brasiliense* pueden clasificarse estructuralmente en siete grupos principales: compuestos fenólicos simples, triterpenos, esteroides, flavonoides, xantonas, cromononas y cumarinas (Matsuo *et al.*, 2009; García-Zebadúa *et al.*, 2014). Previamente se ha descrito la actividad anti-protozoaria contra *T. cruzi* y *Leishmania* de algunas cromononas y cumarinas, así como la actividad anti-viral y anti-micobacteriana (Xu *et al.*, 2004; Huerta-Reyes *et al.*, 2004b). Sin embargo, diferentes compuestos aislados de *C. brasiliense* han mostrado tener importantes propiedades farmacológicas como: efecto gastroprotector, antiespasmódico, analgésico y anti-bacteriano (da Silva *et al.*, 2001; Venugopala *et al.*, 2013).

Las cumarinas aisladas de este árbol pueden clasificarse en dos grupos, cumarinas de tipo mammea entre las que se encuentran las mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/OA,

C/OB, B/BA ciclo F, B/BB ciclo F e isomammeigina (Brenzan *et al.*, 2007; Cechinel-Filho, 2009; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004) y dipiranocoumarinas tetracíclicas como los inofilums (fenilo en C-4), calanólidos (prenilo en C-4) y cordatólidos (metilo en C-4) que estructuralmente están relacionadas entre sí (Ishikawa, 2000).

Los calanólidos con potente actividad contra el VIH-1 causante del SIDA actúan como inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa reversa. Existen diversos compuestos de este tipo, de los cuales el más activo y ampliamente estudiado es el (+)-calanólido A, que se aisló por primera vez del árbol tropical *C. langinerum* de Malasia (Kashman *et al.*, 1992).

Las propiedades anti-RT VIH-1 del (+)-calanólido A se describieron por primera vez mediante dos ensayos de viabilidad celular *in vitro* en células linfoblásticas T humanas infectadas con el virus (Kashman *et al.*, 1992). Este compuesto detuvo la replicación del VIH-1 y confirió 100% de protección contra los efectos citopáticos ($CE_{50} = 0,1 \mu M$) del virus. La citotoxicidad del compuesto en células no infectadas se manifestó a concentraciones 200 veces mayores ($CI_{50} = 20 \mu M$), resultando con un buen índice terapéutico ($CI_{50}/CE_{50} = 200$). Resultados similares se obtuvieron con un segundo método, estableciendo además que el (+)-calanólido A inhibía la actividad de la RT y de la proteína viral gp24. También se demostró que inhibe específicamente la actividad de la RT VIH-1 mediante ensayos sobre moldes homopoliméricos de poli A y poli T. Además del (+)-calanólido A, el (-)-calanólido B, presentó actividad anti VIH, pero requirió concentraciones cuatro veces mayores para lograr niveles de citoprotección equivalentes al (+)-calanólido A (Kashman *et al.*, 1992). El primer ensayo de actividad del (+)-calanólido A *in vivo* se realizó con un modelo de células CEM-SS humanas infectadas con VIH-1 IIIb, implantadas dentro de una fibra plástica hueca en ratón. El compuesto, administrado oral o parenteralmente, inhibió la replicación del virus (Xu *et al.*, 1999). Posteriormente se examinó su perfil de seguridad en animales, así como su farmacocinética en voluntarios humanos VIH negativos con dosis única (Creagh *et al.*, 2001). En los estudios clínicos de fase I, el (+)-calanólido A fue administrado en dosis de hasta 800 mg dos veces al día durante cinco días, encontrándose que era bien tolerado aunque se observaron efectos adversos transitorios de baja intensidad tales como mareo, cefalea, náuseas y mal sabor en

boca. Los niveles en plasma fueron variables, pero a dosis altas se alcanzaron niveles de posible eficacia terapéutica (Eiznhamer *et al.*, 2002). Finalmente los calanólidos A y B así como algunos derivados mostraron también actividad anti-micobacteriana, demostrándose la eficacia intracelular en macrófagos J774 y monocitos MM6 infectados con *M. tuberculosis*, estudios preliminares indicaron que el calanólido A presenta un mecanismo de acción similar al de la Rifampicina puesto que inhibe la síntesis de RNA en la micobacteria (Xu *et al.*, 2004).

3 JUSTIFICACIÓN.

La reciente aparición de la tuberculosis como una enfermedad re-emergente y su relación con el VIH, plantea la necesidad de contar con nuevos compuestos con posible actividad dual (vs TB y VIH) que disminuyan los riesgos y contraindicaciones de las actuales terapias, disminuyan la ingesta de un elevado número de medicamentos y coadyuven al combate de cepas resistentes a los fármacos convencionales. Tomando como punto de partida las relaciones filogenéticas entre las especies vegetales, es factible que los taxa que sintetizan compuestos con estructuras químicas similares, presenten propiedades farmacológicas semejantes.

4 HIPÓTESIS.

Los compuestos de las familias Clusiaceae y Julianaceae serán activos contra la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* y la RT VIH-1.

5 OBJETIVOS

5.1 General.

Identificar compuestos naturales activos contra *Mycobacterium tuberculosis* y RT VIH -1 a partir de especies de las familias Clusiaceae y Julianaceae distribuidas en México

5.2 Particulares.

- 1) Realizar un estudio bioprospectivo para establecer si los extractos de algunas de las especies de las familias Clusiaceae (5 especies) y Julianaceae (4 especies) poseen actividad sobre *M. tuberculosis* cepa H37Rv y RT-VIH-1.
- 2) Identificar los extractos con mayor actividad inhibitoria de la RT-VIH-1 y *M. tuberculosis*.
- 3) Aislar e identificar los compuestos activos del extracto con mayor actividad inhibitoria de la RT-VIH-1 y la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.
- 4) Cuantificar los compuestos activos en el extracto por HPLC.
- 5) Determinar la concentración efectiva media (CE₅₀) del extracto con mayor actividad sobre *M. tuberculosis* y RT-VIH-1 (IC₅₀), así como la citotoxicidad (CC₅₀) *in vitro* en macrófagos derivados de células THP1.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados en este proyecto se desarrolló una estrategia experimental (Figura 5) que inició con la colecta del material vegetal de las especies de las familias Clusiaceae (hojas) y Julianaceae (hojas y corteza) que se distribuyen en México. Posteriormente se prepararon los extractos de CH₂Cl₂-MeOH 1:1 y se realizó un tamizaje de los extractos sobre la enzima transcriptasa reversa del VIH-1 (RT VIH-1) y el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv para seleccionar la o las especies con mejor actividad en ambos modelos de estudio. El aislamiento de los compuestos de las especies seleccionadas se realizó mediante un fraccionamiento cromatográfico biodirigido utilizando los ensayos previamente mencionados. Los compuestos aislados fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas (RMN ¹H y ¹³C), experimentos bidimensionales homonucleares (COSY) y heteronucleares (HMBC y HSQC) así como técnicas espectrométricas (EM IR, UV) y fueron cuantificados en el extracto por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) o HPLC, por sus siglas en ingles. La toxicidad de los extractos y compuestos se evaluó en macrófagos derivados de células THP1 y la DL₅₀ en ratones macho de la cepa ICR.

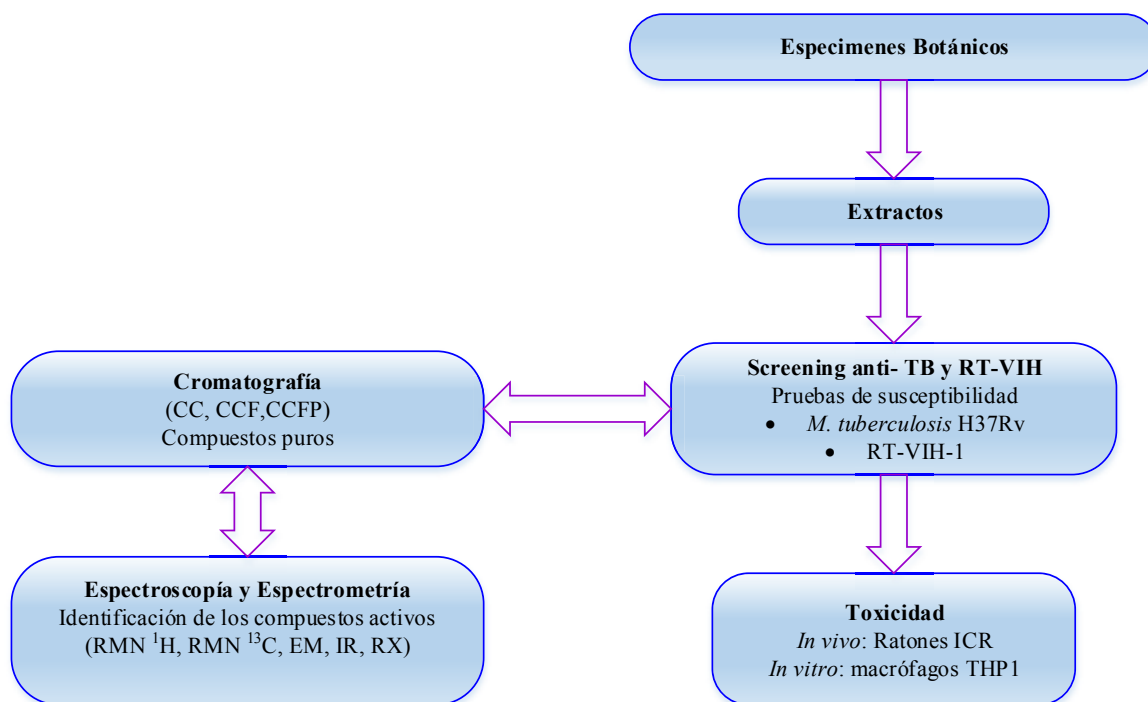


Figura 5. Estrategia experimental del proyecto.

6.1 Colecta del material vegetal.

Para la obtención del material vegetal (Hojas) de especies de la familia Clusiaceae se realizaron colectas en los estados de Veracruz y Oaxaca (Figura 6), mientras que para las especies de Julianaceae las colectas se realizaron en los estados de Jalisco, Oaxaca y Michoacán. Los ejemplares de respaldo fueron depositados en los Herbarios de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FACME) y el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM). La identificación taxonómica de los especímenes fue confirmada por el Biol. Lucio Lozada, taxónomo del Laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias de la UNAM y la Dra. Xochitl Cuevas Figueroa del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara.



Figura 6. Colecta del material vegetal: A) prensado de ejemplares de herbario, B) *Vismia baccifera*, C) *Amphipterygium simplicifolium*, D) *Clusia guatemalensis*, *Clusia lundellii*.

6.2 Preparación de Extractos.

El material vegetal colectado se secó a temperatura ambiente, se trituro y extrajo con un sistema diclorometano-metanol 1:1. Los extractos obtenidos se filtraron y concentraron con un rotavapor BÜCHI R-205. Las condiciones de operación fueron: 20°C y 80 rpm para diclorometano, 64°C y 80 rpm para metanol. Los concentrados se mantuvieron en una cámara de vacío y temperatura ambiente para eliminar el resto del disolvente y poder calcular el rendimiento de los extractos.

6.3 Actividad anti-micobacteriana.

Se evaluó la actividad anti-micobacteriana de los extractos, fracciones y compuestos de Clusiaceae y Julianaceae sobre la cepa H37Rv de *M.tuberculosis*, para ello se determinó primero la concentración del fármaco rifampicina y el día óptimo de revelado de la placa. La actividad anti-micobacteriana de los extractos fue evaluada según lo descrito por Collins, 1997; Franzblau *et al.*, 1998 y Jimenez-Arellanes, 2007. En el ensayo se utilizaron placas de 96 pozos, en los pozos de las orillas de las placas se colocaron 200 µL de agua destilada estéril para evitar la evaporación de los pozos de tratamiento durante el periodo de incubación, la columna 2 (B-G) fue utilizada para evaluar el fármaco de referencia mediante una dilución seriada en base dos (10-031 µg/ml), los pozos 10 E y F se utilizaron para el control de DMSO al 1.5 % v/v, 4 pozos control de revelado con inóculo bacteriano libre de tratamiento (11 B-11 E), 2 pozos control con medio de cultivo 7H9 (10 G y 11 G) y 1 pozo control diluido 1:100 (11 F) para garantizar el crecimiento del 1% de la población bacilar total. En total se evaluaron 19 extractos por triplicado a una concentración de 50 µg/mL; la concentración estimada del inóculo bacteriano fue de 1×10^6 ufc por pozo. Las placas se revelaron después de 6 días de incubación, observándose una diferencia de color según la viabilidad de las bacterias (rosa = crecimiento; azul = inhibición). La determinación de los porcentajes de inhibición se realizó con un lector ELISA. A fin de determinar la CI₅₀ de extractos y compuestos se evaluaron 7 concentraciones diferentes (3.125-200 µg/mL) con incrementos logarítmicos de 0.3 unidades. Para procesar los datos fue necesario calcular el factor de corrección (Ro) del colorante para su uso con diferentes filtros (540 y 620 nm) como lo indica el fabricante con la fórmula: $Ro = AO_{LW} / AO_{HW}$

Donde:

AO_{LW} = absorbancia del Alamar Blue en el medio de cultivo – Absorbancia del medio de cultivo (Filtro de longitud de onda corta).

AO_{HW} = absorbancia del Alamar Blue en el medio de cultivo – Absorbancia del medio de cultivo (Filtro de longitud de onda larga).

El porcentaje de reducción del colorante se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{AO_{LW} - (AO_{HW} \times Ro)}{AO_{LW}} \times 100$$

Donde:

A_{LW} = absorbancia a longitud de onda corta del pozo de prueba –Absorbancia del medio de cultivo.

A_{HW} = absorbancia a longitud de onda larga del pozo de prueba –Absorbancia del medio de cultivo.

Ro = factor de corrección del alamar azul.

6.4 Actividad anti RT-VIH-1.

La actividad inhibitoria de los extractos, fracciones y compuestos de Clusiaceae y Julianaceae sobre la enzima transcriptasa reversa (TR) se evaluó mediante el ensayo Lenti-RT® Activity Assays (Cavidi Tech) (Huerta-Reyes *et al*, 2004a), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, a fin de calcular el porcentaje de inhibición de los extractos de diclorometano metanol 1:1. Los extractos fueron probados a una concentración de 50 µg/mL. La determinación de las lecturas de las placas se realizó mediante un lector ELISA a 405 nm.

Determinación CI_{50} . Con base en los resultados obtenidos en el primer ensayo se procedió a determinar la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de cuatro extractos sobre la TR del VIH-1, según el protocolo descrito por el fabricante. Siete diferentes concentraciones de los extractos fueron evaluadas con incrementos logarítmicos de 0.3 unidades en un rango de 3.125 a 200 µg/mL.

6.5 Determinación DL₅₀ en ratones.

Se realizaron pruebas de toxicidad aguda del extracto de diclorometano metanol 1:1 de la corteza del extracto seleccionado (*A. simplicifolium*), se utilizaron ratones machos cepa ICR con pesos de 27-33 g. Los especímenes fueron adquiridos del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana (Xochimilco) y fueron conservados en cajas ventiladas bajo condiciones estándar de luz/oscuridad (12h con ciclos alternativos de día-noche) y temperatura de 27±2 °C, alimentados con alimento comercial (Rat-Chow). El manejo y protocolo del ensayo se ajustó a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y a la guía internacional “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2002”.

La dosis letal media (DL₅₀) se estableció a partir de la mortalidad de los ratones siete días después de la administración. El extracto se administró vía oral usando como vehículo aceite de maíz (Mazola®) y como control negativo se emplearon ratones a los cuales se les administró solución salina al 0.9%. Los ratones fueron sacrificados después de las una semana de acuerdo a normas mexicanas e internacionales previamente referidas.

6.6 Evaluación de la citotoxicidad en macrófagos de la línea celular THP1.

La citotoxicidad de extractos, fracciones y compuestos se evaluó en macrófagos THP1 según lo descrito por Kelly *et al.*, 2008, la diferenciación celular se realizó con PMA (forbol 12- miristato 13 acetato) 50 nM; 20 000 células en proceso de diferenciación se colocaron en cada pozo de la microplaca y estas se incubaron durante 72 h a 37°C con 5 % CO₂, Finalizada la incubación, las placas fueron lavadas con medio RPMI suplementado y se colocaron 100 µL de los extractos, fracciones o compuestos (50 µg/mL) en cada pozo; finalmente las placas se re-incubaron 24 h, como control positivo se utilizó doxorubicina.

Para determinar la concentración citotóxica media (CC₅₀) se evaluaron 7 concentraciones diferentes (3.125-200 µg/mL) con incrementos logarítmicos de 0.3 unidades, estos valores fueron ajustados si el compuesto lo requería. La citotoxicidad fue calculada a partir de la relación de la longitud de onda correspondiente a los pozos de tratamiento respecto al control (macrófagos no tratados).

6.7 Análisis Estadístico.

El análisis de los datos de actividad anti RT, anti-micobacteriana y citotoxicidad se realizó con el programa GraphPad Prism 5.0, las pruebas estadísticas utilizadas fueron: ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Tukey. En el caso de la actividad anti-micobacteriana y anti RT los datos ingresados (porcentajes de inhibición) fueron transformados con la formula $Y=\arcsin(\sqrt{Y/100})$ para convertir los datos porcentuales a numéricos.

6.8 Análisis de los extractos por Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Para conocer el perfil cromatográfico de los extractos de Julianaceae (Figuras 7 y 8) los extractos se analizaron por CCF-FN en un cromatofolio de 10 x 10 cm (Alugram Sil G/UV254, silica gel 60, 0.2 mm, con indicador fluorescente UV 254nm), y se eluyó con una mezcla de hexano-AcOEt (70:30). Se aplicaron 5 μ L (50 mg/mL) de cada uno de los extractos. El cromatofolio fue observado bajo luz UV de longitud de onda corta (254 nm) y onda larga (366 nm), posteriormente se asperjó con vainillina (Solución I: Ácido Sulfúrico al 5 % en etanol. Solución II: Vainillina al 1 % en etanol), y la placa se reveló por calentamiento.

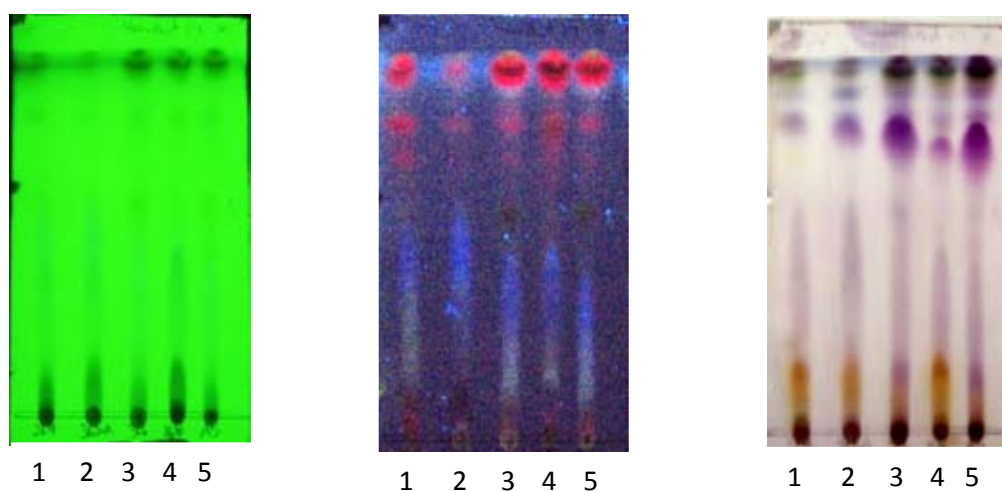


Figura 7. Cromatografía en capa fina-fase normal de los extractos de hojas de las especies de Julianaceae. (A) revelado bajo luz UV, 254nm; (B) 366nm y (C) revelado con vainillina al 5% en etanol. 1) *A. amplifolia* ♂, 2) *A. molle* ♀, 3) *A. adstringens* ♂, 4) *A. glaucum* ♂, 5) *A. simplicifolium*. Concentración 50 μ g/mL.

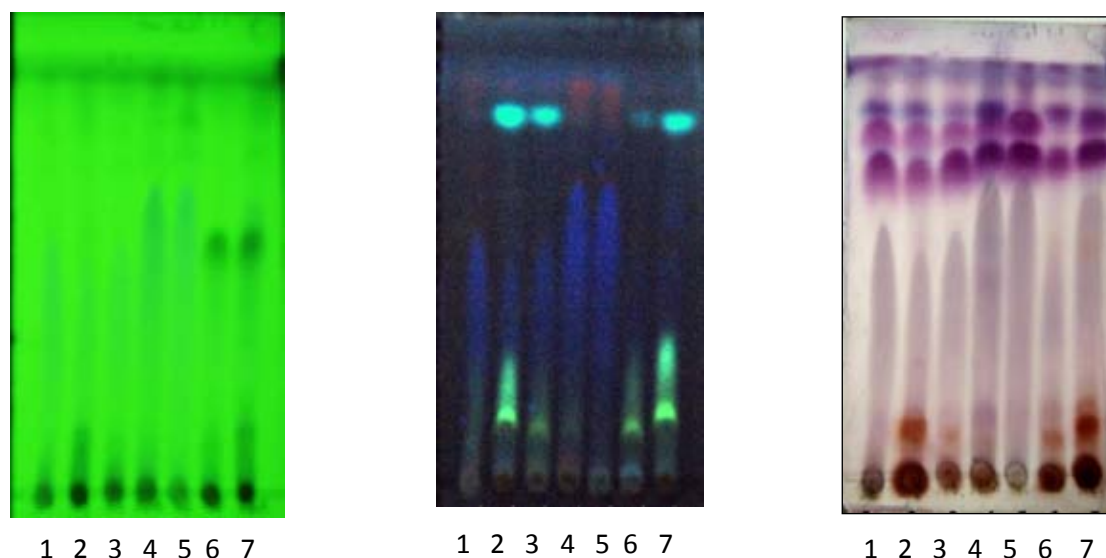


Figura 8. Cromatografía en capa fina-fase normal de los extractos de hojas de las especies de Julianaceae. (A) revelado bajo luz UV, 254nm; (B) 366nm y (c) revelado con vainillina al 5% en etanol. 1) *A. amplifolia* ♂, 2) *A. amplifolia* ♀, 3) *A. molle* ♂, 4) *A. simplicifolium*, 5) *A. adstringens* ♂, 6) *A. glaucum* ♂, 7) *A. glaucum* ♀. Concentración 50 µg/mL.

