



UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**Estudio etnobotánico de *Calophyllum brasiliense*
Cambess (Guttiferae),**

**Anatomía de fruto, fitoquímica y evaluación de la
actividad antiviral de hojas y frutos**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
HORTICULTURA**

P R E S E N T A:

MARIA DE LA PAZ ALEJANDRA GONZÁLEZ PAREDES



Chapingo, México, septiembre 2006.



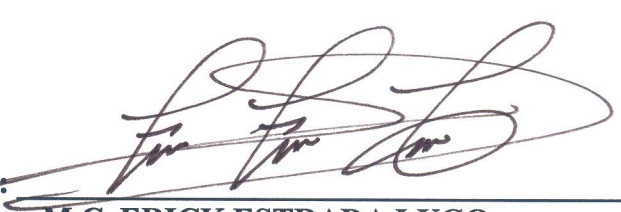
**Estudio etnobotánico de *Calophyllum brasiliense* Cambess,
(Guttiferae)**

**Anatomía de fruto, fitoquímica y evaluación de la actividad
antiviral de hojas y frutos**

Tesis realizada por **Maria de la Paz Alejandra González Paredes** bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:


M.C. ERICK ESTRADA LUGO

ASESOR:


DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

ASESOR:


M.C. POLICARPO ESPINOSA ROBLES

DEDICATORIA

Esta Tesis está especialmente dedicada a quienes no podemos ver, pero yo creo en ellos:
la Virgen de San Juan de Los lagos, la Virgen de Guadalupe, San Judas Tadeo y el
espíritu Santo, gracias a ellos por darme la luz para seguir en este camino y por que sé
que desde arriba ellos me van guiando; Ellos saben cuánto me ha acostado terminar la
Maestria así como la Tesis aún teniendo tantos quebrantos de salud.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el financiamiento mediante una beca crédito, con número de registro 184861 por el período de enero del 2004 a diciembre del 2005.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, por haberme permitido aprender más sobre algo diferente mi formación académica; le doy las gracias por que me llevo muchos conocimientos importantes.

Al **Departamento de Fitotecnia** y sus profesores por compartir sus conocimientos, ya que formaron parte de mi desarrollo profesional y académico.

Al **Instituto de Química de la UNAM**, por todo el apoyo que me brindaron con los espectros, materiales, pruebas biológicas, Maestros gracias a todo ellos.

Al **Colegio de Posgraduados** por los materiales de las técnicas histológicas del trabajo y a la Dra. Araceli Zavaleta, por sus recomendaciones para con el trabajo, y por dedicarme tiempo para esta tesis.

Al **Programa Universitario de Plantas Medicinales de la Universidad Autónoma Chapingo**, por el apoyo con una beca para poder terminar mis estudios de posgrado.

Un especial agradecimiento a alguien muy especial, a mi maestro y director de tesis el **M. C. Erick Estrada Lugo**, por compartirme y hacerme partícipe de su proyecto, por las enseñanzas que me dió, consejos, recomendaciones no tan sólo de la tesis sino con el resto de la maestría, gracias por ser no tan sólo el director de tesis sino también el amigo en los momentos difíciles.

Al **Dr. Ricardo Reyes Chilpa** hay alguien en especial que debería formar parte de mi comité tutorial, pero por cuestiones académicas no está aquí, pero le agradezco por su tiempo que me dedicó, su experiencia, recomendaciones para el desarrollo de la tesis y por facilitarme los materiales, es tanto lo que le agradezco y bueno, sé que no puedo considerarme como su amiga, pero en verdad yo lo he visto como un buen amigo, alguien en quien confiar y que admiro, para mí es un ejemplo de un buen investigador, gracias por todo el apoyo para este trabajo, fue el pilar de esta tesis muchas gracias.

Agradezco a mi maestro y asesor **Ph. D. Dr. Jaime Sahagún Castellanos**, por sus enseñanzas, por su tiempo, experiencia y valiosos comentarios.

Al **M.C. Policarpo Espinosa Robles** muchas gracias por su tiempo para asesorar este proyecto, y por su comprensión por sus sabios conocimientos en todo.

Al **M. C. Roman** por su gran disposición, apoyo, tiempo y comprensión en el desarrollo de la tesis y por sus acertados comentarios en la revisión de la misma.

Al **M.C. Jorge Alatorre** por su gran disposición, apoyo, tiempo y comprensión en el desarrollo de la tesis, muchas gracias por tu valiosa ayuda en todo.

Al **Dr. Ignacio Méndez Ramírez** le tengo que agradecer el seguir en la maestría por que me hizo darme cuenta que los diseños experimentales, no son tan difíciles como me lo plantearon otros profesores y que adora su profesión de enseñar, lo da a conocer con sus alumnos; Él es un claro ejemplo de una persona que sabe y da sus conocimientos a todo aquel que lo necesite, no necesariamente siendo alumno asesorado o no, gracias doctor por enseñarme los beneficios de la Estadística y de sus recomendaciones para la tesis.