6.9 Fraccionamiento del extracto de *A. simplicifolium*.

El extracto de *A. simplicifolium* fue fraccionado por cromatografía en columna (Figura 9) tomando en consideración los resultados del cernimiento inicial. Cincuenta gramos del extracto seco se resuspendieron en hexano y celita (250 g) y una vez que la mezcla se secó, esta fue colocada en una columna cromatográfica previamente empacada con sílica gel (1250 g, malla 70-230, Merck) como adsorbente, empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt con polaridad creciente (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100); posteriormente, se continuó la elusión con una mezcla de AcOEt-metanol en diferentes proporciones (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100) colectando fracciones de 3 L.

Las fracciones concentradas se depositaron en frascos de 15 mL para terminar de evaporar el disolvente a temperatura ambiente. Cada una de las fracciones fue analizada por CCF-FN en cromatofolios de sílica gel 60 (Alugram Sil G/UV254, de 0.2 mm, que se eluyeron con una mezcla de hexano-AcOEt 7:3, o bien con AcOEt-MeOH en un gradiente de polaridad creciente similar al usado para CC-FN. 2-3 µL de cada una de las fracciones

fueron aplicadas a los cromatofolios que se observaron bajo luz UV de longitud de onda corta (254 nm) y onda larga (366 nm). Una solución de vainillina se utilizó como revelador. En relación a la similitud de los patrones cromatográficos, se reunieron las fracciones y se evaluó su actividad inhibitoria de la RT-VIH-1 y *M. tuberculosis*.

Se realizó un fraccionamiento secundario (Figura 9) de la fracción Hex-AcOEt 25:75 (12 g) utilizando un sistema de hexano-AcOEt con polaridad creciente como eluyente mientras que para las fracciones de AcOEt-MeOH 1:1, 25:75 y MeOH 100%(8 g) se utilizó una mezclas de AcOEt-MeOH de polaridad creciente para su elución colectándose fracciones de 25 mL.

6.9.1 Identificación de los compuestos aislados

La identificación de los compuestos aislados se realizó mediante técnicas espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C , IR, UV) y espectrométricas (EM), experimentos bidimensionales homonucleares (COSY) y heteronucleares (HMBC y HSQC), así como Difracción de Rayos X, además los parámetros espectroscópicos fueron comparados con los previamente reportados en la literatura para algunos compuestos conocidos.

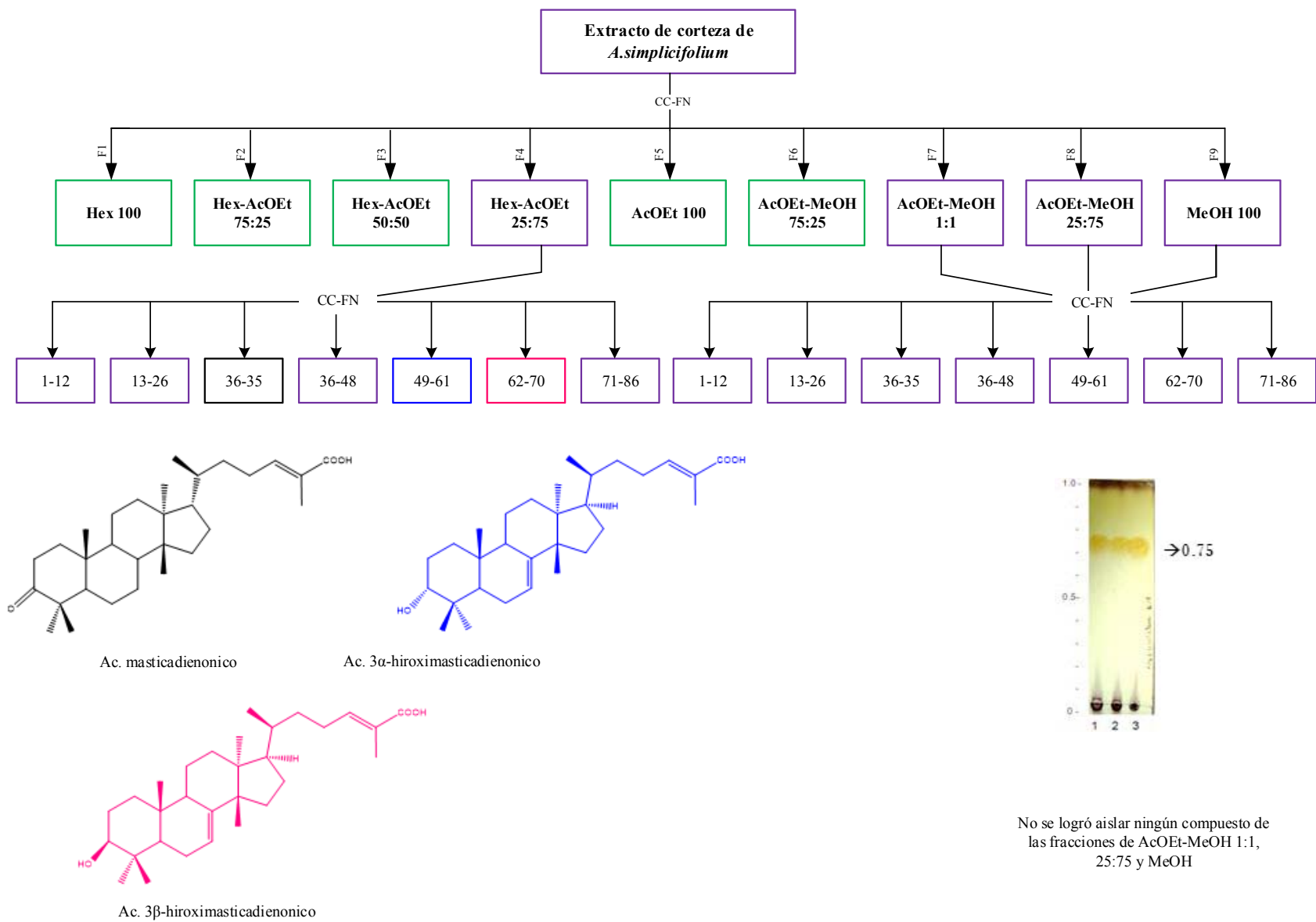


Figura 9. Diagrama del fraccionamiento por Cromatografía en Columna del extracto y fracciones de *A. simplicifolium*

6.9.2 Cuantificación de los extractos de Julianaceae y *C. brasiliense* por HPLC

Los extractos de corteza de Julianaceae y hojas de *C. brasiliense* se analizaron por HPLC (Agillen 1100 serie) de acuerdo con lo reportado previamente en la literatura (Navarrete *et al.*, 2006; García Zebadúa *et al.*, 2011).

6.9.2.1 Julianaceae

En el caso de Julianaceae se cuantificaron los ácidos oleanólico, masticadienónico y 3 α y 3 β -hidroximasticadienónico. Para cada estándar se preparó una solución madre (Stock) de 1 mg/mL (1mg del compuesto en 1mL de metanol HPLC, sonicación: 20 min), seguida de una dilución 1/10 para obtener la muestra de inyección a una concentración de 100 μ g/mL.

Para el análisis se utilizó una columna cromatográfica Kromasil 100 C-18, de 15 centímetros de largo, 4.6 mm de diámetro interno y 5 μ m de tamaño de partícula. La fase móvil consistió en un sistema que contenía una mezcla de agua al 0.1% de ácido acético + acetonitrilo al 0.1% de ácido acético + una mezcla de alcohol reactivo (90% etanol + 5 % metanol + 5 % 2-propanol) en una proporción de 18: 52: 30 v/v por 25 min con un flujo isocrático de 1mL/min a temperatura ambiente; el volumen de inyección fue de 10 μ L y la muestra se monitoreo a 215nm. Después de cada análisis la columna se eluyó con acetonitrilo al 100 % durante 5 min para su lavado seguido de un periodo de equilibrio con la fase móvil durante 15 min.

Para obtener la recta patrón de los estándares se preparó una mezcla de triterpenos a una concentración de 1 mg/mL (se pesaron 5 mg de cada compuesto y se disolvió en 5 mL de metanol HPLC), de esta solución se tomó la cantidad necesaria para preparar 7 diluciones: 20, 40, 60, 100, 140, 200 y 500 μ g/mL que fueron inyectadas al equipo de HPLC por duplicado en dos días diferentes.

6.9.2.2 *Calophyllum brasiliense*.

Para cuantificar el ácido apetalico, calanolido B y soulatrólido en el extracto de *C. brasiliense* se utilizó una columna Teknokroma C-18, de 25 cm de largo, 4 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula.

La fase móvil consistió en un sistema isocrático de acetonitrilo-agua 6:4 con un flujo de 1 mL/min durante 40 min, el volumen de inyección fue de 10 μL y la longitud de onda del detector de 284 nm, después de cada análisis la columna se eluyó durante 5 min con acetonitrilo al 100 % para su lavado y 3 min con la fase móvil para el equilibrio de la columna

Para obtener la recta patrón de los estándares se preparó una mezcla de ácido apetalico, mammea A/BA y soulatrólido a una concentración de 1 mg/mL (se pesaron 3mg de cada compuesto y se disolvió en 3 mL de metanol HPLC), de esta solución se tomó la cantidad necesaria para preparar 6 diluciones: 20, 50, 80, 120, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$ que fueron inyectadas al equipo de HPLC por duplicado en dos días diferentes. Las mismas diluciones fueron preparadas por separado para el calanolido B esto porque solo contábamos con 1 mg del compuesto.

7 RESULTADOS

7.1 Actividad biológica

7.1.1 Actividad anti-micobacteriana de extractos de Julianaceae y Clusiaceae

Los 14 extractos (hojas y corteza) de Julianaceae mostraron una inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* cepa H37Rv mayor a 84 % al ser evaluados a 50 µg/mL. Los porcentajes más altos de inhibición los presentaron los extractos de hojas de *A. simplicifolium* (90.57 %) y *A. adstringens* (90.21 %). El extracto de la corteza de la última especie inhibió en 88.2% el crecimiento del patógeno. Este resultado es consistente con lo reportado previamente en donde se mostró que la corteza de *A. adstringens* inhibió en 95 % el crecimiento de *M. tuberculosis* a la misma concentración (Rivero-Cruz *et al.*, 2005). Cabe mencionar que no se observaron diferencias significativas respecto a los diferentes tratamientos con extractos de esta familia. Por otra parte, de las especies de Clusiaceae solo *C. brasiliense* mostró una actividad similar (82%) a la observada con los extractos de Julianaceae, las otras especies de Clusiaceae inhibieron el crecimiento de la cepa H37Rv de 58.3 % a 70.3 % (Tabla 3).

7.1.2 Actividad anti-RT de extractos de Julianaceae y Clusiaceae

Respecto a la actividad anti-RT de los extractos de Clusiaceae y Julianaceae la mayor actividad inhibitoria la presentó el extracto de *C. brasiliense* (67.6 %). Los extractos de *V. baccifera*, *A. molle*, *A. amplifolia* y *A. simplicifolium* mostraron inhibición moderada (cercana al 50 %) (Tabla 3). El análisis estadístico indica que existen diferencias altamente significativas de los extractos evaluados respecto al de *C. brasiliense*, pero no entre *V. baccifera* y *A. molle*, así como, entre *A. simplicifolium*, y *A. glaucum*. Comparando nuestros resultados con lo previamente reportado en la literatura para la familia Clusiaceae estos son similares para *C. brasiliense*, pero con menor potencia para el resto de las especies (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a).

Tabla 3. Actividad anti-micobacteriana y anti-RT de los extractos de Julianaceae y Clusiaceae (50 µg/mL).

Especie	Colecta/Voucher	Parte usada /Genero	% inhibición de <i>M. tuberculosis</i>	% inhibición de RT- HIV-1
Julianaceae				
<i>Amphipterygium amplifolia</i>	Jalisco/15637	Corteza/ M	90.1 ± 0.6	24.8 ± 2.1
		Hojas/ M	89.8 ± 0.1	18.7 ± 3.2
	Jalisco/15638	Corteza/ F	89.1 ± 0.4	36.7 ± 2.8
		Hojas/ F	89.7 ± 0.2	46.5 ± 4.8
<i>Amphipterygium molle</i>	Jalisco/15639	Corteza/ M	89.6 ± 0.5	19.3 ± 2.2
	Jalisco/15640	Corteza/ F	88.7 ± 0.7	11.3 ± 0.7
		Hojas/ F	89.0 ± 0.6	49.8 ± 1.8
	<i>Amphipterygium adstringens</i>	Jalisco/15641	Corteza/ M	88.2 ± 0.1
		Hojas/ M	90.2 ± 0.7	6.1 ± 0.7
<i>Amphipterygium glaucum</i>	Michoacán/15644	Corteza /M	86.9 ± 0.5	40.0 ± 2.0
		Hojas/ M	89.6 ± 0.9	48.5 ± 0.7
	Michoacán/15645	Corteza/ F	84.6 ± 1.3	21.7 ± 2.1
	<i>Amphipterygium simplicifolium</i>	Oaxaca/16125	Corteza/	90.3 ± 0.2
		Hojas/	90.5 ± 1.0	7.9 ± 0.4
Clusiaceae				
<i>Vismia mexicana</i>	Veracruz/134793 [§]	Hojas	63.5 ± 1.1	43.7 ± 0.7
<i>Vismia baccifera</i>	Oaxaca/134792 [§]	Hojas	70.3 ± 0.5	54.0 ± 0.8
<i>Clusia guatemalensis</i>	Oaxaca/134795 [§]	Hojas	62.1 ± 0.7	32.8 ± 2.4
<i>Clusia lundellii</i>	Oaxaca/136723 [§]	Hojas	58.3 ± 0.4	27.3 ± 1.1
<i>Calophyllum brasiliense</i>	Veracruz/15526	Hojas	82.8 ± 0.4	67.6 ± 1.2

Los resultados representan la media ($\bar{x} \pm EE$), para una n=5, vehículo DMSO (0.5%v/v).

7.1.3 CI₅₀ de extractos de Julianaceae y Clusiaceae

7.1.3.1 Actividad sobre *Mycobacterium tuberculosis*

Se calculó la CI₅₀ para los extractos (3 Julianaceae y 3 Clusiaceae) que mostraron la mejor actividad en el ensayo inicial contra *M. tuberculosis* y RT-VIH-1. Las especies de Julianaceae mostraron la mayor potencia considerando sus valores de CI₅₀ sobre la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (1.77-2.35 µg/mL), mientras que las especies de Clusiaceae inhibieron con valores de 3.02-3.82 µg/mL (Tabla 4).

7.1.3.2 Actividad sobre RT de VIH-1

En el caso de las CI_{50} sobre la RT del VIH-1 (Tabla 4) la mayor potencia la presentó *C. brasiliense* ($CI_{50} = 26.2 \mu\text{g/mL}$) mientras que las 5 especies restantes inhibieron en el rango de 37.3-89.5 $\mu\text{g/mL}$. Con base en estos resultados se decidió trabajar químicamente el extracto de *A. simplicifolium* y las fracciones del extracto se evaluaron en los dos modelos de estudio.

Tabla 4. CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de la actividad anti-micobacteriana y anti-RT del VIH-1 de los extractos de Julianaceae y Clusiaceae.

Especie	Colecta/ Voucher	Parte usada /Genero	CI_{50} <i>M. tuberculosis</i>	CI_{50} RT-VIH-1
Julianaceae				
<i>Amphipterygium amplifolia</i>	Jalisco/15638	Hojas/ F	1.77 ± 1.8	58.6 ± 1.2
<i>Amphipterygium molle</i>	Jalisco/15640	Hojas/ F	1.92 ± 1.3	89.5 ± 1.6
<i>Amphipterygium simplicifolium</i>	Oaxaca/16125	Corteza/	2.35 ± 0.9	59.2 ± 1.2
Clusiaceae				
<i>Vismia baccifera</i>	Oaxaca/134792 [§]	Hojas	3.64 ± 0.9	37.3 ± 1.4
<i>Vismia mexicana</i>	Veracruz/134793 [§]	Hojas	3.82 ± 1.2	64.5 ± 1.8
<i>Calophyllum brasiliense</i>	Veracruz/15526	Hojas	3.02 ± 1.6	26.2 ± 1.1

Los resultados representan la media ($\bar{x} \pm EE$) para una $n= 5$, vehículo DMSO (0.5%v/v).

7.1.4 Actividad anti-micobacteriana de fracciones de *A. simplicifolium*

Del extracto de diclorometano-metanol (1:1) de *A. simplicifolium* se obtuvieron nueve fracciones, las cuales fueron evaluadas sobre *M. tuberculosis*. Las fracciones menos polares, eluidas con hexano-AcOEt (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100) mostraron actividad inhibitoria (>82%) sobre la cepa H37Rv (Tabla 5). Mientras que las fracciones de mayor polaridad (AcOEt-MeOH) mostraron porcentajes de inhibición en un rango de 39 a 65%. Las fracciones de Hexano-AcOEt 75:25, 1:1, 25:75 no mostraron diferencias significativas en comparación con el fármaco de referencia (rifampicina, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 92% inhibición) al ser evaluadas a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 5).

7.1.5 Actividad anti-RT de fracciones de *A. simplicifolium*

En la evaluación de la actividad enzimática la fracción más activa fue la de AcOEt-MeOH 1:1 (79.6 %) seguida de las fracciones de AcOEt-MeOH 25:75 (62 %) y MeOH (64.9 %), estos resultados evidencian que la actividad anti-RT de estas fracciones es superior a la mostrada por el extracto total (Tabla 5); por el contrario, las fracciones de menor polaridad (hexano-acetato de etilo 100:0, 75:25, 50:50,25:75 y 0:100) muestran una inhibición enzimática menor al 17%. Todos los tratamientos presentan diferencias significativas respecto al fármaco control nevirapine (96.13 %), no así entre las fracciones de AcOEt-MeOH 25:75 y MeOH.

Tabla 5. Actividad anti-micobacteriana y anti-RT de las fracciones de *A. simplicifolium*.

Fracción	% inhibición micobacteriana	% inhibición RT-VIH-1
Hex 100%	82.0 ± 1.86	9.7 ± 5.06
Hex- AcOEt 75:25	93.4 ± 0.61	2.7 ± 3.02
Hex- AcOEt 1:1	93.6 ± 0.42	2.7 ± 0.62
Hex- AcOEt 25:75	91.4 ± 1.84	15.6 ± 5.51
AcOEt 100%	88.0 ± 1.25	6.8 ± 4.04
AcOEt-MeOH75:25	65.0 ± 3.68	15.4 ± 2.42
AcOEt-MeOH 1:1	52.5 ± 0.46	79.6 ± 1.54
AcOEt-MeOH 25:75	47.1 ± 0.88	62.05 ± 3.35
MeOH 100%	39.6 ± 1.04	64.9 ± 1.83

Los datos representan la media ($\bar{x} \pm EE$) para una n=5, vehículo DMSO (0.5 % v/v).

7.1.6 CI_{50} de fracciones de *A. simplicifolium*

Las fracciones de mediana polaridad (eluídas con hexano y mezclas de Hex-AcOEt) presentaron la mayor actividad inhibitoria de *M. tuberculosis*, sus CI_{50} se encuentran en el orden de 2.0 µg/mL. Por el contrario, las fracciones más polares presentaron las mejores CI_{50} sobre la RT de VIH, siendo la más potente (7.4 µg/mL) la fracción AcOEt-MeOH 1:1 (Tabla 6).

Tabla 6. CI₅₀ de las fracciones del extracto de *A. simplicifolium* sobre la *M. tuberculosis* y la RT del VIH-1.

Fracción	CI ₅₀ sobre <i>M.tuberculosis</i> (µg/mL)	CI ₅₀ sobre RT-VIH-1 (µg/mL)
Hex 100%	2.28 ± 1.37	> 50
Hex- AcOEt 75:25	1.94 ± 1.33	> 50
Hex- AcOEt 1:1	1.98 ± 0.92	> 50
Hex- AcOEt 25:75	2.02 ± 0.84	> 50
AcOEt 100%	3.02 ± 1.05	> 50
AcOEt-MeOH75:25	3.29 ± 1.68	> 50
AcOEt-MeOH 1:1	5.02 ± 1.16	7.48 ± 1.43
AcOEt-MeOH 25:75	7.22 ± 0.91	18.48 ± 1.30
MeOH 100%	9.76 ± 1.58	7.46 ± 1.84

Los datos representan la media ($\bar{x} \pm EE$) para una n=5, vehículo DMSO (0.5%v/v).

7.1.7 Actividad anti-micobacteriana de compuestos aislados

Se evaluó la actividad anti-micobacteriana de 6 compuestos, los ácidos masticadienónico, 3 α y 3 β -hidroximasticadienónico aislados del extracto de diclorometano-metanol (1:1) de *A. simplicifolium* (corteza), el ácido oleanólico fue adquirido comercialmente al encontrarse reportes de la presencia de este en la corteza de *A. adstringens*. Los compuestos ac. apetalico calanólido B y soulatrólido se obtuvieron de trabajos previos en el laboratorio del Dr. Reyes-Chilpa y su identidad y pureza se corroboró por Resonancia Magnética Nuclear de Protón. En la tabla 7 se observa que todos los compuestos inhibieron en un porcentaje mayor a 87 % el crecimiento de la cepa H37Rv al ser evaluados a 50 µg/mL, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

7.1.8 Actividad anti-RT de compuestos aislados

Respecto a la inhibición de la actividad de la RT-VIH-1, solo el soulatrólido mostro una actividad considerable (37.6 %), los 5 compuestos restantes no inhiben la actividad enzimática (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad anti-micobacteriana y anti-RT de los compuestos ($\mu\text{g/mL}$) de *A. simplicifolium* y *C. brasiliense*.

Compuesto	% de inhibición <i>M. tuberculosis</i>	% de inhibición RT-VIH
<i>A. simplicifolium</i>		
Ac. Oleanólico	91.3 \pm 1.37	15.91 \pm 1.07
Ac. 3 α -hidroximasticadienónico	93.2 \pm 0.56	6.21 \pm 2.01
Ac. 3 β -hidroximasticadienónico	90.1 \pm 1.76	11.67 \pm 1.17
Ac. Masticadienónico	88.7 \pm 1.93	4.23 \pm 1.26
<i>C. brasiliense</i>		
Ac. Apetálico	87.6 \pm 1.91	na
Soulatrólido	89.7 \pm 1.22	37.6 \pm 1.61

Los datos representan la media ($\bar{x} \pm \text{EE}$) para una n=5, vehículo DMSO (0.5%v/v), na=no activo.

7.1.9 CI_{50} los compuestos aislados

El ácido apetálico y soulatrólido son los compuestos más potentes al presentar los valores más bajos de CI_{50} sobre *M. tuberculosis*, este último es el único de nuestros compuestos que también fue activo sobre la RT de VIH-1 (Tabla 8).

Tabla 8. CI_{50} de los compuestos aislados de *A. simplicifolium* y *C. brasiliense*.

Compuesto	CI_{50} <i>M. tuberculosis</i> $\mu\text{g/mL}$.	CI_{50} RT-VIH $\mu\text{g/mL}$
<i>A. simplicifolium</i>		
Ac. oleanólico	0.77 \pm 1.23	> 50
Ac. 3 α -hidroximasticadienónico	2.02 \pm 0.98	> 50
Ac. 3 β -hidroximasticadienónico	2.85 \pm 1.16	> 50
Ac. Masticadienónico	1.73 \pm 1.02	> 50
<i>C. brasiliense</i>		
Ac. apetálico	2.4 x 10 ⁻² \pm 1.89	na
Soulatrólido	5 x 10 ⁻³ \pm 1.32	5.12 \pm 2.16

Los datos representan la media ($\bar{x} \pm \text{EE}$) para una n=5, vehículo DMSO (0.5%v/v), na=no activo.

7.1.10 Toxicidad aguda del extracto de *A. simplicifolium*

El extracto de *A. simplicifolium* resultó ser inocuo ($DL_{50} > 5$ g/kg) según los criterios establecidos por Lorke (1983). Este resultado es similar al reportado por Navarrete *et al* (2005) para el extracto de una especie relacionada *A. adstringens*.

7.1.11 Citotoxicidad de extractos de Clusiaceae, Julianaceae y fracciones de *A. simplicifolium*

Los 19 extractos presentaron citotoxicidad menor al 25 %, al ser evaluados con macrófagos de la línea celular humana THP1. El menos citotóxico fue el extracto de *A. simplicifolium* al inhibir 9.27 % el crecimiento de los macrófagos. Respecto a los extractos de Julianaceae, se observaron valores más elevados en las muestras correspondientes a hojas, comparados con los de corteza. Para los extractos de Clusiaceae el valor más alto de citotoxicidad lo presentó el extracto de *C. brasiliense* (23.8 %) mientras que los más bajos las especies de *V. mexicana* y *V. baccifera* (< 11 %) (Tabla 9).

Tabla 9. Citotoxicidad a macrófagos THP1 de extractos de Julianaceae y Clusiaceae.

Especie	Parte usada /Genero	Citotoxicidad \pm EE
Juianaceae		
<i>Amphipterygium amplifolia</i>	Corteza/ M	14.03 \pm 1.83
	Hojas/ M	16.31 \pm 2.38
	Corteza/ F	23.39 \pm 1.72
	Hojas/ F	25.54 \pm 3.09
<i>Amphipterygium molle</i>	Corteza/ M	12.26 \pm 1.40
	Corteza/ F	19.70 \pm 3.04
	Hojas/ F	18.48 \pm 1.59
<i>Amphipterygium adstringens</i>	Corteza/ M	18.48 \pm 2.14
	Hojas/ M	25.17 \pm 1.68
	Corteza /M	10.90 \pm 1.67
<i>Amphipterygium glaucum</i>	Hojas/ M	22.90 \pm 3.41
	Corteza/ F	19.77 \pm 1.56
<i>Amphipterygium simplicifolium</i>	Corteza/	9.27 \pm 0.39
	Hojas/	19.50 \pm 1.73
Clusiaceae		
<i>Vismia mexicana</i>	Hojas	10.71 \pm 1.73
<i>Vismia baccifera</i>	Hojas	10.69 \pm 1.43
<i>Clusia guatemalensis</i>	Hojas	17.13 \pm 1.31
<i>Clusia lundellii</i>	Hojas	16.33 \pm 0.91
<i>Calophyllum brasiliense</i>	Hojas	23.86 \pm 2.03

Los datos representan la media ($\bar{X} \pm EE$) para una n=5, vehículo DMSO (0.5%v/v).

De las fracciones del extracto de *A. simplicifolium* la fracción más toxica fue la eluída con Hex-AcOEt 75:25 > 65% esta fracción tiene como componentes mayoritarios ácido instipolinácico (3β-OH masticadienónico) el cual presenta una citotoxicidad mayor al 73 %. Respecto del fármaco de referencia (40 μM) y el control (macrófagos sin tratar) todos los tratamientos muestran diferencias significativas p<0.001 (Figura 10).

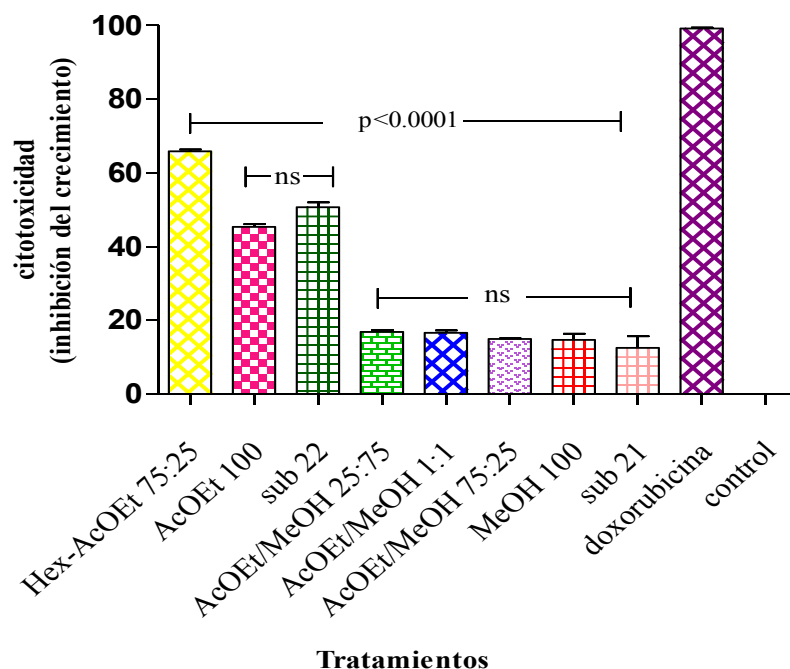


Figura 10. Citotoxicidad de las fracciones de *A. simplicifolium*, los datos representan la media ($\bar{x} \pm EE$) para una n=5, vehículo DMSO (0.5 % v/v); ANOVA, Tukey, p< 0.05.

7.1.12 Citotoxicidad de compuestos de *A. simplicifolium* y *C. brasiliense*

Se realizó la evaluación de la citotoxicidad a macrófagos de los compuestos de *A. simplicifolium* y *C. brasiliense*, encontrando que el ácido 3β-hidroximasticadienónico y soulatrólido son tóxicos en un porcentaje mayor al 56 % (Figura 11) al ser evaluados a 50 μg/mL.

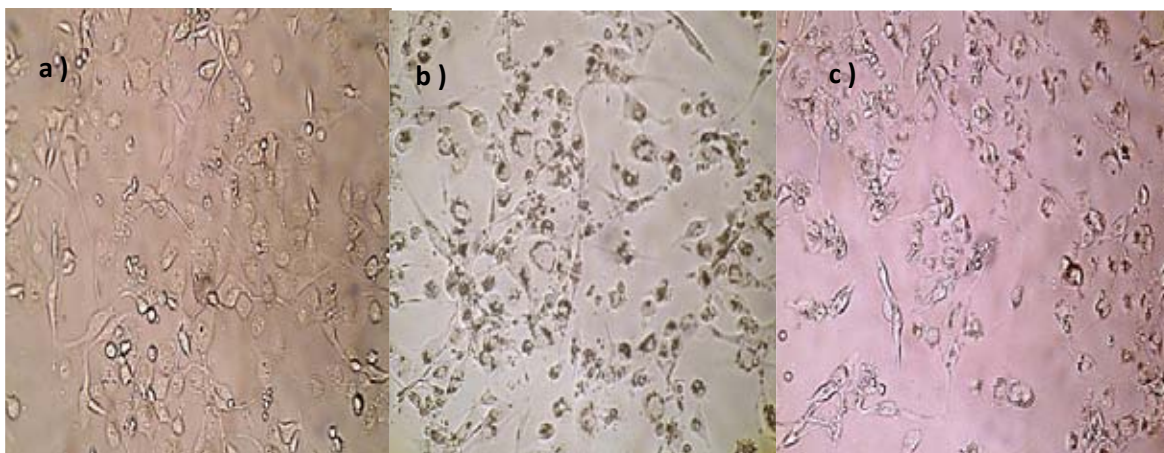


Figura 11. Efecto del ácido 3β-hidroximasticadienónico y soulatrólido (50 μg/mL) sobre macrófagos THP1, a) macrófagos sin tratar, b) ac. 3β-hidroximasticadienónico y c) soulatrólido.

En la figura 12 se observa todos los tratamientos muestran diferencias respecto al fármaco control doxorubicina y tomando en consideración las CI_{50} de los compuestos sobre *M.tuberculosis* decidimos realizar el cálculo de las CC_{50}

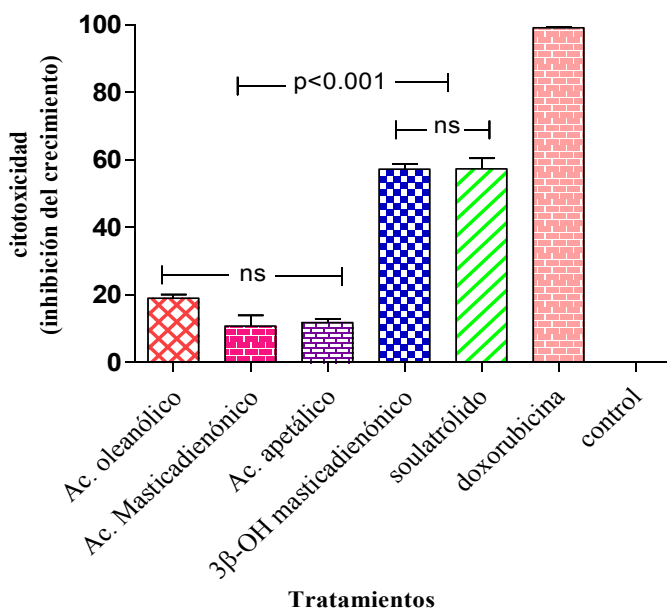


Figura 12. Citotoxicidad de los compuestos aislados de *A. simplicifolium* y *C. brasiliense*, los datos representan la media ($\bar{X} \pm EE$) para una $n=5$, vehículo DMSO (0.5%v/v); ANOVA, Tukey, $p < 0.05$.

7.1.13 CC₅₀ de compuestos aislados

Todos los compuestos requirieron concentraciones altas de CC₅₀ para mostrar toxicidad a macrófagos (>74 µg/mL) (Tabla 10), tomando en consideración sus valores de CI₅₀ se pudo establecer estos compuestos presentan un buen margen de seguridad.

Tabla 10. CC₅₀ de los compuestos aislados de *A. simplicifolium* y *C. brasiliense*.

Compuesto	CC ₅₀ ± EE
<i>A. simplicifolium</i>	
Ac. Oleanólico	74.13 ± 1.07
Ac. 3α-hidroximasticadienónico	80.87 ± 1.75
Ac. 3β-hidroximasticadienónico	85.16 ± 2.01
Ac. Masticadienónico	96.02 ± 2.35
<i>C. brasiliense</i>	
Ac. Apetálico	160.65 ± 0.93
Soulatrólido	87.31 ± 1.56

Los datos representan la media ($\bar{x} \pm EE$) para una n=5, vehículo DMSO (0.5 % v/v).

7.2 Identificación de los compuestos aislados

De la fracción de hexano-AcOEt 25:75 de la corteza de *A. simplicifolium* se aislaron los ácidos masticadienónico (2), 3α (3) y 3β-hidroximasticadienónico (4) (figura 13), sus estructuras se determinaron por ¹HRMN, ¹³CRMN, UV, IR y difracción de rayos X. El ácido oleanólico (4) se adquirió comercialmente, mientras que los compuestos ácido apetálico (5), calanólido B (6) y soulatrólido (7) se aislaron previamente de *C. brasiliense*, su identidad y pureza se determinó por ¹HRMN.

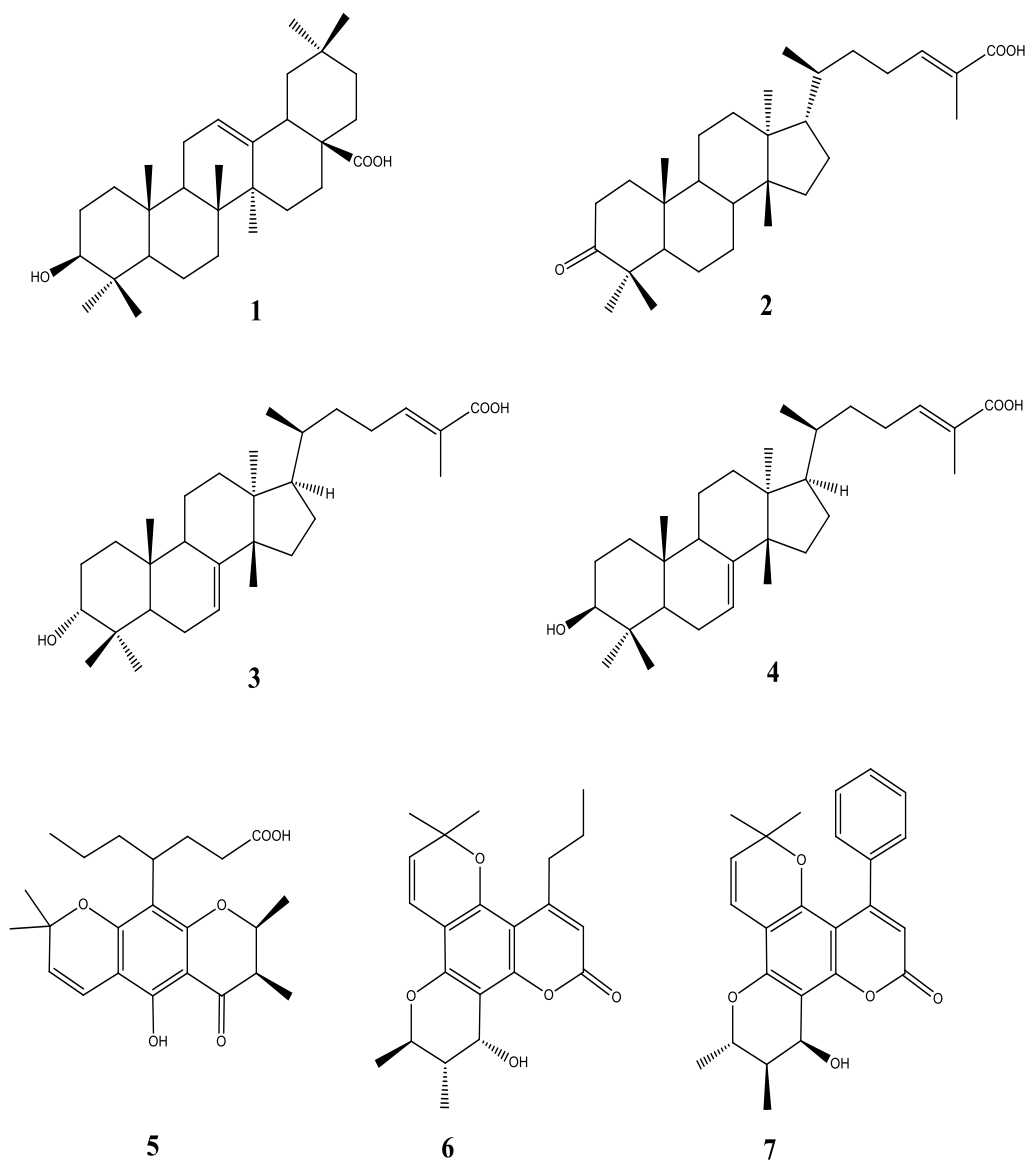


Figura 13. Compuestos aislados de *A. simplicifolium* y *C. brasiliense*: ácido oleanólico (1), ácido masticadienónico (2), ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3), ácido 3 β -hidroximasticadienónico, ácido apetalico (5), calanolido B (6) y soulatrólido (7).

7.2.1 Ácido 3β-hidroxicasticadienónico

El espectro de ^{13}C RMN (Figura 14), junto con el experimento DEPT, mostraron la presencia de veinticinco carbonos sp^3 , de los cuales siete son metilos (CH_3), nueve metilenos (CH_2), cinco metinos (CH) incluyendo un oximetino (δ 76.992) y cuatro carbonos cuaternarios. Cinco carbonos sp^2 (δ 144.4, 128.464, 147.294, 119.236) además de un carbonilo de un grupo carboxilo (δ 171.835).

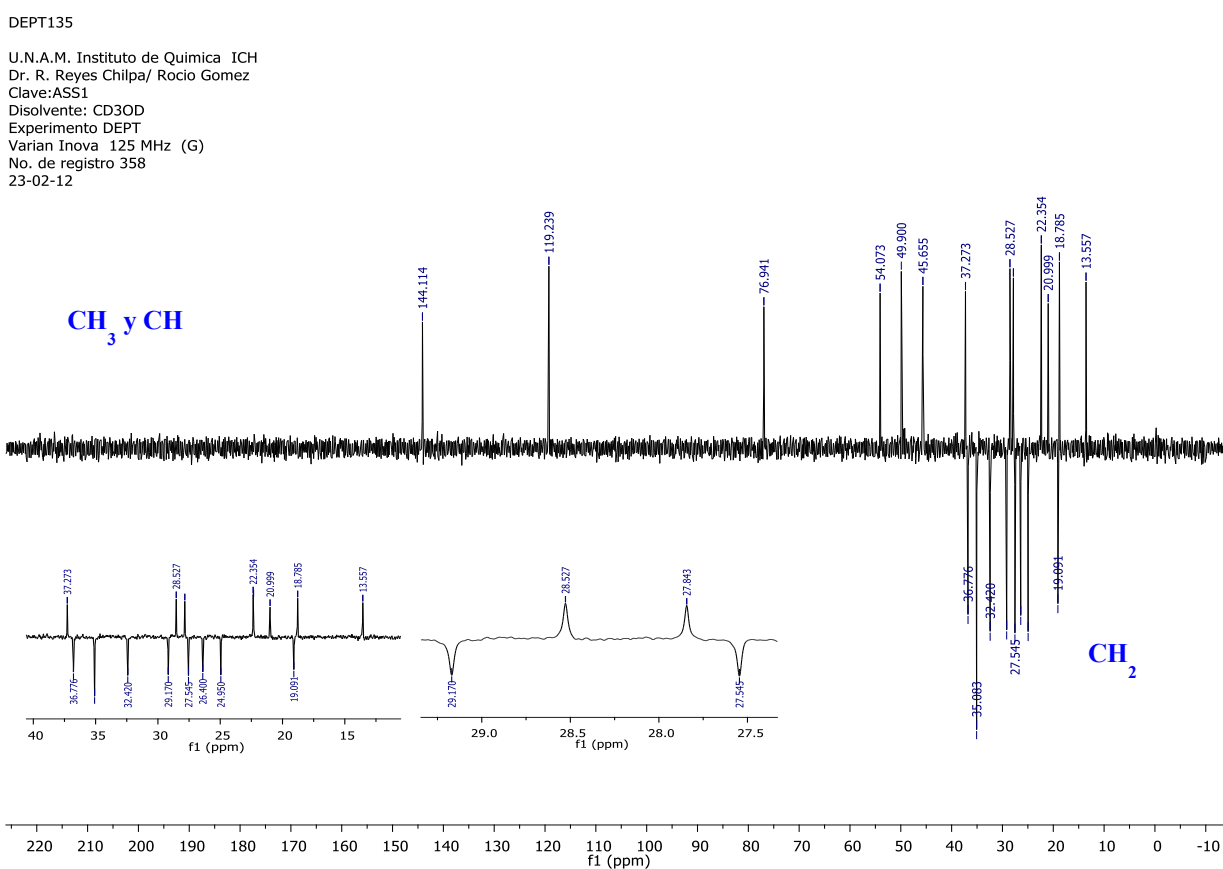


Figura 14. Espectro de ^{13}C RMN (experimento DEPT) del ácido 3β-hidroxicasticadienónico.

El espectro de $^1\text{HRMN}$ (Figura 15) muestra la presencia de los hidrógenos de cinco grupos metilos terciarios (δ 0.793 s, 0.853 s, 0.905 s, 0.913 s, 1.005 s), un metilo vinílico (δ 1.870, s ancho) y un metilo secundario (δ 0.918, s ancho), un protón oximetino (δ 3.384, s ancho) y dos protones vinílicos (δ 5.265, dd, $J=6.3, 2.9$ Hz y δ 5.950, td, $J=7.6, 1.2$ Hz).