Al **Dr. Luis Del Castillo**, quien tambien me ayudó a vencer esa adversidad con los diseños estadísticos que los biólogos valoramos mucho, por que él siendo biólogo se especializó en Estadística y hoy es buen maestro en eso, gracias por el apoyo.

Al **M. C. Alfredo Franco** por toda su ayuda prestada sobre aspectos Estadísticos y durante la maestria.

A **M. en C. Antonio Nieto** gracias por el apoyo brindado para las pruebas biológicas y por tu paciencia para la realización de esta, Tesis así como tus recomendaciones.

Al **M. C. Claudio Pérez** el apoyo, recomendaciones y tener siempre su buena disposición para con mi tesis.

A las personas que me ayudaron en la colecta en cada uno de los lugares de estudio: a Eladio Velasco la ayuda en la colecta de Veracruz, a Alma Luz García con junto su hermano Arturo por su apoyo para la colecta de Guerrero. A los profesores del laboratorio de plantas vasculares de la UNAM, por la primera colecta de Guerrero

A todas las personas de **“Fórmulas Herbolarias”**; a Leti Garcia por que siempre tus palabras de aliento para mi, ayudo en el desarrollo de la tesis.

Al dibujante **“Cuate”**, por la ayuda prestada por ayudarme en mis mapas, pero sobre todo por compartir sus experiencias y excelentes pinturas.

A **Lolita** por ayuda tan importante en esta tesis para su estructuración

A la **M.C. Araceli Lara Villalobos** juntas emprendimos este camino, ambas con tropiezos logramos salir adelante gracias por tu apoyo en todo momento y tu amistad.

A mis amigas que siempre han estado conmigo en los momentos importantes y difíciles en las aventuras que forman parte de mi familia; qué sería sin ustedes por darme su comprensión, gracias **Jacqueline, Elizabeth, Rocío, Andrea, Ofelia, Bety, Marielena,**

Elizabeth Lopez (Instituto de química), Eva y Pamela, por darme en todo su apoyo incondicional, gracias por seguir siendo mis amigas, ustedes saben que forman parte de algo muy importante en mi corazón.

A mi familia Bety, Chris, Estela, Fer, Enrique les agradezco el apoyo, a mi mamá Ana María por darme la vida que es lo más importante.

Y alguien que pronto será parte de mi familia y que quiero, a ustedes que siempre me aguantaron mis enojos, mis tristezas, y mi felicidad, gracias por quererme tanto **Adrián** y **Carmen**, también al hermanito sol **Ricardo**.

DATOS BIOGRÁFICOS

Nací un día 24 de Enero, en Puebla, Puebla, Estudié en la primaria escuela José Maria Mata, posteriormente entré a la Secundaria Enriqueta Camarillo Roa, de ahí entré a la preparatoria escuela particular Centro de estudios Universitarios Londres; entre a la UAM de Iztapalapa a la carrera de Biología Experimental, creo que hice una buena elección, me encantó la carrera sobre todo por que al final me incline por el área de farmacología en plantas medicinales, donde empecé con el proyecto de un árbol llamado *Calophyllum brasiliense* desde 1998, donde Identifiqué sus metabolitos secundarios, pero al parecer éstos tienen actividad para el cáncer, pero me faltó realizar las pruebas. Es por eso que decidí regresar a terminar ese proyecto que se quedó inconcluso y bueno, aprender más sobre su cultivo y de ahí que me incliné por la Universidad Autónoma Chapingo

**ESTUDIO ETNOBOTÁNICO DE *Calophyllum brasiliense* CAMBESS (GUTTIFERAE),
ANATOMÍA DE FRUTO, FITOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL
DE HOJAS Y FRUTOS**

**ETHNOBOTANIC STUDY OF *Calophyllum brasiliense* Cambess (Guttiferae), THE ANATOMY
OF THE FRUIT, PHYTOCHEMISTRY AND EVALUATION OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY
OF THE LEAVES AND FRUIT**

Maria de la Paz Alejandra González Paredes¹ Ricardo Reyes Chilpa² Erick Estrada Lugo³

RESUMEN

Se realizó un estudio de *Calophyllum brasiliense* Cambess, el cual consistió en 4 fases. En la primera, se visitaron algunos herbarios; con la información de las etiquetas se definió la distribución geográfica en la República Mexicana en mapas para factores ecológicos y culturales con coordenadas geográficas. Se distribuye en 8 Estados, en altitudes que van de los 200 a los 3000 m.s.n.m.; se hizo una exploración etnobotánica en los Estados de Veracruz y Guerrero. En Montepío, Veracruz, donde la gente la conoce como *cedrillo* y *ocú*, es principalmente de uso maderable y antiinflamatorio. En la localidad de El Paraíso, Guerrero, se encontró el nombre popular, *palo maría*, no registrado en la literatura, con usos medicinales antirreumáticos, antiinflamatorios, y donde el latex se usa como cicatrizante. La segunda fase fue la de anatomía de los frutos colectados de Guerrero y Veracruz, y se realizaron técnicas histológicas (H-E) Hematoxilina-Eosina. Se pudo comparar características anatómicas, siendo similares en su estructura, y se observaron del pericarpio, que la epidermis externa posee conductos secretores y el mesocarpio constituye la pulpa del fruto. En la tercera fase, se obtuvo un compuesto triterpeno del extracto de las hojas de la colecta de Guerrero. De los espectros de infrarrojo, compararon los espectros de IR de los extractos de hexano de las hojas y frutos se concluyó que los espectros fueron similares. Por otra parte, también se apreció que las principales diferencias se encuentran en la zona de los grupos hidroxilo (OH). Del material de Guerrero, se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas un triterpeno puro (β -Hidroxi-7-oxofriedelina). En la última fase, se realizó un bioensayo con una técnica lenti RT (Cavidi Tech), en donde los extractos de hexano, semilla y pericarpio (ambos partes del fruto) presentaron una actividad inhibitoria sobre la enzima RT-VIH-1 hasta de 100%, mientras que el extracto hexánico de hojas de Guerrero, fue de 76.8% de inhibición. De acuerdo a lo anterior, *C. brasiliense* podría ser una fuente natural de (+)-Calanolido A, el cual es un inhibidor de la transcriptasa reversa (RT) del VIH-1.

Palabras clave: *Calophyllum brasiliense*, Guttiferae, etnobotánica, transcriptasa reversa, triterpeno VIH-1. a

¹Tesista / Thesis author

²Asesor/Advising, ³Director de tesis/ Thesis director

ABSTRACT

A four-phase study of *Calophyllum brasiliense* Cambess was done. The first phase involved visits to herbariums during which geographical distribution in Mexico was determined from the labels on existing samples. Then, using the information gathered in the herbariums, ecological and cultural factors, as well as geographical coordinates, were put on maps. The plant is distributed in eight states, at altitudes of from 200 to 3000 m.s.n.m. Ethnobotanical research was done in the two states of Veracruz and Guerrero. In Montepio, Veracruz, the people call it *cedrillo* and *ocú* and use it mainly for timber and as an anti-inflammatory agent. The next site was Paraíso, Guerrero where it is given the popular name of *palo maría*, a name that is not found in any literature, and it is used medicinally as an antirheumatic and anti-inflammatory agent, while its latex is used as a cicatrizant. In the second phase, the anatomy of the fruit collected in Guerrero and Veracruz was determined using Hematoxiline-Eosin histological techniques. The similarly structured anatomical characteristics were compared and demonstrated that the external epidermis has secreting conducts in the pericarp and that the mesocarp is made up of the fruit pulp. In the third phase, a triterpene compound was obtained from the Guerrero leaf extract collection. In this same phase, the infrared spectrum compared the IR spectrums of the hexane extracts from the leaves and fruit that were collected. In general terms, it was concluded that the spectrums were similar. On the other hand, it was noted that the main differences are found in the hydroxyl (OH) groups. Pure triterpene (β -Hydroxyl-7-oxofriedelina) was characterized from the material from Guerrero through spectroscopic techniques. In the last phase, a biotest was done with the lenti RT (Cavidi Tech) technique in which the hexane seed and pericarp extracts (both parts of the fruit) caused up to a 100% inhibitory response in the RT-VIH-1 enzyme, while the hexanic leaf extract from Guerrero caused a 76.8% inhibitory response. According to the previous information, *C. brasiliense* could be a natural source of (+)-calanolide A, which is a reverse transcriptase inhibitor (RTI) for HIV-1.

Key words: *Calophyllum brasiliense*, Guttiferae, ethnobotany, reverse transcriptase, triterpene, HIV-1.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ii
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Particulares	3
3. HIPÓTESIS GENERAL	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)	5
4.1.1. Epidemiología de la infección VIH-1	5
4.2. Virus de inmunodeficiencia tipo 1 (VIH-1)	6
4.2.1. Origen de los lentivirus humanos.....	6
4.2.1.1. Virus Tipo 1	7
4.3. Transcriptasa Reversa (TR)	8
4.4. Diagnóstico Viroológico	10
4.5. El ciclo de replicación del VIH-1	10
4.6. Fármacos para el VIH/SIDA.....	16
5. METABOLISMO DE LAS CUMARINAS EN PLANTAS	20
5.1. Rutas Biosintéticas	21
5.2. Origen Biosintético de las Cumarinas.....	24
5.3. Distribución de las Cumarinas	26
5.3.1. Propiedades	28
5.3.2. Principales Cumarinas.....	30
5.3.3. Derivados de las Cumarinas.....	30