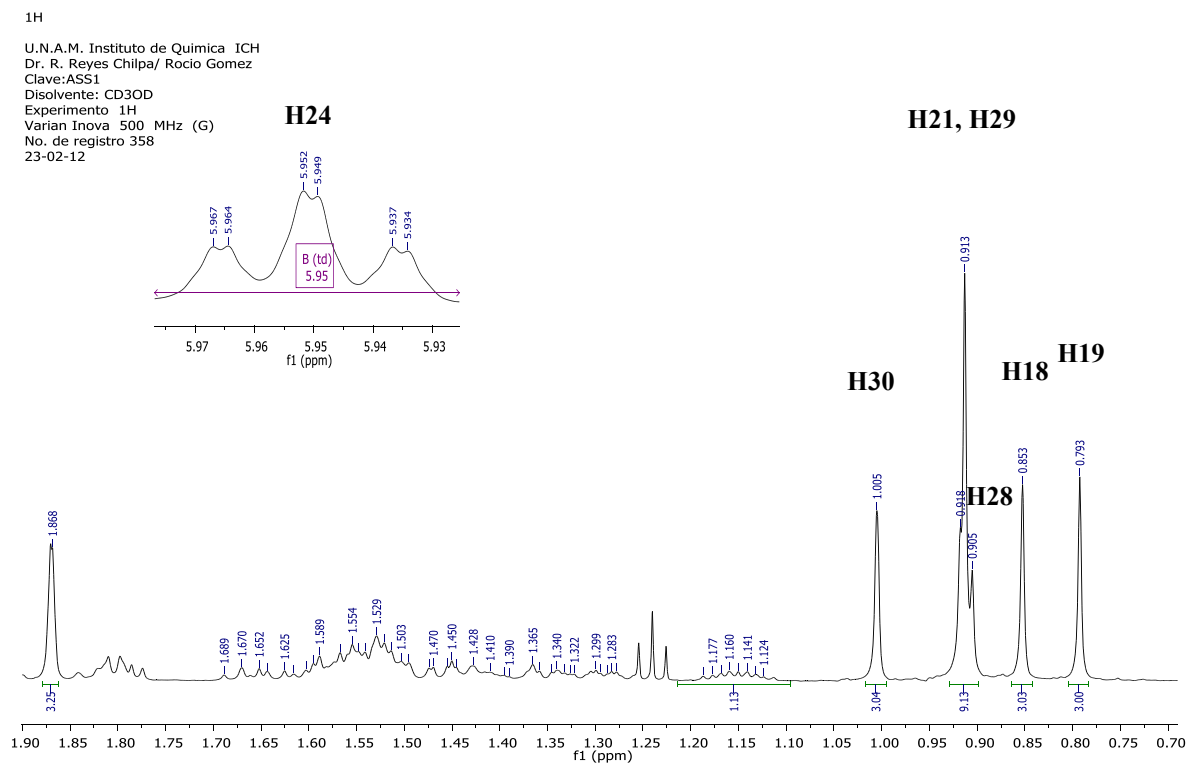


Figura 15. Espectro de $^1\text{HRMN}$ del ácido 3β -hidroximasticadienónico.

Por otra parte en el espectro de infrarrojo (IR, KBr/pastilla) se observa una banda de absorción en 3438 cm^{-1} característica de un grupo OH, en 2948 cm^{-1} para tensión C-H alifático, 1696 cm^{-1} para un carbonilo de ácido carboxílico, en 1642 cm^{-1} para enlaces C=C y una banda en 1238 cm^{-1} para C-O (figura 16).

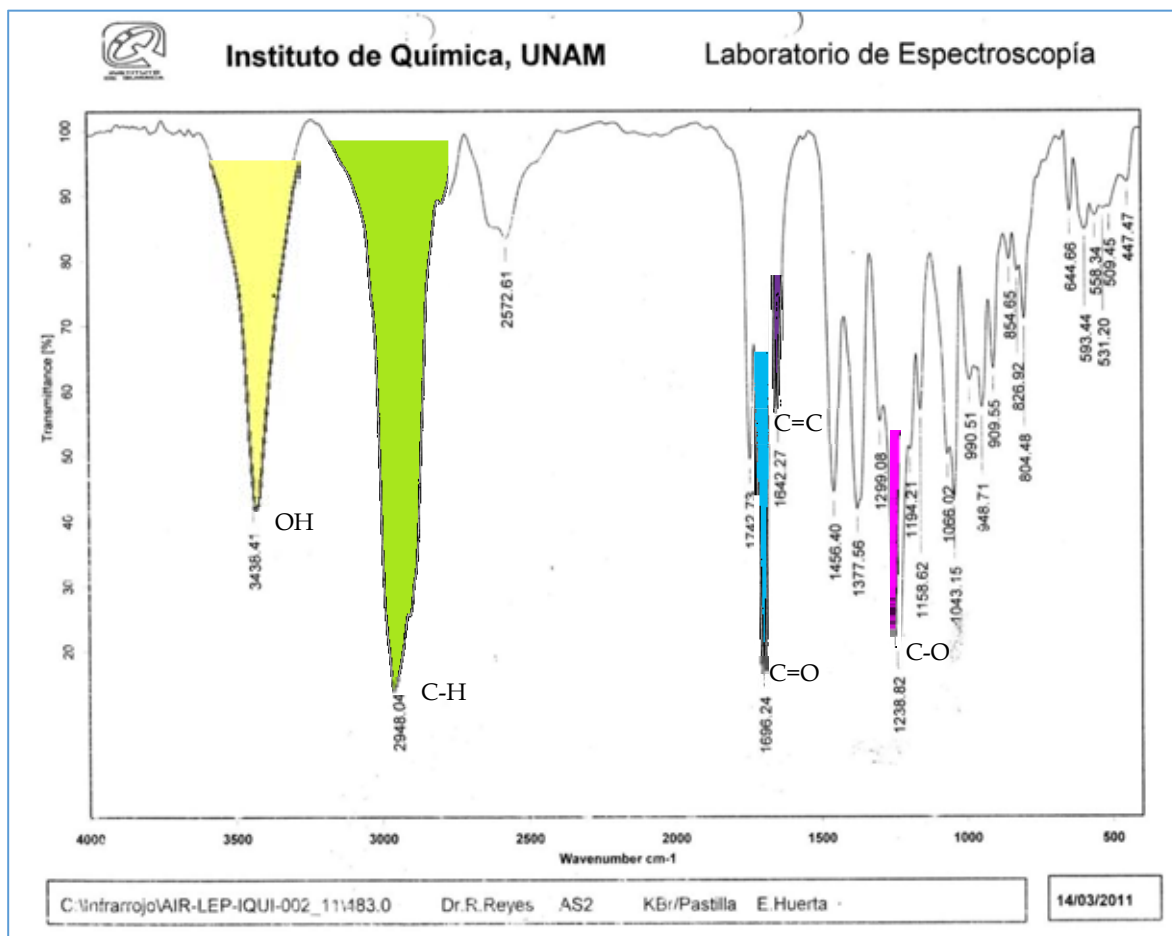


Figura 16. Espectro de infrarrojo (IR, KBr/pastilla) del ácido 3β -hidroximasticadienónico.

Los datos espectroscópicos (Tabla 11) fueron comparados con los reportados en la literatura, encontrándose que eran similares a los del ácido instipolinácico (3β -hidroximasticadienónico) con fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ previamente aislado de *Amphipterygium adstringens* (Dominguez et al, 1981), también llamado schinol por haberse obtenido de *Schinus terebinthifolius* (Jain et al, 1995) y de *Juliania adstringens* (Makino et al, 2003). Se determinó su estructura cristalina por difracción de Rayos X siendo similar a la reportada previamente para éste compuesto (Jain et al, 1995)

Tabla 11. Datos del RMN ^1H y ^{13}C del ácido Instipolinácico, δ en ppm, J en Hz

POSICION	$^1\text{H}^*(\text{J},\text{Hz})$	$^{13}\text{C}^{**}$	HMBC***
1	1.363 <i>m</i> 1.524 <i>m</i>	32.469	C(2)
2	1.562 <i>m</i> 1.939 <i>m</i>	26.449	
3	3.384 <i>m</i>	76.992	
4	-----	38.326	
5	1.791 <i>m</i>	45.706	C(4),C(9),C(19)
6	1.939 <i>m</i> 2.028 <i>m</i>	24.998	
7	5.265 (dd, $J=6.3,2.9$)	119.286	
8	-----	147.249	
9	2.375 <i>m</i>	49.951	
10	-----	36.826	
11	1.572 <i>m</i>	19.139	
12	1.451 <i>m</i> 1.650	35.760	
13	-----	44.657	
14	-----	52.376	
15	1.453 <i>m</i> 1.526 <i>m</i>	35.138	C(14)
16	1.281 <i>m</i> 1.982 <i>m</i>	29.218	
17	1.523 <i>m</i>	54.122	
18	0.853 <i>s</i>	22.370	C(12),C(13),C(14),C(17)
19	0.793 <i>s</i>	13.603	C(1),C(5),C(9),C(12)
20	1.414 <i>m</i>	37.321	
21	0.918 <i>s</i> ancho	18.831	
22	1.143 <i>m</i> 1.535 <i>m</i>	36.826	C(20),C(23)
23	2.381 <i>m</i> 2.500 <i>m</i>	27.593	
24	5.950(<i>td</i> , $J=5.95,1.5$)	144.151	
25	-----	128.464	
26	-----	171.835	
27	1.870 <i>s</i> ancho	21.043	C(24),C(25),C(26)
28	0.905 <i>s</i>	28.575	C(3),C(4),C(5),C(29)
29	0.913 <i>s</i> ancho	22.400	C(3),C(4),C(5),C(10),C(28)
30	1.005 <i>s</i>	27.893	C(8),C(13),C(14),C(15)

*500MHz/CD₃OD; **125MHz/CD₃OD;*** ^2J , ^3J & 4

7.2.2 Ácido masticadienónico

La identificación del ácido masticadienónico se realizó mediante difracción de rayos X (Figura 17) y a continuación se muestra la estructura proporcionada.

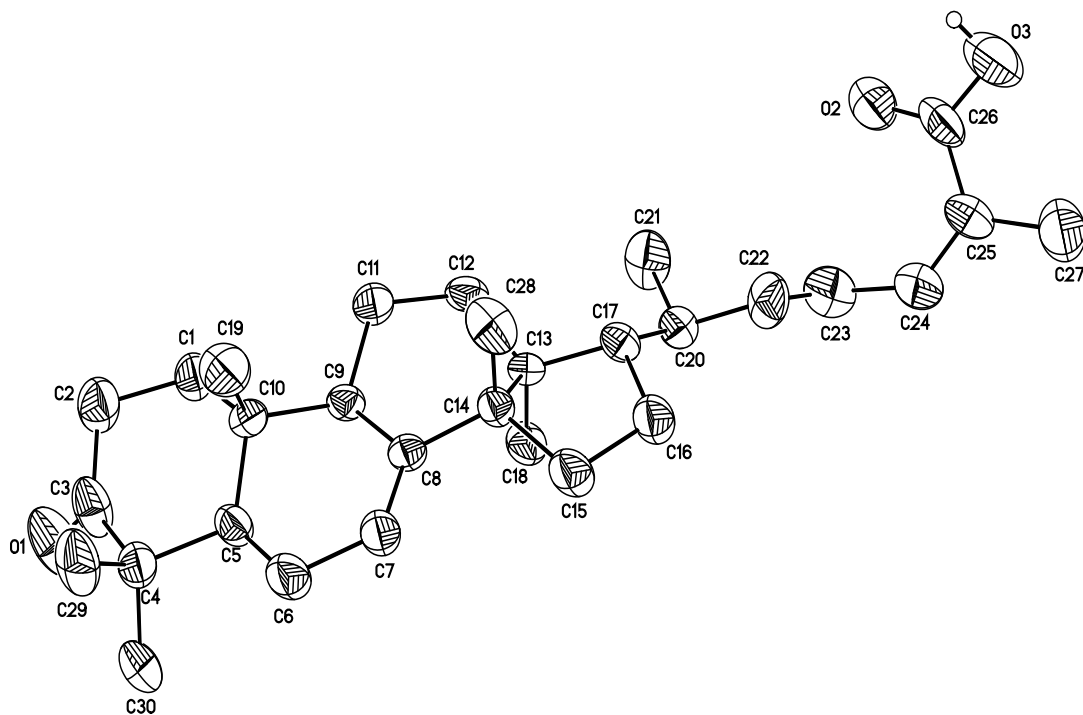


Figura 17. Estructura de rayos X del ácido masticadienónico (Jain *et al.*, 1995).

7.2.3 Ácido 3 α -hidroximasticadienónico

La identificación del ácido 3 α -hidroximasticadienónico se realizó mediante difracción de rayos X (Figura 18) y a continuación se muestra la estructura proporcionada.

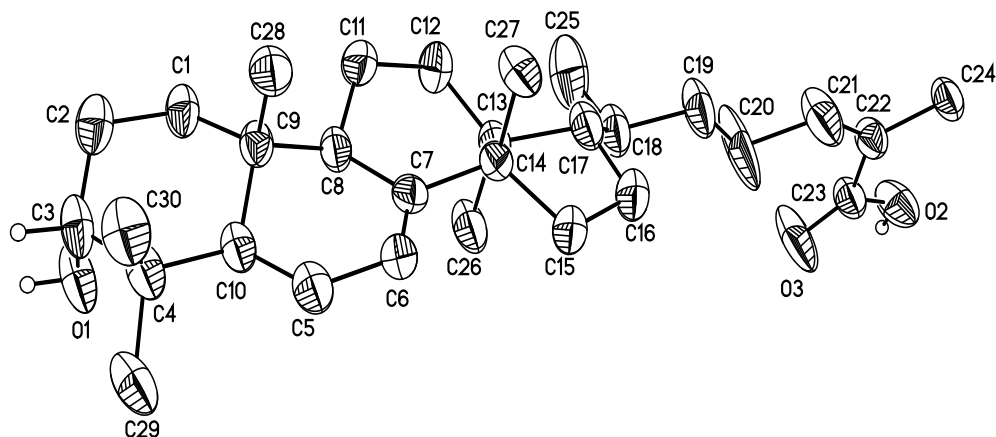


Figura 18. Estructura de rayos X del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (Jain *et al.*, 1995).

7.3 Análisis de extractos de Julianaceae y *C. brasiliense* por HPLC

Todos los perfiles de HPLC de los extractos (corteza) de Julianaceae (Figura 19) con excepción de *A. glaucum* del sexo femenino, muestran similitud cromatográfica. Estos presentaron ácido masticadienónico (2) y la mezcla de 3 α - y 3 β -hidroximasticadienónico (3+4). Por otra parte, ninguna de nuestras muestras botánicas mostró la presencia de ácido oleanólico (1), es interesante hacer notar que este compuesto fue aislado y cuantificado con anterioridad por otros investigadores (Navarrete *et al.*, 2006) de extractos de corteza de *A. simplicifolium*.

El ácido oleanólico (1) presentó un tiempo de retención (Tr) de 8.06 min, el ácido masticadienónico (2) de 17.29 y los ácidos 3 α (3) y 3 β -OH masticadienónico (4) de 20.91 y 20.76 min respectivamente, tomando en cuenta los tiempos de retención de los isómeros estructurales 3 α y 3 β -OH masticadienónico no fue posible cuantificarlos por separado, por lo que solo se cuantificó la mezcla de ellos.

Respecto a la influencia del sexo en la producción de metabolitos secundarios, nuestros resultados muestran un alto contenido de la mezcla de isómeros 3 α - y 3 β -hidroximasticadienónico (3+4) en especímenes del sexo masculino; estos datos se oponen a lo previamente publicado (Olivera Ortega *et al.*, 1999) que sugieren una mayor producción de estos metabolitos en especímenes del sexo femenino.

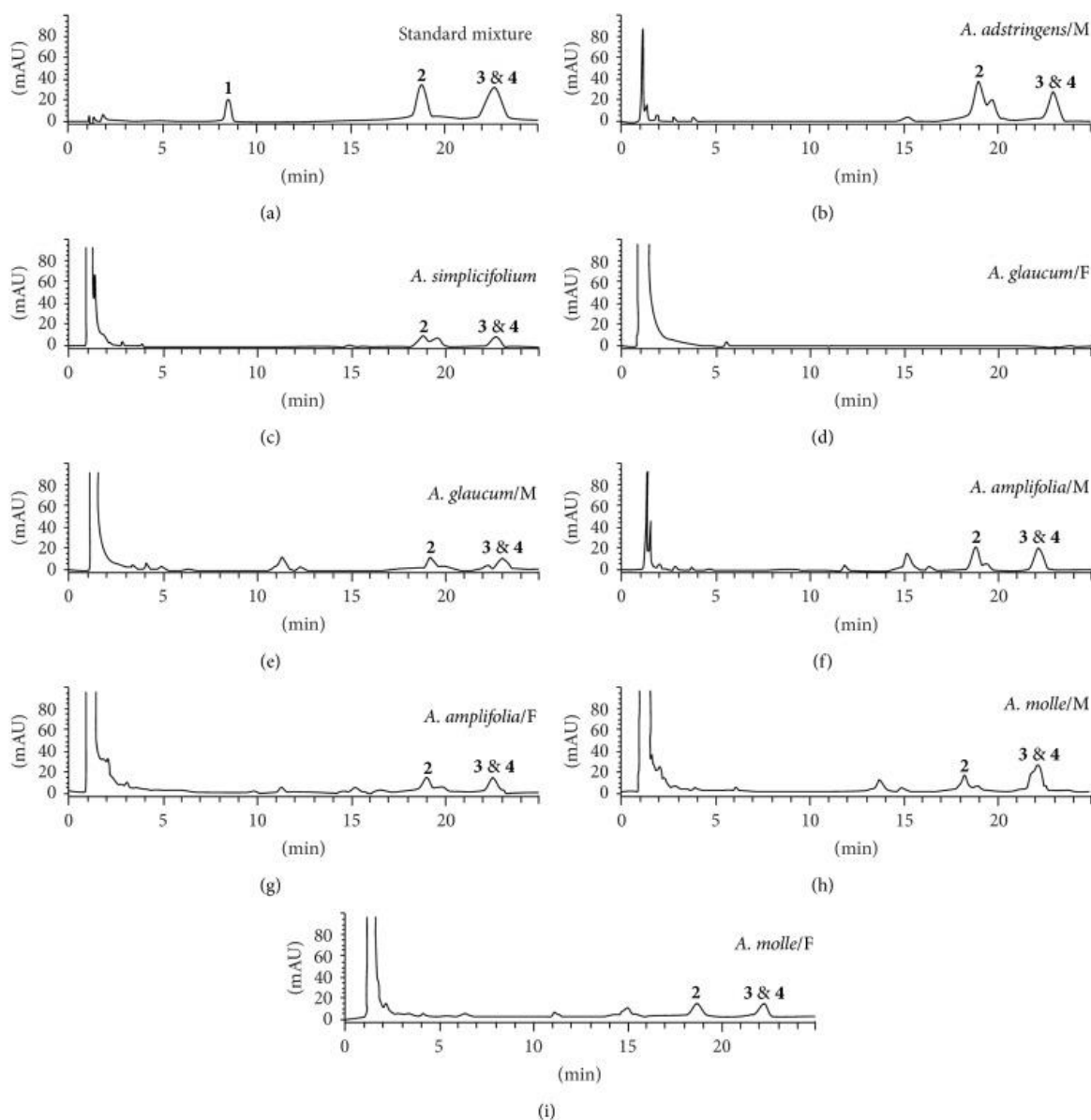


Figura 19. Cromatogramas de HPLC de los extractos de Julianaceae.

Los estándares de *C. brasiliense* presentaron tiempos de retención de 18.64 min para el Ac. Apetálico (5), 23.34 min para calanólido B (6), 25.30 min para soulatrólido y 43.81 para mammea A/BA. El perfil comatográfico de *C. brasiliense* (Figura 16) muestra como componente mayoritario al soulatrólido (6.8 %), seguido del calanólido B (2.47 %) y como componente minoritario el ácido apetálico (< 0.01 %) (Figura 20).

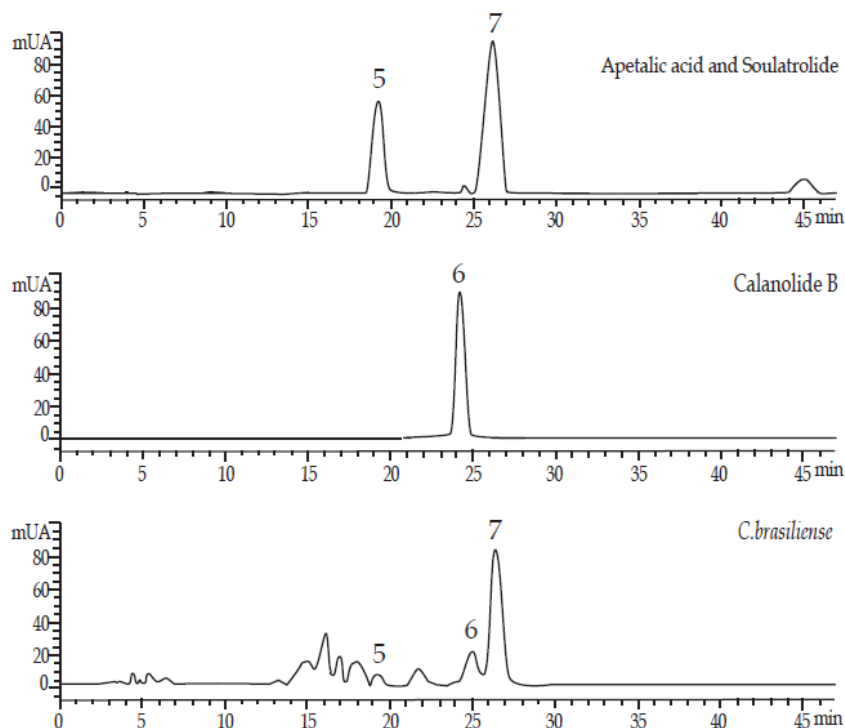


Figura 20. Perfil comatográfico del extracto de *C. brasiliense*.