5.3.3.1. Gamma-Pirano :	30
5.3.3.2. Importacia de los Flavonoides en Fitoterapia	33
5.3.3.3. Derivados del Fenil-2-Cromano: Catequinas y Leucoantocianinas.....	34
5.3.3.4. Derivados del Fenil-2-Benzopirilo: Las Antocianinas.....	34
5.4. Plantas con componentes anti-VIH en el mundo	35
5.4.1. Plantas Mexicanas de la familia Clusiacea con actividad Anti-VIH	39
6. ANTECEDENTES DE <i>Calophyllum brasiliense</i>	41
6.1. Taxonomía	41
6.1.1. Morfología	42
6.1.2. Distribución y Ecología	44
6.1.3 Etnobotánica (usos).....	45
6.1.3.1. Medicinales	45
6.1.3.2. Industriales	45
6.1.4. Fitoquímica	46
6.1.4.1. Frutos	46
6.1.4.2. Hojas	47
6.1.4.3. Corteza	49
6.1.4.4. Resina.....	50
6.1.4.5. Madera	50
6.2. Aspecto Económico	54
6.2.1. Evaluación económica comparada con medicamentos antivirales	56
7. CARACTERÍSTICAS DEL ÁREA DE ESTUDIO	57
7.1. Localización de San Andrés Tuxtla, Veracruz.....	57
7.1.1. Geología	57
7.1.2. Orografía	57
7.1.3. Hidrografía	58
7.1.4. Clima	58

7.1.5. Clasificación y uso del suelo.....	59
7.1.6. Flora y Fauna	59
7.1.7. Agricultura	59
7.1.8. Grupos étnicos.....	59
7.2. Localización de Atoyac de Álvarez, Guerrero.....	59
7.2.1. Geología	60
7.2.2. Orografía	60
7.2.3. Hidrografía	61
7.2.4. Clima	61
7.2.5. Clasificación y uso del suelo.....	61
7.2.6. Flora y Fauna	61
7.2.7. Agricultura	62
7.2.8. Grupos étnicos.....	62
8. METODOLOGÍA	64
8.1. Exploración Etnobotánica	64
8.1.1 Revisión Bibliográfica (Gabinete)	64
8.1.2. Entrevistas	64
8.1.3. Colectas del material Biológico	65
8.1.4. Colecta de material edáfico.....	65
8.2. Trabajo de laboratorio :.....	66
8.2.1. Anatomía del fruto <i>C. brasiliense</i>	66
8.2.2. Estudio Fitoquímico y Biológico	67
8.2.3. Preparación de extractos	67
8.2.4. Análisis por Cromatografía en capa fina.....	68
8.2.5. Constantes Físicas	70
8.2.6. Espectroscópicos.....	70
8.2.7. Evaluación biológica.....	70
8.2.7.1. Análisis Estadístico	72
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74

9.1. Trabajo de Gabinete	74
9.1.2. Distribución Geográfica.....	74
9.2. Exploración etnobotánica en Veracruz	81
9.2.1. Exploración etnobotánica de Catemaco, Veracruz	81
9.2.2. Exploración etnobotánica en San Andrés Tuxtla, Veracruz	81
9.2.3. Exploración etnobotánica en Montepío, Veracruz.....	82
9.2.4. Exploración etnobotánica en el Municipio de Atoyac de Álvarez, Guerrero.....	83
9.2.5. Exploración etnobotánica en el Municipio del Paraíso, Guerrero	84
9.3. Análisis de suelo	85
9.4. Trabajo de laboratorio	89
9.4.1. Anatomía de los frutos de <i>C. brasiliense</i>	89
9.4.2. Estudio Fitoquímico y Biológico	93
9.4.2.1. Rendimiento de los extractos	93
9.4.2.2. Análisis por Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	94
9.4.2.2.2. Colecta de los Tuxtlas: Semilla y Pericarpio	94
9.2.3. Análisis Espectroscópico	96
9.2.3.1. Infrarrojo (IR)	96
9.2.3.2. Resonancia Magnética de Nuclear de Protones (RNMP)	96
9.2.3.3. Colecta de Guerrero: Hojas.....	97
9.3. Evaluación biológica.....	97
10. CONCLUSIONES	101
11. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	102
12. PERSPECTIVAS	102
13. BIBLIOGRAFÍA	103
14. ANEXOS	111

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de infección con VIH.....	17
Cuadro 2.	Compuestos del metabolismo de la plantas	20
Cuadro 3.	Metabolitos secundarios.....	22
Cuadro 4.	Especies que contienen cumarinas	30
Cuadro 5.	Algunos productos naturales de origen vegetal con actividad anti –VIH-1.....	36
Cuadro 6.	Cumarinas aisladas del género <i>Calophyllum</i> inhibidoras de la DNA polimerasa dependiente de RNA tipo I (transcriptasa reversa) enfermedad viral.	38
Cuadro 7.	Sondeo de actividad inhibitoria Transcriptasa Reversa del Virus de Inmunodeficiencia tipo 1 de los extractos CH ₂ Cl ₂ -MeOH (50µg/ml) de las Clusiaceae mexicanas	40
Cuadro 8.	Nombres comunes de <i>Calophyllum brasiliense</i> en México.	44
Cuadro 9.	Compuestos aislados de <i>Calophyllum brasiliense</i>	52
Cuadro 10.	Rendimiento de la Biomasa de la Copa de <i>Calophyllum brasiliense</i>	54
Cuadro. 11.	Rendimiento de extractos obtenidos de la hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i>	55
Cuadro 12.	Precios de los medicamentos Antiretrovirales	56
Cuadro 13.	Muestras analizadas por cromatografía en capa fina en fase normal y fase de reversa.....	69
Cuadro 14.	Factores ambientales y/o culturales de la distribución geográfica de <i>Calophyllum brasiliense</i>	78
Cuadro 15.	Resultados de las entrevistas realizadas en Catemaco, Veracruz, el 4 de febrero del 2006.....	81
Cuadro 16.	Resultados de las entrevistas realizadas en San Andrés Tuxtla, el 4 de febrero del 2006.	82
Cuadro 17.	Resultados de las entrevistas realizadas en Montepío Veracruz, el 4 de febrero del 2006.....	82

Cuadro 18.	Resultados de las entrevistas realizadas en Atoyac de Álvarez, el 18 de marzo del 2006.	83
Cuadro 19.	Resultados de las entrevistas realizadas en el Paraíso, el 19 de marzo del 2006.	84
Cuadro 20.	Los resultados del análisis son los siguientes en San Andrés Tuxtla, Veracruz:	85
Cuadro 21.	Los resultados del análisis son los siguientes en el Paraíso, Guerrero:	87
Cuadro 22.	Rendimiento de los extractos de <i>Calophyllum brasiliense</i>	93
Cuadro 23.	Cronogramas con los frentes de referencia de los extractos de <i>Calophyllum brasiliense</i>	95
Cuadro 24.	Extractos de <i>Calophyllum brasiliense</i> En este caso en sus $t_{calculadas}$ se rechaza H_0 ya que sólo en 2 muestras de extracto hexánico que son la semilla y el pericarpio resultaron con inhibición y no se rechaza la hipótesis alternativa ya que el resto no tuvieron inhibición con un nivel de significancia del 1 %.	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución a nivel mundial de las personas infectadas por el virus, datos de 2006.	6
Figura 2.	Virión maduro de VIH tipo.....	8
Figura 3.	Transcriptasa Reversa de VIH-1	9
Figura 4.	Ciclo Replicativo del VIH tipo 1	11
Figura 5.	Metabolismo general de las plantas lo podemos esquematizar de la siguiente manera.....	23
Figura 6.	Las cumarinas muestran la ruta del ácido shikímico de acuerdo a la secuencia presente.	25
Figura 7.	Las cumarinas son derivados de benzo- α -pirona. Muchas de ellas son fenólicas, por lo que se incluyen dentro de los derivados fenólicos.....	27
Figura 8.	Xantonas y sus sutituyentes isoprenilo(2,2 dimetilalil). b)substituyente cromeno producto de la ciclización del isoprenilo con un OH fenólico de la xantona.....	33
Figura 9.	Células linfoblásticas T humanas infectadas, y al lado se encuentra (+)-12-metoxicalanólido A aislado de de un extracto de frutos y brotes de <i>Calophyllum lanigerum</i> var. <i>austrocoriaceum</i> , donde por primera vez se probaron en este tipo de compuestos las propiedades anti-VIH, en estas células linfoblásticas T.....	37
Figura 10.	Árbol de <i>Calophyllum brasiliense</i>	42
Figura 11.	Corteza del tronco del árbol de <i>calophyllum brasiliense</i>	42
Figura 12.	Se presentan a) frutos recién de colectados, b) se observan las diferentes capas desde el fruto : pericarpio, exocarpio, mesocarpio, endocarpio hasta la semilla.	43
Figura 13.	Cumarinas aisladas de los Frutos de <i>Calophyllum brasiliense</i> colecta en Santa Martha, Veracruz	47
Figura 14.	Cumarinas, ácidos y triterpenos aislados de las hojas de <i>C. brasiliense</i> colecta en Santa Martha, Veracruz.	48
Figura 15.	Cumarinas aisladas de las hojas <i>Calophyllum brasiliense</i> colecta en San Andrés Tuxtla, Veracruz	49
Figura 16.	Cromanona aisladas de la resina de <i>Calophyllum brasiliense</i>	46
Figura 17.	de Xantonas.....	51
Figura 18.	Ubicación y localización de la zona de estudio San Andrés Tuxtla Veracruz.....	58
Figura 19.	Ubicación y localización de la zona de estudio Atoyac de Álvarez Guerrero.....	60