Los porcentajes de los compuestos en los extractos (Tabla 12) se calcularon por la interpolación de la ecuación de regresión lineal de las rectas patrón que se obtuvieron para cada estándar: $y = 3.7085x - 17.043$, $R^2 = 0.9987$ para el ácido oleanólico, $y = 10.766x + 4.3811$, $R^2 = 0.9990$ para el ácido masticadienónico, $y = 11.466x + 22.14$, $R^2 = 0.9993$ para la mezcla de isómeros, $y = 19.547x + 135.64$, $R^2 = 0.9993$ para el ácido apetálico, $y = 27.786x + 13.369$, $R^2 = 0.9995$ para calanólido B, mientras que para el soulatrólido fue $y = 35.075x + 209.85$, $R^2 = 0.9934$.

Tabla 12. Cuantificación de compuestos en las especies de Julianaceae. n/d no detectado, % por cada gramo de extracto.

Extractos	% compuestos		
	1*	2**	3 & 4
<i>A. amplifolia</i> /M	---n/d---	8.71	8.77
<i>A. amplifolia</i> /F	---n/d---	4.17	4.42
<i>A. molle</i> /M	---n/d---	4.73	8.53
<i>A. molle</i> /F	---n/d---	3.46	3.35
<i>A. glaucum</i> /M	---n/d---	0.15	3.63
<i>A. glaucum</i> /F	---n/d---	---n/d---	---n/d---
<i>A. adstringens</i> /M	---n/d---	14.23	10.91
<i>A. simplicifolium</i>	---n/d---	4.15	3.35

8 DISCUSION

La aparición de la tuberculosis como una enfermedad re-emergente y el incremento de la enfermedad activa en los casos de VIH hacen necesario la búsqueda de moléculas que sirvan como prototipos de nuevos fármacos que disminuyan los tiempos y riesgos de las actuales terapias, además de disminuir el incremento de cepas resistentes para ambos patógenos. Adicionalmente, dichos patógenos podrían combatirse mediante el uso de extractos vegetales estandarizados química y farmacológicamente, bajo el concepto de fitomedicamentos.

Un factor preocupante en la quimioterapia de la confección TB-VIH es la ingesta de un número elevado de píldoras por día (32 aproximadamente) que trae consigo diferentes cambios como la intolerancia y contraindicaciones por el uso combinado de fármacos, efectos adversos severos y el abandono o bajo apego al régimen de medicación; en este contexto se requieren nuevos fármacos de ser posible activos para ambos blancos TB/VIH. En las últimas tres décadas se han aprobado por la FDA 36 medicamentos para el tratamiento del VIH, mientras que para la TB solo fueron aprobada (2012) la bedaquilina y rifamicinas de corto espectro. Por esta razón es deseable contar con nuevos fármacos que podrían desarrollarse a partir de sustancias naturales de origen vegetal y del conocimiento de las plantas medicinales.

A la fecha se ha descrito la actividad *in vitro* de 114 compuestos naturales contra *M. tuberculosis* (Copp and Pearce, 2007) y 120 sustancias (Huerta-Reyes et al., 2004b) contra el VIH, la mayoría extraídos de las plantas; sin embargo solo unos cuantos se han examinados para ambas propiedades. Por otra parte, en la Medicina Tradicional Mexicana se ha descrito el uso de 167 plantas en el tratamiento de la tisis (nombre designado a la tuberculosis en la antigüedad) y otras enfermedades de vías respiratorias, de estas solo 84 especies tienen estudios *in vitro* contra diferentes cepas de *M. tuberculosis*.

En un estudio previo se comunicó que un extracto orgánico (diclorometano-metanol) de la corteza de *Amphipterygium adstringens* tenía actividad prometedora contra *M. tuberculosis* (Rivero-Cruz et al., 2005). Nuestros resultados confirman este hallazgo y se extienden a las cinco especies de este género presente en México, los cuales son muy potentes (> 84 %) contra la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Adicionalmente, logramos identificar que los extractos de hojas inhiben el crecimiento de este patógeno en un porcentaje similar al obtenido con los extractos de corteza (> 89 %); no encontramos diferencias con relación a los porcentajes de inhibición respecto al tipo de extracto (hoja o corteza) y el sexo del árbol. A la fecha solo se ha reportado la presencia del ácido cuachálalico en las hojas de estas especies (Jain et al., 1995), dicho compuesto es un isómero estructural de ácido 3 β -hidroximasticadienónico. Lo anterior nos hace suponer que un grupo de isómeros estructurales de este ácido presentes en estas plantas podrían ser responsable de la actividad biológica.

Respecto a la inhibición la RT del VIH-1 de los extractos de corteza y hojas de Julianaceae su actividad biológica fue menor al 49 %; sin embargo, las fracciones de AcOEt-MeOH 1:1, 25:75 y metanol inhibieron la actividad enzimática en un porcentaje mayor al 64% siendo este valor más alto que para el extracto total. Se ha reportado que los extractos polares pueden contener taninos y otros polifenoles capaces de inhibir la transcriptasa reversa (Tan et al., 1991), ADN topoisomerasa I y II (Kashiwada et al., 1993) y el acoplamiento de la proteína gp120 con los receptores CD4 de las células T (Collins et al., 1997). Por lo que la alta afinidad de taninos y polifenoles presentes en las fracciones de *A. simplicifolium* pueden ser la causa de la actividad anti RT.

Los perfiles cromatográficos de los extractos de corteza de Julianaceae mostraron que no existe correlación con el contenido de los triterpenos, como los ácidos masticadienónico, 3 α y 3 β -hidroximasticadienónico, con la actividad anti-micobacteriana y anti-RT-VIH, por lo que consideramos que investigaciones futuras son necesarias para determinar si la actividad anti-micobacteriana puede atribuirse a la sinergia de los compuestos aislados, o a compuestos no identificados. Por otra parte, nuestros resultados difieren de lo reportado en la literatura (Navarrete *et al.*, 2006) al no detectar la presencia del ácido oleanólico en nuestros extractos. En cuanto al contenido de los triterpenos relacionados al sexo de los árboles, se ha descrito que los árboles femeninos de *A. adstringens* presentan mayor contenido de ácidos masticadienónico, 3 α - y 3 β -hidroximasticadienónico (Olivera-Ortega *et al.*, 1999); sin embargo, en nuestro caso esto ocurrió con los ejemplares masculinos. En síntesis, nuestros resultados indican que las especies *Amphipterygium* son una fuente de compuestos anti-tuberculosos potentes con baja toxicidad a los macrófagos; esto último coincide con lo que diversos autores han publicado para *A. adstringens* (Arrieta *et al.*, 2003).

Con relación a las especies de Clusiaceae, un estudio bioprospectivo previo indicó que los extractos de las cinco especies de Clusiaceae estudiadas en nuestro trabajo tienen alta actividad inhibitoria (>75 %) de la RT-VIH (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a), nuestros resultados difieren pues la actividad fue menor (>27.3 y < 67.6 %), esta última cifra solo para el caso de *C. brasiliense*. Esto podría deberse a diferencias en el contenido de metabolitos secundarios debido a que se colectaron en localidades y épocas diferentes.

En el caso de *C. brasiliense*, como se indicó en los antecedentes, las dipiranocoumarinas tetracíclicas: inofilums y calanólidos presentes en esta especie son potentes inhibidores de la actividad enzimática de RT VIH-1 (Kashman *et al.*, 1992). En este trabajo logramos identificar y determinar el contenido de calanólido B y soulatrólido en el extracto de *C. brasiliense*. A diferencia otras colectas antes estudiadas, la muestra aquí trabajada presentó como componente mayoritario el soulatrólido y componente minoritario el ácido apetalico. Este resultado contrasta con los previamente publicado (Huerta-Reyes *et al.*, 2004b) y señala la importancia de seleccionar germoplasma para la extracción de estos compuestos.

Por otra parte, reportamos por primera vez que las especies de Clusiaceae inhiben de manera significativa el crecimiento de *M. tuberculosis* (>58.3 %). En particular, el extracto orgánico de las hojas de *C. brasiliense*, podría ser adecuado para el desarrollo de un fitofármaco debido a su contenido de moléculas activas (calanólidos A, B, soulatrólido y ácido apetalico) para ambos blancos. Con base en la CI_{50} del ácido apetalico y soulatrólido estos compuestos son 20 y 100 veces más potentes, respectivamente, que el fármaco de referencia rifampicina. Cabe señalar que estos compuestos del extracto de *C. brasiliense* no son tóxicos a macrófagos. Nuestros resultados también evidencian que la biodiversidad es una fuente útil y valiosa para la búsqueda de moléculas con actividad contra *M. tuberculosis* y el VIH.

9 CONCLUSIONES

- ▶ El extracto de la corteza de *A. simplicifolium* presentó baja citotoxicidad (< 10 %), alta actividad antifúngica (95 %) y moderada actividad anti-RT VIH (40%) e inocuidad en ratones (p.o), estas características sugieren que puede considerarse candidato para desarrollar un fitofármaco.
- ▶ Los ácidos 3β-hidroximasticadienónico, oleanólico y apetalico tienen CC₅₀ mayores a 74 µg/mL sobre macrófagos THP1 y CI₅₀ menores a 2.02 µg/mL sobre la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, estos datos sugieren continuar con estudios para corroborar su actividad intracelular.
- ▶ La CI₅₀ del soulatrólido (5×10^{-3} µg/mL) y ácido apetalico (2.4×10^{-2} µg/mL) son menores que la rifampicina (CI₅₀=0.50 µg/mL), es decir son 20 y 100 veces más potentes, respectivamente, que el fármaco de referencia rifampicina. El soulatrólido y el ácido apetalico no son tóxicos a macrófagos por lo cual podría considerarse como posibles agentes antituberculosos.
- ▶ El contenido de Ácidos masticadienónico y 3β-hidroximasticadienónico es superior en todas especies del sexo masculino, sin embargo destaca que la presencia de estos compuestos es mayor del 10.9 % en el extracto de *A. adstringens* lo cual sugieren que esta especie es mejor para la extracción de estos estándares.
- ▶ Con excepción del extracto de corteza del sexo femenino de *A. glaucum* todas las especies de Julianaceae presentan un perfil cromatográfico similar, la ausencia de estos compuestos sugiere que la actividad anti-micobacteriana en esta especie se debe a compuestos distintos

REFERENCIAS

- Acevedo HR, Rojas MD, Arceo SD, Soto Hernandez M, Martinez Vazquez M, Terrazas T, del Toro GV. (2006). Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res*, **609**: 43-46.
- Adamson CS, Salzwedel K, Freed EO. (2009). Virus maturation as a new HIV-1 therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*, **13**: 895-908.
- Arrieta J, Benitez J, Flores E, Castillo C, Navarrete A. (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med*, **69**: 905-909.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, **17**: 657-700.
- Butler MS. (2008). Natural Products to Drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep*, **25**: 475-516.
- Castillo-Juarez I, Garcia-Contreras R, Velazquez-Guadarrama N, Soto-Hernandez M, Martinez-Vazquez M. (2013). *Amphipterygium adstringens* anacardic acid mixture inhibits quorum sensing-controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Med Res*, **44**: 488-494.
- Castillo-Juarez I, Rivero-Cruz F, Celis H, Romero I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J Ethnopharmacol*, **114**: 72-77.
- CENSIDA. (2014). La epidemia del VIH y el SIDA en México. Retrieved from http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/L_E_V_S.pdf.
- Collins L, Franzblau SG. (1997). Microplate lamar Blue Assay versus Bactec 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**: 1004-1009.

- Collins RA, Ng TB, Fong WP, Wan CC, Yeung HW. (1997). A comparison of human immunodeficiency virus type 1 inhibition by partially purified aqueous extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci* **60**: 345-351.
- CONABIO (2014). Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. *Calophyllum brasiliense* Cambess (online). http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/24-gutti1m.pdf.
- Connell N, Nikaido H. (1994). Membrane permeability and transport in *Mycobacterium tuberculosis*. in Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. R. BB (ed),^(eds).C American Society of Microbiology: Washington, D.C.; 333-352.
- Copp BR, Pearce AN. (2007). Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Prod Rep*, **24**: 278-297.
- Creagh T, Ruckle JL, Tolbert DT, Giltner J, Eiznhamer DA, Dutta B, Flavin MT, Xu ZQ. (2001). 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.
- Cuevas-Figueroa XM. (2005). A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianaceae). *IBUGANA*, **13**, 27-47.
- Chavez IO, Apan TR, Martinez-Vazquez M. (2005). Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *J Pharm Pharmacol*, **57**: 1087-1091.
- Chung GA, Aktar Z, Jackson S, Duncan K. (1995). High-throughput screen for detecting antimycobacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**: 2235-2238.
- da Silva KL, dos Santos AR, Mattos PE, Yunes RA, Delle-Monache F, Cechinel-Filho V. (2001). Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Therapie*, **56**: 431-434.
- Deffur A, Mulder NJ, Wilkinson RJ. (2013). Co-infection with *Mycobacterium tuberculosis* and Human Immunodeficiency Virus: an overview and motivation for systems approaches. *Pathogens and Disease*, **69**: 101-113.

- FDA (2015). Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection (Publication., from FDA: <http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm>)
- Dismuke DJ, Aiken C. (2006). Evidence for a functional link between uncoating of the Human Immunodeficiency Virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex. *J Virol*, **80**: 3712-3720.
- Doms RW. (2000). Beyond Receptor Expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection. *Virology*, **276**: 229-237.
- Driver CR, Munsiff SS, Li J, Kundamal N, Osahan SS. (2001). Relapse in persons treated for drug-susceptible Tuberculosis in a population with High coinfection with Human Immunodeficiency Virus in New York City. *Clin Infect Dis*, **33**: 1762-1769.
- Eiznhamer DA, Creagh T, Ruckle JL, Tolbert DT, Giltner J, Dutta B, Flavin MT, Jenta T, Xu ZQ. (2002). Safety and pharmacokinetic profile of multiple escalating doses of (+)-calanolide A, a naturally occurring nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy HIV-negative volunteers. *HIV Clin Trials*, **3**: 435-450.
- Engohang-Ndong J. (2012). Antimycobacterial drugs currently in phase II clinical trials and preclinical phase for Tuberculosis treatment. *Expert Opin Investig Drugs*, **21**: 1789-1800.
- Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH. (1998). Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. *J Clin Microbiol*, **36**: 362-366.
- García-Zebadúa JC, Reyes-Chilpa R, Huerta-Reyes M, Castillo-Arellano JI, Santillán-Hernández S, Vásquez-Astudillo B, Mendoza-Espinoza JA. (2014). El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*: una revisión botánica, química y farmacológica. *Vitae*, **21**(2): 126-145.
- García A, Bocanegra-García V, Palma-Nicolas JP, Rivera G. (2012). Recent advances in antitubercular natural products. *Eur J Med Chem*, **49**: 1-23.
- García Zebadua JC. (2012). Caracterización Química y Actividad Antiviral (VIH-1) de *Calophyllum brasiliense*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- García Zebadúa JC, Magos Guerrero GA, Mumbrú Massip M, Estrada Muñoz E, Contreras Barrios MA, Huerta Reyes M, Campos Lara MG, Jiménez Estrada M, Ricardo.

- RC. (2011). Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, Mexico. *Fitoterapia*, **82**: 1027-1034.
- Gautam R, Saklani A, Jachak SM. (2007). Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *J Ethnopharmacol*, **110**: 200-234.
- Gómez-Cansino R. (2009). Evaluación de la actividad antifimica de los extractos orgánicos de Cuachalalate (*Amphipterygium Adstringens* Shide Ex Schlecht) en cinco cepas del complejo *Mycobacterium tubersulosis*". Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca de Juárez, Oax.
- Gómez-Flores R, Arzate-Quintana C, Quintanilla-Licea., Tamez-Guerra P, Monreal-Cuevas E, C. R-P. (2008). Antimicrobial activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) leaf extracts and active fractions against *Mycobacterium tuberculosis*. *American-Eurasian Journal of Scientific Research.*, **3**: 188-194.
- Grinsztejn B, Hosseinipour MC, Ribaud HJ, Swindells S, Eron J, Chen YQ, Wang L, Ou S-S, Anderson M, McCauley M, Gamble T, Kumarasamy N, Hakim JG, Kumwenda J, Pilotto JHS, Godbole SV, Chariyalertsak S, de Melo MG, Mayer KH, Eshleman SH, Piwowar-Manning E, Makhema J, Mills LA, Panchia R, Sanne I, Gallant J, Hoffman I, Taha TE, Nielsen-Saines K, Celentano D, Essex M, Havlir D, Cohen MS. (2014). Effects of early versus delayed initiation of antiretroviral treatment on clinical outcomes of HIV-1 infection: results from the phase 3 Hptn 052 Randomised Controlled Trial. *The Lancet Infectious Diseases*, **14**: 281-290.
- Group. TAP. (2009). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: apg III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161**: 105-121.
- Guaraldi G, Murri R, Orlando G, Orlandi E, Sterrantino G, Borderi M, Grosso C, Cattelan AM, Nardini G, Beghetto B, Antinori A, Esposito R, Wu AW. (2003). Morphologic alterations in HIV-Infected people with lipodystrophy are associated with good adherence to HAART. *HIV Clin Trials*, **4**: 99-106.
- Guide for the care and use of laboratory animals (2011). National Academy of Sciences. 8a. Ed. Printed in USA. Pp 220.

- Hernández F, Ochoterena I, Rojo J, Biología. UNAM. (1946). Historia de las Plantas de Nueva España. Imprenta Universitaria: México.
- Huerta-Reyes M, Basualdo MdC, Lozada L, Jimenez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R. (2004a). HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. *Biol Pharm Bull*, **27**: 916-920.
- Huerta-Reyes M, Basualdo M del C, Abe F, Jimenez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R. (2004b). HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biol Pharm Bull*, **27**: 1471-1475.
- Hulme AE, Perez O, Hope TJ. (2011). Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**: 9975-9980.
- Hupfeld J, Efferth T. (2009). Review. drug resistance of Human Immunodeficiency Virus and overcoming it by natural products. *In Vivo*, **23**: 1-6.
- INI. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana 1ra ed. Instituto Nacional Indigenista: México.
- Itokawa H, Totsuka N, Nakahara K, Takeya K, Lepoittevin JP, Asakawa Y. (1987). Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **35**: 3016-3020.
- Jain MK, Yu BZ, Rogers JM, Smith AE, Boger ET, Ostrander RL, Rheingold AL. (1995). Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, **39**: 537-547.
- Jimenez-Arellanes A, Meckes M, Torres J, Luna-Herrera J. (2007). Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). *J. of Ethnopharmacol*, **111**:202-205.
- Jiménez Arellanes MA, Cornejo Garrido J, León Díaz R. (2010). Las plantas medicinales mexicanas como fuente de compuestos antimicobacterianos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **41**: 22-29.
- Kashiwada Y, Nonaka G, Nishioka I, Lee KJ, Bori I, Fukushima Y, Bastow KF, Lee KH, (1993). Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II in vitro. *J Pharm Sci* **82**:487-492.

- Kashman Y, Gustafson KR, Fuller RW, Cardellina JH, 2nd, McMahon JB, Currens MJ, Buckheit RW, Jr., Hughes SH, Cragg GM, Boyd MR. (1992). The calanolides, a novel HIV-Inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *J Med Chem*, **35**: 2735-2743.
- Kelly DM, ten Bokum AM, O'Leary SM, O'Sullivan MP, Keane J. (2008). Bystander macrophage apoptosis after *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra infection. *Infect Immun*, **76**: 351-360.
- Lorke D.(1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch Toxicol* 54: 275-287.
- Makino M, Motegi T, Fujimoto Y. (2004). Tirucallane-type triterpenes from *Juliania Adstringens*. *Phytochemistry*, **65**: 891-896.
- Mata R, Calzada F, Navarrete A, del Rio F, Delgado G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *J Ethnopharmacol*, **34**: 147-154.
- Matsuo Y, Watanabe K, Mimaki Y. (2009). Triterpene glycosides from the underground parts of *Calophyllum Thalictroides*. *J Nat Prod*, **72**: 1155-1160.
- Mathee G, Wright AD, Konig GM. (1999). HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta Med*, **65**: 493-506.
- Navarrete A, Avula B, Joshi VC, Ji X, Hersh P, Khan IA. (2006). Quantitative determination of triterpenes from *Amphipterygium adstringens* by Liquid Chromatography and Thin-Layer Chromatography and morphological analysis of Cuachalalate Preparations. *J AOAC Int*, **89**: 1-7.
- Navarrete A, Oliva I, Sanchez-Mendoza ME, Arrieta J, Cruz-Antonio L, Castaneda-Hernandez G. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J Pharm Pharmacol*, **57**: 1629-1636.
- Negi AS, Kumar JK, Luqman S, Saikia D, Khanuja SP. (2010). Antitubercular potential of plants: a brief account of some important molecules. *Med Res Rev*, **30**: 603-645.
- Newton SM, Lau C, Wright CW. (2000). A review of antimycobacterial natural products. *Phytother Res*, **14**: 303-322.

- Ng TB, Huang B, Fong WP, Yeung HW. (1997). Anti-Human Immunodeficiency Virus (Anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sci*, **61**: 933-949.
- Nisole S, Saib A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*, **1**: 9.
- NOM-62-ZOO-1999. Secretarías de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Publicado en: Diario Oficial de la Federación, 6 de Diciembre de 1999.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, **267**: 5421-5426.
- Olivera-Ortega AG, Soto-Hernandez M, Martinez-Vazquez M, Terrazas-Salgado T, Solares- Arenas F. (1999). Phytochemical study of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede Ex Schlecht). *J Ethnopharmacol*, **68**: 109-113.
- OPS. (2010). Coinfección TB/VIH: Guía Clínica. Organización Panamericana de la Salud: Washington, D. C.
- Orme I, Program. TDS. (2001). Search for new drugs for treatment of Tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**: 1943-1946.
- Orme IM, McMurray DN, Belisle JT. (2001). Tuberculosis vaccine development: recent progress. *Trends Microbiol*, **9**: 115-118.
- Oviedo-Chavez I, Ramirez-Apan T, Soto-Hernandez M, Martinez-Vazquez M. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, **11**: 436-445.
- Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. (2002). Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**: 2720-2722.
- Pirrone V, Thakkar N, Jacobson JM, Wigdahl B, Krebs FC. (2011). Combinatorial approaches to the prevention and treatment of HIV-1 infection. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**: 1831-1842.