Figura 20.	Función de la actividad de la transcriptasa reversa con cada uno reactivos del Kit lenti RT.....	71
Figura 21.	Distribución geográfica de <i>Calophyllum brasiliense</i> en México.	75
Figura 22.	Distribución geográfica de <i>Calophyllum brasiliense</i> en Latinoamérica.....	77
Figura 23.	Fruto de <i>Calophyllum brasiliense</i> : a) Fruto b) pericarpio cortado transversalmente.....	90
Figura 24.	Cortes anatómicos transversales del pericarpio de <i>Calophyllum brasiliense</i> : c)EP.-Epidemis externa, TS.-Tejido Subdérmico y d i) exocarpio , ii) mesocarpio y iii) endocarpio(exepto b, no se observa). En d) C.-Canales resiníferos, L.-lignificación, H-haces vasculares, P.-parenquima.....	92
Figura 25.	Cortes anatómicos transversales del pericarpio de <i>Calophyllum brasiliense</i> : f) mesocarpio: P parenquima y D Drusas y g) H.- Haces vasculares (xilema y floema) los cuales se encuentras en los 3 tejidos.	92
Figura 26.	Placa cromatografía de capa fina observadas: m) bajo luz UV en onda larga (365 nm), y n) sulfato cérico. Extractos de hexano de muestras de <i>Calophyllum brasiliense</i> . (Cada uno de los carriles se encuentran en la tabla).....	95
Figura 27.	Placa cromatografías en: r) fase reversa revelada con Sulfato Cérico y s) Luz UV onda larga (365 nm). Extractos de hexano de muestras de <i>Calophyllum brasiliense</i>	96
Figura 28.	Gráfica de lo extractos que tuvieron inhibición de la transcriptasa reversa.....	98
Figura 29.	Gráfica de lo extractos que no tuvieron inhibición de la transcriptasa reversa	99

1. INTRODUCCIÓN

Desde los tiempos más remotos, la humanidad ha usado plantas para curar sus enfermedades y aliviar sufrimientos físicos y espirituales; ha desarrollado un cúmulo de conocimientos sobre las plantas medicinales derivado de la experiencia; en todas las civilizaciones ha habido mucho interés en las plantas medicinales, por constituir la principal herramienta terapéutica.

México es uno de los cinco países con mayor diversidad vegetal a nivel mundial, con más de 30, mil especies, después de Brasil, Colombia, Perú y Venezuela.

Nuestro país ocupa actualmente el segundo lugar con 3352 especies con uso medicinal, después de China con 5000 plantas medicinales. Estas cifras se refieren a los inventarios taxonómicamente generales en donde se registran para cada planta la familia, el género y la especie (Estrada, 1999).

Investigaciones etnobotánicas recientes indican, de acuerdo con Estrada que de la vegetación total del área de influencia en las comunidades al menos el 50 % tiene algún uso medicinal, por lo que México puede llegar a tener 15, 000 plantas medicinales, aunque el día de hoy sólo tengamos registradas taxonómicas un poco más de la quinta parte.

Hemos observado que la medicina tradicional, a nivel general, en cada cultura, es una institución social dinámica que todos los días incorpora nuevos ingredientes a sus terapéuticas y deshecha otros; ya sea por que no se encontró uno más eficaz, o por que se han escaseado los de uso cotidiano. La herbolaria mexicana está basada en más de 99% en plantas silvestres autóctonas, cuyos conocimientos acerca de sus usos fueron generados, en su mayoría, por los indígenas prehispánicos (Estrada, 1999).

Los productos naturales han proporcionado sustancias químicas útiles para tratamiento del SIDA, Cancer, etc.; además de constituir moldes para el diseño de nuevos fármacos, como una alternativa a la medicina alópata. Los productos naturales antiVIH presentan una gran diversidad estructural: alcaloides, polisacáridos sulfatados, carbohidratos, cumarinas, taninos, derivados de ácidos fenólicos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, iridoides, lignanos, xantonas, tiofenos, saponinas. Dentro de los productos de origen

natural se han encontrado los compuestos pertenecientes a la familia de las cumarinas y en especial el (+)- calanólido A es un inhibidor potente de la RT del VIH-1 (Transcritasa Reversa del Virus tipo-1), pero es inactivo contra la RT del VIH-2 (Sarawak MediChem Pharmaceuticals, Inc, 2004). El (+)- Calanólido A fue aislado por primera vez de los brotes y frutos del árbol tropical *Calophyllum lanigerum* de Malasia por investigadores del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos como parte de estudios bioprospectivos. Se describieron sus propiedades anti VIH mediante ensayos in vitro de viabilidad celular con células humanas infectadas (Kashman et al, 1992);

Recientemente se encontró que el árbol de las Selvas Tropicales de México *Calophyllum brasiliense* presenta dos poblaciones; esto se pudo determinar por medio de colectas en diferentes lugares, en donde se pudo observar que difieren en la composición química de las hojas. La primera, llamada Quimiotipo 1 colectada en Santa Martha, Veracruz, contiene cumarinas tipo mammea, las cuales son características en especies del género *Mammea*, estas mostraron efecto citotóxico sobre líneas tumorales K562 (linfoma), U251(sistema nervioso central) y PC3 (próstata) (Reyes et al, 2004). La segunda, llamada Quimiotipo 2 colecta en San Andrés Tuxtla, Veracruz, contiene cumarinas tetracíclicas, como el (+)-Calanólido A, así como otros compuestos relacionados, (-)-calanólido B, (+)-calanólido C y soulattrólido, los cuales son inhibidores de la enzima transcriptasa reversa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (RT-VIH-1) (Huerta Reyes, *et al*, 2004). Dichos compuestos se encuentran en bajas concentraciones en el extracto hexánico de las hojas, donde están presentes como constituyentes mayoritarios otros compuestos inactivos contra la RT-VIH-1, como el ácido apetalico y los triterpenos friedelina y canofilol.