- Pozniak AL, Miller R, Ormerod LP. (1999). The treatment of Tuberculosis in HIV-infected persons. *AIDS*, **13**: 435-445.
- Primm T, Franzblau S. (2007). Recent advances in methodologies for the discovery of anti-mycobacterial drugs. *Current Bioactive Compounds*, **3**: 201-208.
- Rivero-Cruz I, Acevedo L, Guerrero JA, Martinez S, Bye R, Pereda-Miranda R, Franzblau S, Timmermann BN, Mata R. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican Medicinal Plants. *J Pharm Pharmacol*, **57**: 1117-1126.
- Rodríguez ME, Cardozo AE, Krauczuk ER, Fontana JL, Iriart D. (2009). *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae): nuevo registro para la flora de la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, **44**: 361-366.
- Rosas-Acevedo H, Terrazas T, Gonzalez-Trujano ME, Guzman Y, Soto-Hernandez M. (2011). Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. *J Ethnopharmacol*, **134**: 67-73.
- Schwander S, Rusch-Gerdes S, Mateega A, Lutalo T, Tugume S, Kityo C, Rubaramira R, Mugenyi P, Okwera A, Mugerwa R. (1995). A pilot study of antituberculosis combinations comparing rifabutin with rifampicin in the treatment of HIV-1 associated Tuberculosis. A single-blind randomized evaluation in Ugandan patients with HIV-1 infection and pulmonary Tuberculosis. *Tuber Lung Dis*, **76**: 210-218.
- Su WJ. (2008). Extensively drug-resistant Tuberculosis (XDR-TB) raises challenges in TB control in Taiwan. *J Formos Med Assoc*, **107**: 827-829.
- Tomioka H. (2008). Development of new antituberculous agents based on new drug targets and structure-activity relationship. *Expert Opin Drug Discov*, **3**: 21-49.
- Tomioka H. (2014). Editorial: current status and perspective on drug targets in Tubercle bacilli and drug design of antituberculous agents based on structure-activity relationship. *Curr Pharm Des*, **20**: 4305-4306.
- Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. (2013). Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res Int*, **2013**: 963248.
- Vlietinck AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA. (1998). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. *Planta Med*, **64**: 97-109.

- Waheed AA, Freed EO. (2012). HIV Type 1 Gag as a target for antiviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **28**: 54-75.
- Weiss RA. (2001). Gulliver's Travels in HIVland. *Nature*, **410**: 963-967.
- WHO. (2014). Global Tuberculosis Report World Health Organization: Geneva, Switzerland.
- Xu ZQ, Barrow WW, Suling WJ, Westbrook L, Barrow E, Lin YM, Flavin MT. (2004). Anti-HIV natural product (+)-calanolide A is active against both drug-susceptible and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem*, **12**: 1199-1207.
- Xu ZQ, Hollingshead MG, Borgel S, Elder C, Khilevich A, Flavin MT. (1999). In vivo anti-HIV activity of (+)-calanolide A in the hollow fiber mouse model. *Bioorg Med Chem Lett*, **9**: 133-138.
- Zager EM, McNerney R. (2008). Multidrug-Resistant Tuberculosis. *BMC Infect Dis*, **8**: 10.
- Zumla AI, Gillespie SH, Hoelscher M, Philips PP, Cole ST, Abubakar I, McHugh TD, Schito M, Maeurer M, Nunn AJ. (2014). New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis*, **14**: 327-340.
- Zumla AI, Schito M, Maeurer M. (2014). Advancing the portfolio of Tuberculosis diagnostics, drugs, biomarkers, and vaccines. *Lancet Infect Dis*, **14**: 267-269.

ANEXOS

PROTOCOLO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ANTI-RT DE VIH-1 CON EL KIT CAVENDISH.

1. Disolver la muestra en DMSO (Stock).
 - 500 μ L para extractos.
 - 250 μ L para compuestos.
2. Sonicar las muestras disueltas (Stocks).
3. Descongelar en agua caliente el frasco B del kit.
4. Juntar la solución **B** *Lenti Sample Dilution Buffer* (30mL) + agua destilada (30mL).
5. Agregar 135 μ L de esta solución **B** preparada (paso 4) a cada pozo de las 2 placas preparativas (si es para una sola concentración). En caso de la IC₅₀ se deben agregar 135 μ L al primer pozo (fila A) y 75 μ L en los pozos sucesivos (fila B-G).
6. Descongelar los frascos **C1** *Lenti Reconstitution Buffer* y **C2** *Lenti RT Reaction Components* del Kit.
7. Agregar de la muestra “Stock” 15 μ L en cada pozo si el experimento es a una sola concentración. Para la IC₅₀ transferir 75 μ L de los pozos A al B y 75 μ L del pozo B al C y así sucesivamente hasta el pozo G.
8. Preparación de la mezcla de reacción: transferir 2 mL de C2 a C1, agitar en vortex durante 10 s y regresar 200 μ L de la mezcla antes preparada a **C2** (*Lenti Reconstitution Buffer*) y agitar en vortex durante 5 segundos.
9. Sacar placas de poli A.
10. Adicionar 100 μ L de la mezcla C1+C2 preparada el paso 8 a cada uno de los pozos de las placas de poli A. *se debe tener mucho cuidado de no tocar el fondo y paredes de las placas.
11. Agregar 50 μ L de los pozos de las placas preparativas a las placas de poli A y cubrir con el plástico adhesivo.
12. Incubar 30 min. a 33°C.
13. Descongelar el frasco **D** *HIV-1 rRT Standard lenti* (liofilizado de RT).

14. Agregar 1.25ml de la solución **B** preparada en el paso 4 al frasco **D** y mezclar vigorosamente.
15. En un vaso de precipitado agregar 12 mL de la solución **B** preparada en el paso 4 y 1 mL de la solución **D** preparada en el paso 14.
16. Una vez transcurridos los 30 min de incubación de las placas de poli A, adicionar 50 μ L de la solución preparada en el paso 15 cada uno de los pozos omitiendo los pozos H8-H12.
17. En los pozos H8-H12 agregar 50 μ L de la solución **B** preparada en el paso 4 y cubrir con el plástico adhesivo.
18. Incubar las placas por 3hrs. a 33°C con agitación suave.
19. Descongelar el frasco E.
20. Preparar la solución de lavado: agregar 30ml de Triton X-100 en 4L de agua destilada y agitar durante 10 min.
21. Preparar Triton X-100 al 1 % (1mL/100 mL de agua destilada).
22. Adicionar al contenedor la solución de Triton X-100 (4 L) y 10 mL de la solución E al contenedor.
23. Fin de la reacción: después de 3 h de incubación lavar las placas de poli A 2 veces (en lavador automático 3mL por ciclo) después de lavadas voltearlas para secar el exceso de humedad.
24. Reconstituir el anticuerpo: tomar los dos frascos con anticuerpo (frasco O del Kit) y adicionarles 12 mL de la solución de Triton X-100 al 1% preparada en el paso 21 y mezclar de 10 a 15 seg. en vortex.
25. Adicionar 100 μ L de la solución O preparada en el paso 24 a cada uno de los pozos de las placas y cubrir nuevamente con el plástico adhesivo.
26. Incubar las placas durante 90 min a 33°C en agitación suave constante.
27. Preparar el sustrato para la fosfatasa alcalina: adicionar P1 (tabletas) a P2 amortiguador. Agitar 20 min y mantener en obscuridad a temperatura ambiente.
28. Después de 90 min de incubación, remover el exceso de anticuerpo y lavar 4 veces (ciclos de lavado de 2 mL) y eliminar el exceso de la solución de lavado.

29. Adicionar 200 μ l (100 - 125 μ L en el nuevo Kit) de la solución P1 +P2 preparada en el paso 27 a todos los pozos de las placas. Remover burbujas y cubrir con el plástico adhesivo.
30. Incubar a temperatura ambiente bajo obscuridad y agitación suave constante.

Hacer las lecturas a 405 nm, a los 30 min. Luego a cada 15 o 20 min. Hasta que la lectura de H1-H7 de 75% del valor máximo de actividad aproximadamente (en el nuevo Kit establece 10-80% del lector de placas.).

PROTOCOLO DE SUSCEPTIBILIDAD MICOBACTERIANA (MABA)

Para el inóculo bacteriano

- 1) Las bacterias deben crecer en medio Middlebrock 7H9 enriquecido con ADC (fuente de enriquecimiento albumina, dextrosa y catalasa), en un matraz de nariz.
- 2) Para cuantificar el número de bacterias se mide el cultivo bacteriano (tres veces en un nefelometro) asegurando que la lectura del crecimiento corresponda a $0.2 \pm .01$ (tubo N° 1 de la escala de McFarland = 3×10^8 UFC).
- 3) Se realiza una dilución 1 en 7 = 50×10^6 UFC (se toma 1 mL de inóculo bacteriano y se agregan 6 mL de medio Middlebrock 7H9 en un tubo falcón de 50 mL).
- 4) Del inóculo del paso 3 se toma un mL y se lleva a 50 mL en medio Middlebrock 7H9 para obtener un inóculo de trabajo de 1×10^6 UFC.

Preparación de muestras (compuestos (50 μ M) y/o extractos (50 μ g/mL).

(Las actividades de los pasos 1-3 se realizan el día anterior del experimento)

- 1) Se pesa 1 mg del extracto a probar.
- 2) El extracto se diluye en 500 μ L de DMSO (se obtiene una solución stock de 2000 μ g/mL).
- 3) La solución preparada se filtra para eliminar impurezas en un filtro de pirinola con membrana de PTFE de 0.45 μ m y se conserva en viales estériles (preferentemente en campana de Flujo laminar).

(a partir del paso 4 las actividades se realizan en el BSL3)

- 4) La stock del paso 2 se diluye en medio Middlebrock 7H9/ ADC hasta obtener 1mL de una solución de trabajo de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (950 μL de medio + 50 μL de la stock). También se prepara una solución para el control de DMSO (950 μL de medio + 50 μL de DMSO).
- 5) Para evaluar sustancias de peso molecular conocido la concentración de trabajo final debe corresponder a 100 μM .

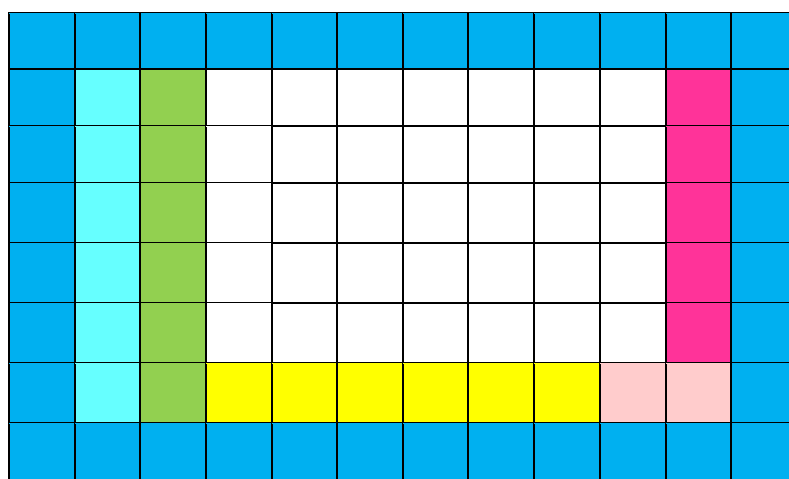
Preparación del fármaco de referencia (Rifampicina).







- 1) Pesar 1mg de Rifampicina.
- 2) Diluir la rifampicina en 250 μL de DMSO (se obtiene una solución stock de 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- 3) La solución preparada se filtra para eliminar impurezas en un filtro de pirinola con membrana de PTFE de 0.45 μm y se conserva en un vial estéril recubierto con papel aluminio. (preferentemente en campana de Flujo laminar).
- 4) Tomamos 100 μL de la solución stock de rifampicina y la diluimos en 900 μL de medio Middlebrock 7H9 (concentración final de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- 5) Finalmente para la solución de trabajo tomamos 20 μL de la solución preparada en el paso 4 y la diluimos en 980 μL de medio 7H9 (concentración final de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Preparación de la placa de 96 pozos.

- 1) Para la curva de calibración de Rifampicina se colocan 100 μL de medio de cultivo en los pozos 2B-2G, solo al primer pozo se adicionan 100 μL la solución de trabajo del fármaco (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que se mezcla con el medio de cultivo, se toman 100 μL y se transfieren al siguiente pozo de manera consecutiva hasta el pozo 2G, los 100 μL restantes se desechan.
- 2) En los pozos 3B-G se agregan 100 μL de la solución control de DMSO.
- 3) Para experimentos de exploración de la actividad anti-micobacteriana se evalúa a una sola concentración por quintuplicado. Agregar a los pozos de prueba 100 μL de la solución de trabajo de los compuestos a evaluar (pozos de las columnas 4-11 y filas B-F).
- 4) Agregar a los pozos 4G-9 100 μL de medio de cultivo (control de medio de cultivo).

- 5) Agregar a los pozos 10 y 11G 198 μ L de medio de cultivo + 2 μ L de inculo bacteriano (control diluido 1:100 que garantiza el crecimiento del 1 % de la población bacilar).
- 6) Agregar a todos los pozos de prueba 100 μ L de inculo bacteriano, excepto los pozos 4-9G.
- 7) Los pozos 11B-F corresponden a los controles de revelado.



	Agua destilada (evitar la evaporación)		Control de medio de cultivo
	Fármaco de referencia		Control diluido 1/100
	Control DMSO		Control de crecimiento libre de F.

Revelado de placas.

- 1) Preparar una mezcla de Tween 80 al 20% + alamar Blue (2.5 μ L de tween por cada 20 μ L del colorante).
- 2) Transcurridos 7 días de incubación de las placas es necesario agregar 20 μ L de la mezcla preparada en el paso 1 al pozo 11B e incubar nuevamente por 24 h. si el pozo revelado vira de azul (muerte) a rosa (crecimiento) se procede a revelar toda la placa, si no es necesario revelar el pozo 11 C.
- 3) Las placas se leen en un lector de Elisa a 540 y 600 nm.

Protocolo de Citotoxicidad (células THP1)

CONSIDERACIONES

Acciones Congelador: Estas células son más sensibles que la mayoría, el proceso de congelar / descongelar podría dañarlas. También parecen secretar algún tipo de factor de crecimiento, de modo que si son muy diluidas crecen lentamente, si están en una concentración mayor crecen más rápido, con lo que las poblaciones conservadas en el congelador se hacen más densa de lo normal.

Medios: ATTC recomienda medio RPMI 1640 con 2 mM de L-glutamina ajustado para contener 1.5 g /L de bicarbonato de sodio, 4.5 g / L de glucosa, 10 mM de HEPES y 1.0 mM de piruvato sódico y suplementado con 0.05 mM de 2-mercaptoetanol, 90%; suero fetal bovino, 10%. (Piruvato de sodio se utiliza por las células como una fuente de hidratos de carbono de fácil acceso. Además, está involucrado en el metabolismo de aminoácidos y el inicio del ciclo de Krebs.

*el medio puede prepararse con 20% de suero bovino y en consecuencia el cultivo se estabilizará cuando el suero fetal se reduzca en el medio a una concentración de 10%.

El 2-mercaptoetanol mejora la captación de cisteína y por consiguiente el mantenimiento de los niveles intracelulares de glutatión, protege contra el daño oxidativo, mejora la presentación de antígenos y reduce la formación de grumos. Se puede utilizar: **medio RPMI 1640 con 2 mM L-glutamina, FBS 10%.**

Propagación: estas células crecen mejor a una densidad de entre 1×10^5 células / mL a 1×10^6 células/mL (2×10^6 células/mL máximo). A mayor densidad de células esta línea celular puede retrasar o dejar de dividirse y agruparse o tener un aspecto irregular o formación de ampollas. Si empiezan a tener este aspecto las células deben desecharse y propagarse nuevamente. En teoría, sólo se debe utilizar 5 pases para que sus propiedades no cambien con el tiempo. En la práctica, esto no siempre se observa.

Diferenciación: el tratamiento con PMA induce una diferenciación terminal. Ya no se dividen, se adhieren, metabolizan más lentamente y tienen una apariencia que se aproxima más a la de un macrófago real.

1) LAVADO DE FRASCOS PARA CULTIVO CELULAR.

MATERIALES:

- 2 Frascos de 1L (para preparar el medio de cultivo)
- 4 Frascos de 250mL (preparación de alícuotas)
- 2 Frascos de 100mL (preparar stocks de NaOH y HCl)

Actividades

- 1) Preparar una solución de Etoxaclean al 1% en agua bidestilada.
- 2) Llenar los frascos con la solución preparada y dejarlos 24 h. en contacto con la solución.
- 3) Esterilizar los frascos por 15 minutos (deben contener la solución de etoxaclean).
- 4) Desechar la solución de etoxaclean y enjuagar los frascos con agua RO (Osmosis Reversa).
- 5) Enjuagar nuevamente los frascos con un poco de etoxaclean al 1 % (agitar el frasco con la solución sin usar escobillón).
- 6) Enjuagar con agua bidestilada 10 veces por frasco.
- 7) Enjuagar con agua mili Q 10 veces por frasco.
- 8) Dejar escurrir los frascos.
- 9) Tapar y esterilizar los frascos (15 min de esterilización y 15 min de ciclo de secado).
- 10) Preparar soluciones de NaOH y HCl

PREPARACION DE UNA SOLUCION 1N DE HCl (50mL)

*Para preparar 50 mL agregar 4.16 mL de HCl concentrado y esterilizar por filtración.

2) ESTERILIZACION DE LA UNIDAD DE FILTRACION

- 1) preparar unidad filtrante, 2 filtros, una pinza y un agitador magnético
- 2) Lavar la unidad filtrante con un poco de etoxaclean y enjuagar con agua RO.
- 3) Esterilizar racks (puntas de 1 mL, 200 μ L y 10 μ L).
- 4) esterilizar el material (15 min de esterilización y 15 min de ciclo de secado).

3) PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO.

Recomendaciones

Colocar los frascos, la unidad filtrante, puntas de 1 mL, una plancha de agitación, los filtros, pinza y el agitador magnético en la campana y dejar encendida la luz uv por 30 min.

Modo de preparación.

- 1) Disolver el sobre de medio RPMI 1640 en 950ml de agua inyectable
- 2) Agregar el agitador magnético al frasco de 1 L.
- 3) Agregar 2 g de HEPES
- 4) Agregar 2 g de bicarbonato
- 5) Ajustar PH a 6.8
- 6) Ajustar vol a 1 L.
- 7) Filtrar el medio.
- 8) Incubar 24 h para la prueba de esterilidad.

4) COMPLEMENTAR EL MEDIO DE CULTIVO

Recomendaciones

Encender el uv de la campana 30 min antes de comenzar a trabajar.

Se prepara medio RPMI a 10% de SFB y al 20% de SFB.

- 1) Preparar una mezcla de aminoácidos, antibiótico y piruvato (1.5 mL de cada uno de tal manera que tengamos un vol. Final de 4.5 mL) esterilizar por filtración.

	10%SFB	20 % SFB
RPMI	87 mL	23.1 mL
SFB	10 mL	6 mL
ANTIBIOTICO		
AMINOACIDOS	3 mL	0.9 mL
PIRUVATO		

5) DESCONGELAR LA LINEA CELULAR

- 1) Colocar el RPMI SFB 20% en la incubadora a 37°C durante 30 min
- 2) Prender el uv en la campana 30 min antes de trabajar.
- 3) Descongelar el criovial con células.
- 4) Colocar en un falcon de 25mL 5 mL de RPMI SFB 20%.
- 5) Agregar el contenido del criovial 1ml al falcon con 5mL de RPMI SFB 20%.
- 6) Centrifugar las células con el medio RPMI SFB 20% con células a 200RPM, 5 min. a 20°C.
- 7) Eliminar el medio en el frasco de residuos y cuidar el pellet.
- 8) Agregar 5mL de RPMI SFB 20% al falcon de 25mL.
- 9) Centrifugar las células con el medio RPMI SFB 20% con células a 200RPM, 5 min. a 20°C.
- 10) Eliminar el medio en el frasco de residuos.
- 11) Agregar 5 mL de medio al falcon de 25 mL y verificar que el pellet no quede en el fondo.
- 12) Tomar los 5 mL del falcon y colocarlos en un frasco de cultivo celular.
- 13) Incubar a 37 °C
- 14) Tirar la pipeta utilizada y romperla en tres partes.
- 15) Tirar el criovial y el falcon utilizado.
- 16) Limpiar la campana y uv durante 30 min.
- 17) Guardar el material sobrante.

6) RESIEMBRA DEL CULTIVO CELULAR.

13 días después de la resiembra observar bajo microscopio el crecimiento de las células y si estas lo ameritan cambiar el medio de cultivo.

Es necesario prender la uv 30 min antes de comenzar a trabajar y colocar en la campana el material necesario, se debe colocar en la incubadora medio RPMI 10%.

- 1) Retirar las células de la incubadora y colocar el contenido en un falcón
- 2) Centrifugar el medio con células a 200G por 5 min a 20 °C.
- 3) Vaciar el medio al frasco de residuos y tener cuidado con el pellet.

- 4) Agregar 5 mL de medio de cultivo y centrifugar nuevamente
- 5) Vaciar el medio al frasco de residuos.
- 6) Agregar 10mL de medio al pellet, homogenizar perfectamente y colocar en una botella de cultivo.(botella grande)

7) CONTEO CELULAR.

En caso de tener 2 frascos juntar su contenido y homogenizar con la pipeta.