Debido a lo anteriormente mencionado, el presente trabajo tiene como propósito fundamental estudiar otras regiones para determinar si existen diferencias en quimiotipos; además faltan estudios sobre los frutos de dicha especie, por eso se ha planteado estudiar la regiones de Guerrero y Veracruz, para lo cual es necesario realizar estudios etnobotánicos, anatómicos, químicos y biológicos. Se han planteado los siguientes objetivos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Contribuir al estudio etnobotánico de *Calophyllum brasiliense*, así como al conocimiento de su anatomía, fitoquímica y actividad antiviral de los frutos y hojas de ejemplares de México.

2.2. Objetivos Particulares

- 1) Elaborar un mapa de distribución geográfica de *C. brasiliense* con base en los ejemplares de herbario y bibliografía.
- 2) Describir la anatomía del pericarpio de frutos de *C. brasiliense*.
- 3) Determinar al menos uno de los compuestos químicos nuevos para la especie, presentes en hojas de *C. brasiliense*.
- 4) Evaluar el efecto antiviral de los extractos obtenidos de hoja y frutos de *C. brasiliense*, de manera *in vitro* a través de bioensayos lenti RT.

3. HIPÓTESIS GENERAL

Los principios activos antivirales, en hoja y fruto de *Calophyllum brasiliense* son los mismos.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)

4.1.1. Epidemiología de la infección VIH-1

La epidemia global (pandemia) de la infección por VIH-1 está creciendo con mucha rapidez en las naciones del Sur-Este de Asia y en el subcontinente de la India, aunque el mayor número de personas infectadas sigue estando en el África subsahariana, así como también en Latinoamérica (1.8 millones) (figura 1). En México informan de cerca de 45,000 nuevos casos de SIDA cada año. En el 2006 los casos de mexicanos con SIDA suman ya 118 mil personas, de los cuales el 40% son mujeres y por cada mil personas adultas en nuestro país, tres de ellas podrían ser portadoras (0.3%) del VIH.

El SIDA ocupa el lugar décimo sexto lugar como causa de muerte en nuestro país, pero constituye la cuarta causa de muerte en hombres y la séptima entre las mujeres de la población entre 25 a 34 años de edad (Secretaría de Salud, México, 2006). El SIDA en México se ha definido como un problema de seguridad nacional, por lo cual es de suma importancia llevar a cabo investigaciones que puedan aportar nuevas sustancias inhibitorias de VIH con toxicidad diferente que pudieran ofrecer alternativas en la terapia contra el VIH/SIDA.

En México, al igual que en otros países, el SIDA se ha convertido en un problema de salud pública complejo, debido también a que algunos inmigrantes regresan a su lugar de origen infectados, con repercusiones psicológicas, sociales, éticas, económicas y políticas que rebasan el ámbito de la salud, por lo que es importante trabajar de manera multidisciplinaria con diferentes sectores de la sociedad y la coordinación de instituciones, para poder combatir este problema.

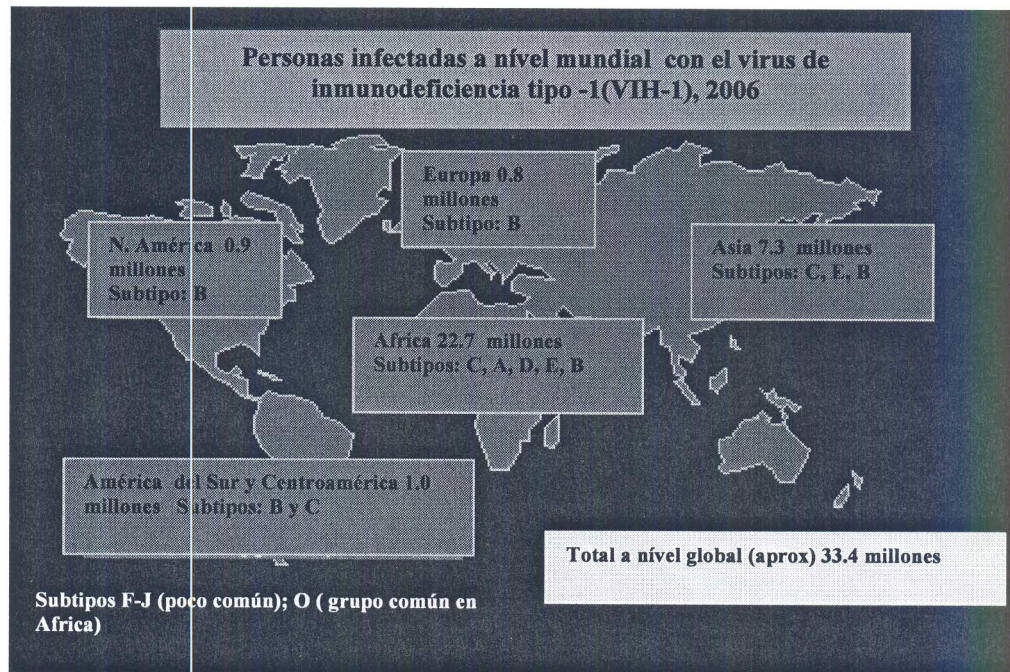


Figura 1. Distribución a nivel mundial de las personas infectadas por el virus a penas datos de 2006. <http://www.urmc.rochester.edu/smd/mbi/grad2/VHI99A.html>