- 1) Tomar una alícuota de células y colocarla en un ependorf
- 2) En un ependorf diferente preparar una dilución 1/10 con azul de tripano 0.4% (90µL de azul de tripano + 10µL de células).
- 3) Colocar 10µL de la mezcla antes preparada y colocar 10µL a cada lado de la cámara de Neubauer.
- 4) Contar de la siguiente manera en cada una de las ventanas de la cámara.



- 5) Ver ejemplo a continuación.

Ventana 1

	Vivas	Muertas	
1	10	1	$38+4=42$ $42/4=10.5$
2	8	1	
3	9	1	
4	11	1	
Total	38	4	

Ventana 2

	Vivas	Muertas	
1	5	1	$31+1=32$ $32/4=8$
2	14	0	
3	10	0	
4	2	0	
Total	31	1	

Total de células $10.5+8=18.5$

$18.5/2=9.25$

$9.5 \times 10^5 = \mathbf{925000}$ células por mL.

Una vez conocido el número de células por mL solo es necesario realizar operaciones para conocer cuántos mL necesitamos para obtener el número deseado por mL.

Ejemplo:

Para colocar 1.2×10^6 cel/mL necesitamos:

$1200000/925000=1.29$ mL.

Para preparar un vol de 10 mL necesitamos 12.9 mL.

EVALUACION DE CITOTOXICIDAD EN MACROFAGOS A PARTIR DE CELULAS THP1

Utilizar placas de 96 pozos

*Para una placa de 96 pozos se necesitan 1.4 millones de células resuspendidas en 7 mL de medio (considerando 100 μ L por pozo (para 60 pozos).

**es necesario para comenzar a diferenciar las células agregar por cada mL de medio 1 μ L de PMA (concentración final de 100 nM/mL, los artículos hacen referencia a la diferenciación entre 24 y 48 h)

- 1.- Agregar 100 μ L de una suspensión celular 2×10^5 células/mL. (20,000 células por pozo)
- 2.- Incubar 24 horas a 37°C con 5-7% de CO₂.
- 3.- Al término de la incubación eliminar el sobrenadante y lavar las placas 2 veces con medio de cultivo.
- 4.- Adicionar 100 μ L de la solución de trabajo (medio de cultivo + compuesto o extracto que se desea evaluar) de tal manera que la concentración final para evaluación de extractos sea 50 μ g/mL (concentración evaluada sobre la RT del VIH-1 y cepa H37Rv) y la concentración final para la evaluación de compuestos puros sea de 50 μ M.
- 5.- Incubar 24 horas a 37°C con 5-7% de CO₂.
- 6.- Al finalizar las 24 h de incubación agregar 10 μ L de alamarBlue e incubar 24 h.
- 7.- después de 24 h de incubación leer las placas a 570 nm y 600 nm para interpretar los datos.

*La viabilidad celular se calcula como la relación de la media de DO obtenida respecto a los pozos de control (células sin tratamiento).

Research Article

Antimycobacterial and HIV-1 Reverse Transcriptase Activity of Julianaceae and Clusiaceae Plant Species from Mexico

Rocio Gómez-Cansino,¹ Clara Inés Espitia-Pinzón,² María Guadalupe Campos-Lara,³ Silvia Laura Guzmán-Gutiérrez,^{2,4} Erika Segura-Salinas,² Gabriela Echeverría-Valencia,² Laura Torras-Claveria,⁵ Xochitl Marisol Cuevas-Figueroa,⁶ and Ricardo Reyes-Chilpa¹

¹Instituto de Química, Departamento de Productos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF, Mexico

²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF, Mexico

³Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez No. 162, Colonia Doctores, 06720 México, DF, Mexico

⁴Cátedra CONACyT, Mexico

⁵Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología, Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona, Avenida Diagonal 643, Barcelona, 08028 Catalonia, Spain

⁶Instituto de Botánica (IBUG), Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, 45221 Zapopan, JAL, Mexico

Correspondence should be addressed to Ricardo Reyes-Chilpa; chilpa@unam.mx

Received 18 December 2014; Accepted 31 March 2015

Academic Editor: Veronique Seidel

Copyright © 2015 Rocio Gómez-Cansino et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The extracts of 14 Julianaceae and 5 Clusiaceae species growing in Mexico were tested *in vitro* (50 µg/mL) against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and HIV reverse transcriptase (HIV-RT). The Julianaceae bark and leaf extracts inhibited *M. tuberculosis* (>84.67%) and HIV-RT (<49.89%). The Clusiaceae leaves extracts also inhibited both targets (>58.3% and >67.6%), respectively. The IC₅₀ values for six selected extracts and their cytotoxicity (50 µg/mL) to human macrophages were then determined. *Amphipterygium glaucum*, *A. molle*, and *A. simplicifolium* fairly inhibited *M. tuberculosis* with IC₅₀ of 1.87–2.35 µg/mL; but their IC₅₀ against HIV-RT was 59.25–97.83 µg/mL. *Calophyllum brasiliense*, *Vismia baccifera*, and *Vismia mexicana* effect on *M. tuberculosis* was noteworthy (IC₅₀ 3.02–3.64 µg/mL) and also inhibited RT-HIV (IC₅₀ 26.24–35.17 µg/mL). These 6 extracts (50 µg/mL) presented low toxicity to macrophages (<23.8%). The HPLC profiles of *A. glaucum*, *A. molle*, and *A. simplicifolium* indicated that their antimycobacterial activity cannot be related to masticadienonic, 3α, or 3β-hydromasticadienonic acids, suggesting that other compounds may be responsible for the observed activity or this might be a synergy result. The anti-HIV-RT and antimycobacterial activities induced by *C. brasiliense* can be attributed to the content of calanolides A, B, as well as soulatrolide.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an illness caused by the slow-growing acid-fast bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. In 1993, TB declared a global emergency by the World Health Organization [1]. In 2013, there were 9 million new cases and 1.5 million deaths; this figure included 0.4 million fatalities associated with HIV patients [2]. *Mycobacterium tuberculosis* is facultative intracellular bacteria that have developed resistance to first and second line antituberculosis drugs. Antibiotic

resistance and multidrug-resistant TB strains are a serious problem due to the lack of results in treatment design directed to disease control and eradication [3, 4]. Due to the recent rise of TB associated with the human immunodeficiency virus VIH and the rapid spread of multidrug resistance TB strains, new classes of antimycobacterial compounds are required [5]. Compounds obtained from plants can be an important source of novel leads in the field of antituberculosis therapeutic agents [6–8], as well as against human immunodeficiency virus (HIV) [9].

TABLE 1: HIV-1 RT and *M. tuberculosis* inhibition by Julianaceae and Clusiaceae extracts* and their cytotoxicity to THP-1 human cell line.

Species	Location/voucher	Part used/gender	% inhibition of HIV-1 RT	% inhibition of <i>M. tuberculosis</i>	% cytotoxicity
Julianaceae					
<i>Amphipterygium amplifolia</i>	Jalisco/15637	Stem bark/M	24.8 ± 2.1	90.1 ± 0.6	14.0 ± 1.8
		Leaf/M	18.7 ± 3.2	89.8 ± 0.1	16.3 ± 2.3
	Jalisco/15638	Stem bark/F	36.7 ± 2.8	89.1 ± 0.4	23.3 ± 1.7
		Leaf/F	46.5 ± 4.8	89.7 ± 0.2	25.5 ± 1.9
<i>Amphipterygium molle</i>	Jalisco/15639	Stem bark/M	19.3 ± 2.2	89.6 ± 0.5	19.7 ± 1.0
		Stem bark/F	11.3 ± 0.7	88.7 ± 0.7	12.5 ± 1.2
	Jalisco/15640	Leaf/F	49.8 ± 1.8	89.0 ± 0.6	19.5 ± 1.5
		Stem bark/M	9.2 ± 2.7	88.2 ± 0.1	18.4 ± 1.5
<i>Amphipterygium adstringens</i>	Jalisco/15641	Leaf/M	6.1 ± 0.7	90.2 ± 0.7	25.1 ± 1.9
		Stem bark/M	40.0 ± 2.0	86.9 ± 0.5	22.9 ± 1.6
<i>Amphipterygium glaucum</i>	Michoacán/15644	Leaf/M	48.5 ± 0.7	89.6 ± 0.9	10.9 ± 1.6
		Stem bark/F	21.7 ± 2.1	84.6 ± 1.3	19.7 ± 1.3
<i>Amphipterygium simplicifolium</i>	Oaxaca/16125	Stem bark/	44.3 ± 1.2	90.3 ± 0.2	9.2 ± 1.5
		Leaf/	7.9 ± 0.4	90.5 ± 1.0	19.5 ± 0.3
Clusiaceae					
<i>Vismia mexicana</i>	Veracruz/134793 [§]	Leaf	43.7 ± 0.7	63.5 ± 1.1	10.6 ± 1.4
<i>Vismia baccifera</i>	Oaxaca/134792 [§]	Leaf	54.0 ± 0.8	70.3 ± 0.5	10.7 ± 1.7
<i>Clusia guatemalensis</i>	Oaxaca/134795 [§]	Leaf	30.5 ± 2.4	62.1 ± 0.7	17.1 ± 1.3
<i>Clusia lundellii</i>	Oaxaca/136723 [§]	Leaf	27.3 ± 1.1	58.3 ± 0.4	18.3 ± 1.4
<i>Calophyllum brasiliense</i>	Veracruz/15526	Leaf	67.6 ± 1.2	82.8 ± 0.4	23.8 ± 1.1

*CH₂Cl₂-MeOH extracts tested at 50 µg/mL. M = male, F = female. Vouchers at IMSSM or FCME[§].

Preliminary data indicate that *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) is a promising source of anti-TB compounds, since the stem bark extract inhibited in 95% the growth of *M. tuberculosis* at 50 µg/mL; this tree species is used in Mexican Traditional Medicine for the treatment of tuberculosis and other respiratory diseases [10]. However, other 4 species of this genus found in Mexico have not been investigated yet against *M. tuberculosis* or HIV. Julianaceae species are dioecious; that is, male and female trees are found; some morphological features are useful for sex differentiation; for instance, female specimens show flowers ordinarily in groups of four in a receptacle [11]. So far, the influence of sex in the production of secondary metabolites has been poorly documented; however, in the case of *A. adstringens* bark, an accumulation of masticadienonic and 3 α -hydroxymasticadienonic acids has been found to be higher in female plants [12].

The leaf extracts of the 23 species of Clusiaceae distributed in Mexico have been examined against HIV-1 RT [9], but not against *M. tuberculosis*. Among the 5 most active species against HIV-1 RT, the tropical tree *Calophyllum brasiliense* is remarkable [9]: its leaves contain dipirano-tetracyclic coumarins, such as calanolides A, B, and C, as well as inophyllums, mainly soulatrolide. Such compounds have been found to be active against HIV-1 RT [13] and *M. tuberculosis* [14]. The calanolide A shows potent and specific inhibition of HIV-RT [15]; this compound has been

synthesized and is currently in pharmacological research phases II/III [16]. The hexane leaf extract of *C. brasiliense* has also been proposed for developing a standardized phytodrug; however, to achieve this goal, there is a need to obtain biological material with a high content of active compounds [9, 17]. The active compounds for other Clusiaceae species are still unknown.

The aim of this study was to evaluate Mexican Julianaceae and Clusiaceae crude plant extracts against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and HIV-RT. Plants were selected according to two criteria: Julianaceae species, based on their use to treat tuberculosis in Mexican Traditional Medicine [18], whereas Clusiaceae species, based on bioprospective and chemotaxonomical data.

2. Methods

2.1. Plant Material. Clusiaceae and Julianaceae species were collected from different localities in Mexico (Table 1). Voucher specimens were deposited at the Herbarium Facultad de Ciencias (FCME) of the Universidad Nacional Autónoma de México and the Medicinal Herbarium (IMSSM) of Instituto Mexicano del Seguro Social.

2.2. Preparation of Extracts. The leaves of Clusiaceae species were used for preparing the tested extracts, whereas, in the case of Julianaceae, the extracts were prepared from the bark

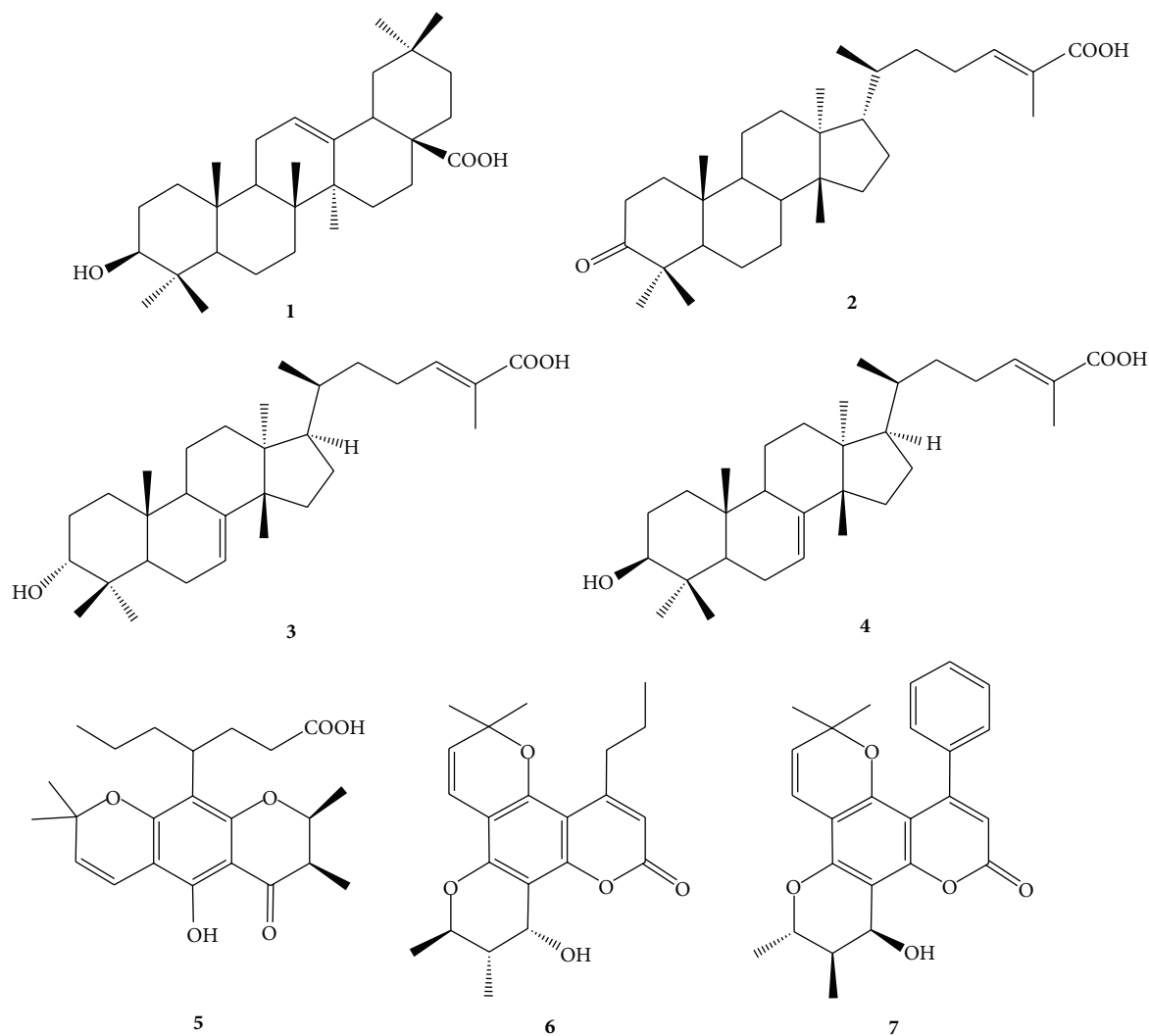


FIGURE 1: Triterpenes from Julianaceae species: oleanolic acid **1**, masticadienonic acid **2**, 3α -hydroxymasticadienonic acid **3**, and 3β -hydroxymasticadienonic acid **4**. Compounds from *C. brasiliense*: apetalic acid **5**, calanolide B **6**, and soulatrolide **7**.

and leaves of specimens of different genders (male or female). All plant materials (100 g) were dried at room temperature under darkness, ground, and macerated three times for 24 h with a mixture of CH_2Cl_2 -MeOH (1:1, 150 mL). The extracts were concentrated *in vacuo* to dryness and stored at room temperature until use.

2.3. Stock and Working Plant Extract Solution. Stock solutions of all extracts were prepared in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and sterilized by filtration throughout a 0.22 μm PTFE membrane. For *M. tuberculosis* susceptibility tests, extract solutions were prepared by diluting the stock extract in sterile 7H9 broth to obtain a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration, whereas extract solutions for anti-RT tests were diluted in the buffer provided by the kit manufacturer to obtain a working concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Lenti RT, Cavid Tech).

2.4. Cell Culture. To assess cytotoxicity, human monocytic leukemia THP-1 cells from ATCC were cultured in RPMI

1640 medium supplemented with nonheat-inactivated 20% fetal bovine serum, 1 mM HEPES. For all experiments, THP1 were cultured in 75 cm^2 Falcon culture flasks under standard culture conditions of 5% CO_2 at 37°C at an initial density of 1.0×10^6 cells/mL. The cultures were maintained by adding fresh medium with 10% fetal bovine serum every 2-3 days.

2.5. HPLC Analysis of Extracts of Julianaceae and *C. brasiliense*. The bark extracts of Julianaceae and *C. brasiliense* leaves were analyzed by HPLC (Agilent 1100 series) according to previous reports [17, 19]. In the case of Julianaceae, the compounds oleanolic acid **1**, masticadienonic acid **2**, 3α -hydroxymasticadienonic acid **3**, and 3β -hydroxymasticadienonic acid **4** were quantified, whereas, for *C. brasiliense*, the concentrations of apetalic acid **5**, calanolide B **6**, and soulatrolide **7** were determined (Figure 1). The chromatographic column Kromasil 100 C18, 5 μm , 150 \times 4.6 mm was used to analyze Julianaceae species; the mobile phase was a mixture of 0.1% aqueous acetic acid, acetonitrile containing 0.1% acetic acid and grade reagent

alcohol (90% ethanol + 5% methanol + 5% 2-propanol) in a proportion 18:52:30 v/v for 25 min with an isocratic flowrate of 1.0 mL/min; the injection volume was 10 μ L, and the elute was analyzed at 215 nm. Each analysis was followed by a 5 min washing with 100% acetonitrile and an equilibration period with the mobile phase for 15 min.

The components of *C. brasiliense* extract were quantified using the chromatographic column Kromasil 100 C18, 5 μ m, 250 \times 4.6 mm. The isocratic system acetonitrile water (6:4 v/v) with the flowrate of 1 mL/min was used for 40 min; the injection volume was 10 μ L and the detection wavelength 284 nm. Each analysis was followed by a 5 min washing with 100% acetonitrile, 2 min with water, and an equilibration period with the mobile phase for 3 min.

Identification of the compounds in the extracts was carried out by comparison with the retention times (RT) of pure compounds. The calibration graphs of standards were calculated and each compound was injected by triplicate over two different days; Julianaceae compounds were injected in seven different concentrations (20, 40, 60, 100, 140, 200, and 500 μ g/mL) whereas standards from *C. brasiliense*, in six different concentrations (20, 50, 80, 120, 150, and 200 μ g/mL). The linear regressions and their coefficients of determination (R^2) were calculated for each compound as follows: oleanolic acid **1**, $y = 3.7085x - 17.043$, 0.9987; masticadienonic acid **2**, $y = 10.766x + 4.3811$, 0.9990; mixture of 3 α and β -hydroxymasticadienonic acids (**3** & **4**), $y = 11.466x + 22.14$, 0.9993; apetalic acid **5**, $y = 19.547x + 135.64$, 0.9933; calanolide B **6**, $y = 27.786x + 13.369$, 0.9995 and soulatrolide **7**, $y = 35.075x + 209.85$, 0.9934. Finally, the percentage of each compound in the extracts was calculated interpolating the linear regression equation. The results are reported as the percentage of extract (Table 3).

2.6. HIV-1 RT Inhibition Test. The extracts were evaluated by a nonradioactive immunocolorimetric assay (Lenty RT Activity Assay, Cavid Tech) according to the protocol provided by the manufacturer. All extracts were first tested at 50 μ g/mL with a final DMSO concentration of 0.5% v/v. Reported values are means of 5 replicates \pm SEM. The IC_{50} values were calculated only for extracts that inhibited $\geq 50\%$ the enzymatic activity. These extracts were tested at 7 concentrations 3.125 to 200 μ g/mL with increments of 0.3 logarithms. Reported values are means of 3 replicates \pm SEM. Nevirapine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), was used as a positive control from 0.01 μ M to 1 mM with increments of 1 logarithm.

2.7. Antimycobacterial Screening by Microplate Alamar Blue. The activity of all extracts was tested using the microplate Alamar blue assay as previously described [20, 21]. Outer wells were filled with sterile distilled water (200 μ L) to prevent dehydration in experimental wells. Column 2 (B to G wells) was used to evaluate the reference drug rifampin; serial twofold dilutions in 100 μ L of Middlebrook 7H9 medium were performed to obtain concentrations from 2.0 to 0.06 μ g/mL. Wells 10 E and F were used for DMSO control, and wells 11 B to 11 E for the drug free control. One-hundred

μ L of supplemented 7H9 broth plus 100 μ L the bacterial inoculum (1×10^6 ufc/mL) was added to each of these wells. Simultaneously a diluted control 1:100 was prepared from the bacterial suspension, representing 1% growth of the bacterial population tested. All other wells received 100 μ L of the extract solution (100 μ g/mL) and 100 μ L bacterial inoculums. The final concentration of DMSO in well was <1.0% v/v, and all extracts were tested at 50 μ g/mL. The IC_{50} values were calculated only for those extracts that inhibited $\geq 50\%$ the mycobacterial growth; these extracts were tested at seven concentrations (3.125 to 200 μ g/mL) with increments of 0.3 logarithms. Each microplate was incubated for 7–10 days at 37°C; after incubation, one growth control was developed with a mixture of 20 μ L of Alamar blue solution (ABD Serotec) and 5 μ L of sterile 20% Tween 80. The plates were reincubated at 37°C for 24 h. After this period, if the control well turned from blue (no growth) to pink (growth), the remaining wells were treated with Alamar-Tween, as previously described, and incubated for additional 24 h. Reduction of Alamar blue was calculated according to the manufacturer protocol. Optical density of the plate was measured at 540 and 600 nm with a spectrophotometer. The percentage of inhibition of the crude extracts was defined as 100 – percentage of reduction of Alamar blue.

2.8. Cytotoxicity Assay. Crude extracts were evaluated against human macrophages THP1 cell line. The differentiation of THP1 cells was performed with PMA (phorbol 12-myristate 13 acetate) 50 nM [22]. Twenty thousand cells in the differentiation process were placed in each well, and the plates were incubated for 72 h at 37°C, and 5% CO₂ atmosphere. After the incubation, the plates were washed twice with RPMI supplemented medium and 100 μ L of the extract solutions (50 μ g/mL) was added to each well and reincubated for 24 h. After the reincubation time 10 μ L of Alamar blue solution was added to each well, and the plates were reincubated for 24 h. The anthracycline doxorubicin was used as a positive control, and the data were interpreted as indicated by the manufacturer. Cytotoxicity was calculated as the ratio of the average OD (570 and 600 nm) obtained as compared with control wells (untreated macrophages).

3. Results

3.1. Screening of Plant Extracts. The 14 Julianaceae extracts displayed high antimycobacterial activity (>84%). These results are consistent with previously published data for *A. adstringens*, which inhibited 95% of mycobacterial activity at the same concentration [10]. Regarding the 5 Clusiaceae extracts, only *C. brasiliense* showed similar potency (82%) as compared with Julianaceae; the other Clusiaceae species inhibited the growth of *M. tuberculosis* H37Rv in the range of 58.3 to 70.3%. Concerning HIV-RT, the Clusiaceae extracts showed inhibition in a range of 27.3 to 67.6%, whereas the Julianaceae extracts inhibited this enzyme in the range of 7.9 to 49.8% (Table 1). Since macrophages are potential targets of *M. tuberculosis* and HIV, in order to assess the cytotoxicity of the extracts, they were tested against macrophages derived

TABLE 2: IC₅₀ of Clusiaceae and Julianaceae extracts.

Species	IC ₅₀ ± SEM (µg/mL)	
	<i>M. tuberculosis</i> H37rV	VIH-1 RT
<i>A. glaucum</i> /M	1.87 ± 1.75	97.83 ± 2.03
<i>A. molle</i> /M	2.27 ± 1.52	89.59 ± 1.97
<i>A. simplicifolium</i>	2.35 ± 0.97	59.21 ± 1.23
<i>C. brasiliense</i>	3.02 ± 1.06	26.24 ± 1.92
<i>V. baccifera</i>	3.82 ± 1.19	31.75 ± 1.34
<i>V. mexicana</i>	3.64 ± 1.35	36.17 ± 1.53

TABLE 3: Chemical composition (%) of Julianaceae bark extracts.

Extracts	Compounds %		
	1*	2**	3 & 4
<i>A. amplifolia</i> /M	n/d	8.71	8.77
<i>A. amplifolia</i> /F	n/d	4.17	4.42
<i>A. molle</i> /M	n/d	4.73	8.53
<i>A. molle</i> /F	n/d	3.46	3.35
<i>A. glaucum</i> /M	n/d	0.15	3.63
<i>A. glaucum</i> /F	n/d	n/d	n/d
<i>A. adstringens</i> /M	n/d	14.23	10.91
<i>A. simplicifolium</i>	n/d	4.15	3.35

* (RT = 8.06 min), ** (RT = 17.29 min), n/d: not detected.

from THPI cells. The extracts inhibited in 9.2–25.5% of the growth of macrophages when tested at 50 µg/mL, suggesting they are innocuous at the tested concentrations (Table 1).

The IC₅₀ values were calculated for six species selected for their high activity in both targets. Three of them were Julianaceae (stem bark) and three Clusiaceae (leaves) (Table 2). The six extracts showed potent antimycobacterial activity with IC₅₀ in the range 1.8 to 3.8 µg/mL; however, these extracts were less potent inhibiting HIV-RT, since they ranged from 26.2 (*C. brasiliense*) to 97.8 µg/mL (*A. glaucum*). Regarding HIV-RT inhibitory properties of plant extracts, several authors have pointed out that an IC₅₀ ≤ 50 µg/mL may be considered potent [23, 24]; however, a similar parameter has not been proposed for *M. tuberculosis*. Assuming the same parameter, the extracts from *C. brasiliense*, *V. baccifera*, and *V. mexicana* displayed similar potency to both targets, while the extracts from *A. glaucum*, *A. molle*, and *A. simplicifolium* were potent only to *M. tuberculosis* (Table 2).

3.2. HPLC Analysis of Extracts of Julianaceae and *C. brasiliense*. The HPLC analysis of the three selected Julianaceae bark extracts showed the following metabolites: masticadienonic acid **2** and α- and/or β-hydroxymasticadienonic acids (**3** and **4**). Under the chromatographic conditions used, quantifying individually the isomers **3** and **4** was not possible due to their similar retention times (Rt = 20.7 and 20.9 min, resp.); therefore, these compounds were quantified as the mixture of acids. Oleanolic acid **1**, which has been previously reported as a constituent of *A. adstringens* bark, was not detected in the extracts studied (Table 3). The concentration of compounds **2** and mixture of **3** and **4** may not be related to *M. tuberculosis* activity since these three compounds from the

most active extracts (IC₅₀ < 2.35 µg/mL) were found in high (*A. amplifolia*, male), medium (*A. simplicifolium*), and low (*A. glaucum*, male) content. In addition, the other Julianaceae bark extracts which also showed significant antimycobacterial activity (>84.6% at 50 µg/mL) showed no correlation with the concentrations of the analyzed compounds, as they include the species with the highest concentrations of **2**, **3**, and **4** (*A. adstringens* from male trees; 14.23% and 10.91%, resp.), but also the species devoid of these compounds (*A. glaucum* female). The above findings suggest that the antimycobacterial active principle in the Julianaceae extracts is not compound **2**, **3**, or **4**. The same can be stated for HIV-RT, since almost all of these extracts, with the exception of *A. simplicifolium*, showed poor activity (Tables 1 and 2).

With regard to gender and production of secondary metabolites, male specimens showed the higher levels of masticadienonic acid **2** and 3α-hydroxymasticadienonic **3**, as compared to extracts from female specimens (Figure 2). Our results are opposite to those previously published, in which the accumulation of compounds **2** and **3** was higher in female plants [12].

In the case of Clusiaceae species, only *C. brasiliense* was analyzed by HPLC (Figure 3). Apetalic acid (Rt = 18.64), calanolide B (Rt = 23.34), and soulatrolide (Rt = 25.30) were present in 0.01%, 2.4%, and 6.8%, respectively. Previously, a high antimycobacterial and anti-HIV-RT activity of soulatrolide and calanolide B has been reported [14]. Hence, they can be considered, respectively, as the antimycobacterial and anti-HIV active principles.

4. Discussion

HIV infection decreases the number of CD4+ lymphocytes, so it is quite probable that an HIV+ patient can acquire or reactivate tuberculosis disease [25]. During the last 30 years, 24 anti-HIV drugs have been approved by the FDA [9] but any novel anti-TB drug. The rapid spread of multidrug resistance to TB strains remarks that new classes of antimycobacterial compounds are now required [26, 27]. The treatment of patients coinfecting with TB/HIV presents also additional challenges, such as intolerance and contraindications for the use of combined drugs and low attachment to medication regime due to the administration of a large number of medications. The highly active retroviral therapy (HAART) for HIV patients involves the administration of a protease inhibitor and two reverse transcriptase inhibitors (1 nonnucleoside + 1 nucleoside type), which represent administration of 20 pills/daily; in addition, monotherapy for TB adds 10 to 12 pills [28]. Moreover, HIV-1 protease inhibitors nullify the effect of the rifampin used as first-line drug for the treatment of TB [26, 27]. In this context, new drugs are needed, if at all possible, active to both targets.

A previous report indicated that one *Amphipterygium* species had a promising activity against TB [10], and our results confirm this finding and extend it to the five species of this genus present in Mexico, which are quite potent against *M. tuberculosis*; however, these extracts showed moderate or poor activity to HIV-RT. No correlation with the content of triterpenoids as masticadienonic acid, 3α,

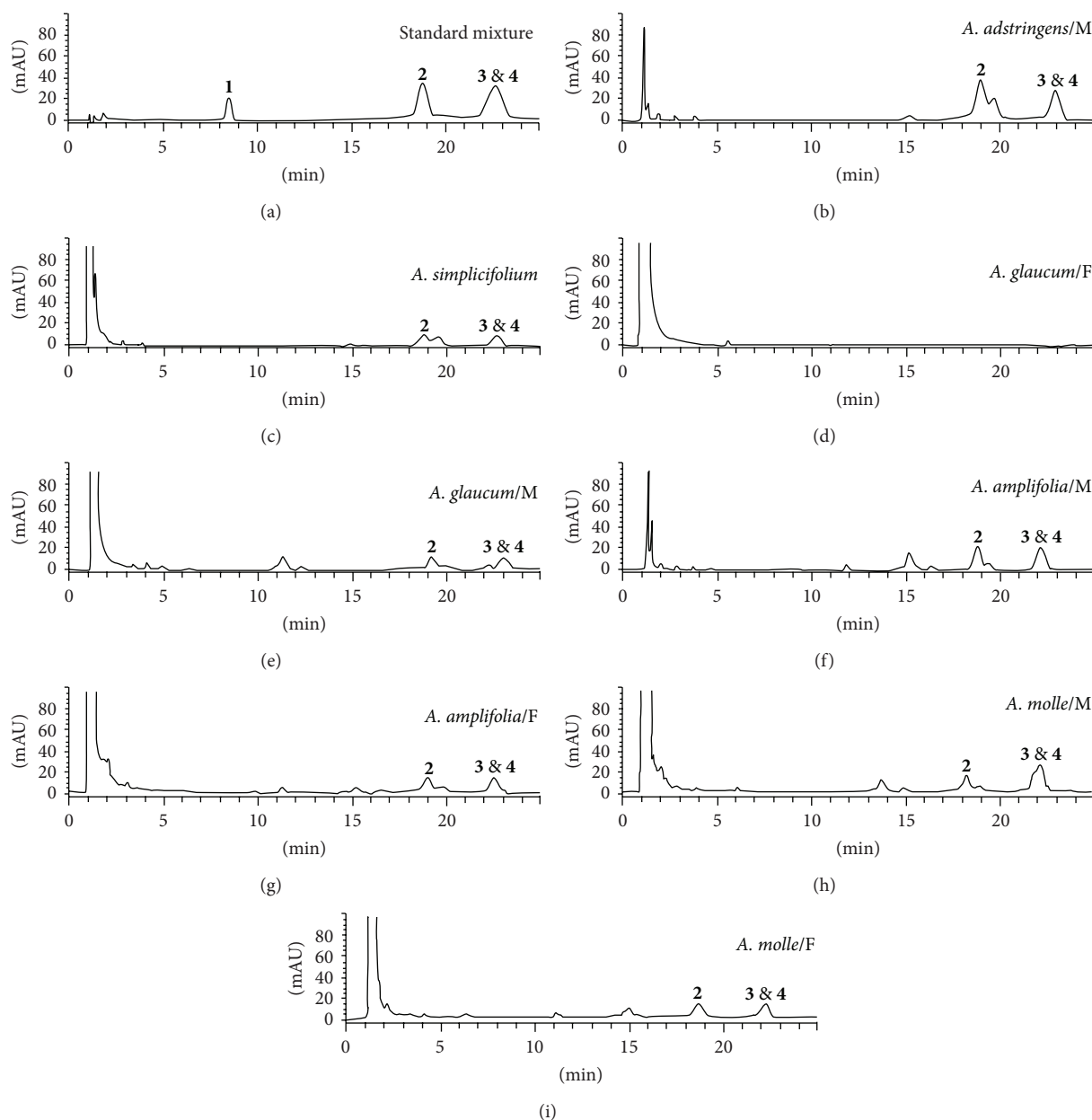


FIGURE 2: Chromatograms of Julianaceae species extracts and their main triterpenes: oleanolic acid 1, masticadienonic acid 2, 3 α -hydroxymasticadienonic acid 3, and 3 β -hydroxymasticadienonic acid 4.

and 3 β -hydromasticadienonic acids was detected for anti-TB or anti-RT activities for the extracts of these species and deserves future investigations in order to identify the active compounds. According to our results *Amphipterygium* species are a source of potent anti-TB extracts with low cytotoxicity to macrophages.

A previous report indicated that the five Clusiaceae species here examined have moderate to high activity against HIV-RT [9], and our results confirm this finding but also show for the first time that they are quite potent to *M. tuberculosis*. In particular, *C. brasiliense* organic extract from the leaves could be suitable for developing a phytodrug due to its content of active molecules to both targets and

the calanolides A, B, C, and soulatrolide. Our results also evidence that biodiversity is a useful and valuable source for molecular leads aimed to *M. tuberculosis* and HIV. To date it has been described at least 84 natural compounds active against *M. tuberculosis* [7]. On the other hand, 120 substances, mainly extracted from plants, have been identified with activity *in vitro* against HIV [13]. Only a few of them have been examined for both properties.

5. Conclusion

In this study, the high antimycobacterial and moderate anti-HIV-RT activities of Julianaceae bark extracts, especially

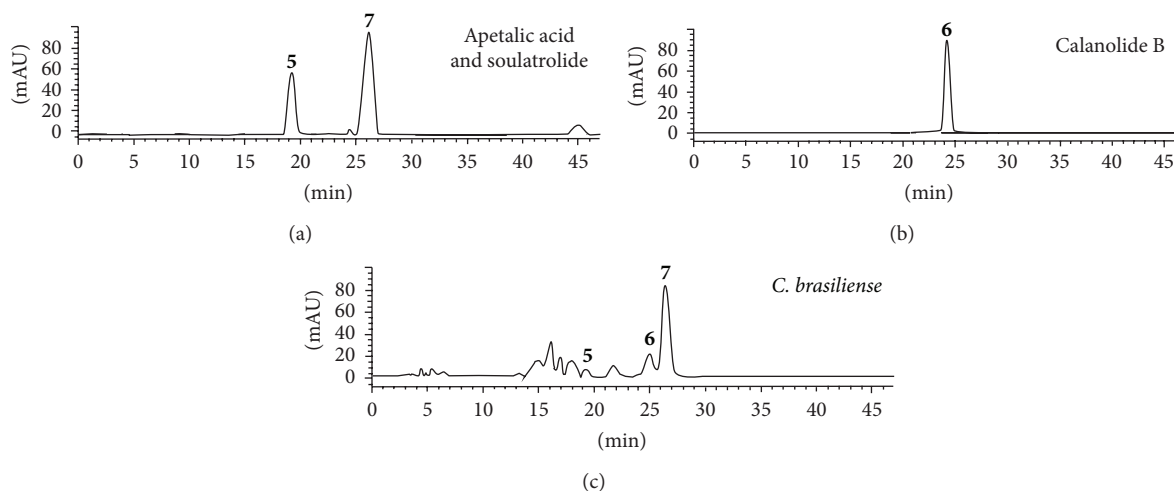


FIGURE 3: Chromatogram of *C. brasiliense* extract and its compounds: apetalic acid **5**, calanolide B **6**, and soulatrolide **7**.

Amphipterygium simplicifolium, *A. glaucum*, and *A. molle* have been showed. These activities are not related to the triterpenes quantified in this study and suggest that other compounds are the active molecules. Our results provide sustenance to the use of species of Julianaceae plants in Mexican Traditional Medicine in the treatment of tuberculosis. Concerning Clusiaceae, the leaf extracts of the 5 species tested showed good activity against both targets. All the extracts showed low toxicity to human macrophages. *Calophyllum brasiliense* extract may be suitable for developing a phytodrug with dual activity against HIV-1 and *M. tuberculosis* due to its content of the active molecules calanolides and soulatrolide.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This research was supported by Grants PAPIIT-DGAPA-UNAM (IG 200513) and NAUTEI of IIB-UNAM. Rocio Gómez Cansino is grateful to Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM and CONACyT (249620) for providing a scholarship. The authors are grateful to Lucio Lozada and Abigail Aguilar for identification of some botanical specimens, to Dr. Jaime Bastida Armengol for the facilities for a research stay in the Laboratory of Natural Products, School of Pharmacy, University of Barcelona, Spain, and to Dr. Cesar García Zebadúa, Dr. Ignacio González Sánchez, and biologist Griselda Hernández Pasteur for technical assistance.

References

- [1] World Health Organization, "Fact sheets on Tuberculosis," <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>.
- [2] World Health Organization, *Global Tuberculosis Report*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2014, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf.
- [3] I. M. Gould, "Antibiotic resistance: the perfect storm," *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 34, supplement 3, pp. S2–S5, 2009.
- [4] S. B. Levy and B. Marshall, "Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 12, supplement, pp. S122–S129, 2004.
- [5] J. Luna-Herrera, M. C. Costa, H. G. González, A. I. Rodrigues, and P. C. Castilho, "Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp.," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 59, no. 3, pp. 548–552, 2007.
- [6] C. L. Cantrell, S. G. Franzblau, and N. H. Fischer, "Antimycobacterial plant terpenoids," *Planta Medica*, vol. 67, no. 8, pp. 685–694, 2001.
- [7] B. R. Copp and A. N. Pearce, "Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*," *Natural Product Reports*, vol. 24, no. 2, pp. 278–297, 2007.
- [8] M.-T. Gutierrez-Lugo and C. A. Bewley, "Natural products, small molecules, and genetics in tuberculosis drug development," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 51, no. 9, pp. 2606–2612, 2008.
- [9] M. Huerta-Reyes, M. D. C. Basualdo, L. Lozada, M. Jimenez-Estrada, C. Soler, and R. Reyes-Chilpa, "HIV-1 inhibition by extracts of clusiaceae species from Mexico," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 27, no. 6, pp. 916–920, 2004.
- [10] I. Rivero-Cruz, L. Acevedo, J. A. Guerrero et al., "Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 57, no. 9, pp. 1117–1126, 2005.
- [11] X. M. Cuevas Figueroa, "A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianaceae)," in *Ibugana*, pp. 27–47, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México, 2005.
- [12] A. G. Olivera Ortega, M. Soto Hernández, M. Martínez Vázquez, T. Terrazas Salgado, and F. Solares Arenas, "Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 68, no. 1–3, pp. 109–113, 1999.
- [13] M. Huerta-Reyes, M. D. C. Basualdo, F. Abe, M. Jimenez-Estrada, C. Soler, and R. Reyes-Chilpa, "HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 27, no. 9, pp. 1471–1475, 2004.

- [14] Z.-Q. Xu, W. W. Barrow, W. J. Suling et al., "Anti-HIV natural product (+)-calanolide A is active against both drug-susceptible and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 12, no. 5, pp. 1199–1207, 2004.
- [15] Y. Kashman, K. R. Gustafson, R. W. Fuller et al., "The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 35, no. 15, pp. 2735–2743, 1992.
- [16] M. S. Butler, "Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials," *Natural Product Reports*, vol. 25, no. 3, pp. 475–516, 2008.
- [17] J. C. García-Zebadúa, G. A. Magos-Guerrero, M. Mumbrú-Massip et al., "Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, Mexico," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 7, pp. 1027–1034, 2011.
- [18] INI, *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*, Instituto Nacional Indigenista, Mexico City, México, 1st edition, 1994.
- [19] A. Navarrete, B. Avula, V. C. Joshi, X. Ji, P. Hersh, and I. A. Khan, "Quantitative determination of triterpenes from *Amphipherygium adstringens* by liquid chromatography and thin-layer chromatography and morphological analysis of cuachalalate preparations," *Journal of AOAC International*, vol. 89, no. 1, pp. 1–7, 2006.
- [20] L. A. Collins and S. G. Franzblau, "Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, no. 5, pp. 1004–1009, 1997.
- [21] A. Jimenez-Arellanes, M. Meckes, R. Ramirez, J. Torres, and J. Luna-Herrera, "Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases," *Phytotherapy Research*, vol. 17, no. 8, pp. 903–908, 2003.
- [22] D. M. Kelly, A. M. C. Ten Bokum, S. M. O'Leary, M. P. O'Sullivan, and J. Keane, "Bystander macrophage apoptosis after *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra infection," *Infection and Immunity*, vol. 76, no. 1, pp. 351–360, 2008.
- [23] B. S. Min, Y. H. Kim, M. Tomiyama et al., "Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities," *Phytotherapy Research*, vol. 15, no. 6, pp. 481–486, 2001.
- [24] G. T. Tan, J. M. Pezzuto, A. D. Kinghorn, and S. H. Hughes, "Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase," *Journal of Natural Products*, vol. 54, no. 1, pp. 143–154, 1991.
- [25] J. L. Flynn and J. Chan, "Immunology of tuberculosis," *Annual Review of Immunology*, vol. 19, pp. 93–129, 2001.
- [26] C. R. Driver, S. S. Munsiff, J. Li, N. Kundamal, and S. S. Osahan, "Relapse in persons treated for drug-susceptible tuberculosis in a population with high coinfection with human immunodeficiency virus in New York City," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 33, no. 10, pp. 1762–1769, 2001.
- [27] S. Schwander, S. Rusch-Gerdes, A. Mateega et al., "A pilot study of antituberculosis combinations comparing rifabutin with rifampicin in the treatment of HIV-1 associated tuberculosis. A single-blind randomized evaluation in Ugandan patients with HIV-1 infection and pulmonary tuberculosis," *Tubercle and Lung Disease*, vol. 76, no. 3, pp. 210–218, 1995.
- [28] A. L. Pozniak, R. Miller, and L. P. Ormerod, "The treatment of tuberculosis in HIV-infected persons," *AIDS*, vol. 13, no. 4, pp. 435–445, 1999.