4.2. Virus de inmunodeficiencia tipo 1(VIH-1)

4.2.1. Origen de los lentivirus humanos

Estudios filogenéticos de los lentivirus de los primates han aportado pruebas evidentes de que el VIH-1 está muy relacionado con el virus que de modo natural infecta a los chimpancés (SIV_{cpz}), mientras que el VIH-2 está más relacionado con el virus que infecta a los monos mangabey (SIV_{smm}). **Se cree que ha habido una transferencia de los virus que producen inmunodeficiencia, de los monos a los humanos**, con el resultado de la infección emergente del VIH-1 y VIH-2, argumento reforzado por el hecho de que los monos tiznados mangabey residen en la misma región en que la infección por VIH-2 es más prevalente.

No sólo es posible de que los virus VIH-1 y VIH-2 han evolucionado de los lentivirus de los simios, sino que también hay evidencia de otras transferencias aisladas de simios a monos, que han dado lugar a cepas genéticamente distantes de VIH-1. Por ejemplo, el subgrupo **O del VIH-1** (**O = Outgroup**, fuera del grupo), son diferentes de todas las

demás cepas de VIH-1, y se cree que han derivado de un diferente ancestro. Por lo que el VIH-1 y VIH-2 se pueden calificar como **infecciones emergentes**.

4.2.1.1. Virus Tipo 1

El VIH pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia Lentivirinae, **presentan un diámetro característico de 100-120nm**. El VIH es relativamente termosensible. Se inactiva cuando es expuesto a 56 °C durante 30 minutos. Se trata de un retrovirus **cubierto por una membrana que rodea a la cápside y a la nucleocápside de forma cónica** capaces de cambiar en forma constante. Este retrovirus puede alojarse en un segmento del cromosoma y permanecer latente durante muchas generaciones celulares.

El genoma de VIH tipo 1 consta de sólo 3 genes que codifican para proteínas estructurales: gag, pol y env. Estas proteínas estructurales son inicialmente sintetizadas como precursores de poliproteínas y subsecuentemente son procesadas por proteasas virales ó celulares en partículas maduras. El precursor GAG Pr55 tiene como productos las proteínas de la matriz (MA) p17, cápside (CA) p24, nucleocápside (NC) p7 y p6. **Particularmente este tipo de lentivirus, las partículas maduras de VIH (Figura 2) partículas virales típicamente esféricas.**

Por otra parte, la autocatálisis del precursor Gag-Pol Pr160, da como resultado **2 copias de ARN (de polaridad positiva) y las enzimas transcriptasa reversa (TR) de esta enzima requiere para multiplicarse, proteasa (PR) e integrasa (I)**. Mientras que la digestión proteolítica por enzimas celulares convierte el precursor Env gp160 en las proteínas de superficie (SU) gp120, y la transmembranal (TM) gp41 (Figura 2). La restantes 6 genes (Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu y Nef) codifican para proteínas accesorias que participan en procesos de regulación de la expresión/ replicación viral y que son productos de la traducción primaria del procesamiento de ARNm. La variabilidad química de este virus ha complicado la investigación tanto para su tratamiento como para el desarrollo de una vacuna efectiva. Estado de portación: es imprevisible, puede ser de 7 a 9 años, o más (Evans L. A., 1993; Freed E. O. y Martin M. A., 2001).

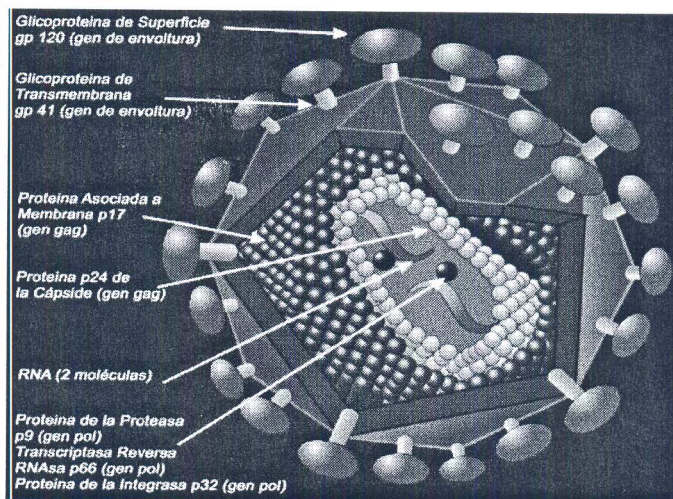


Figura 2. Virión maduro de VIH tipo

4.3. Transcriptasa Reversa (TR)

La enzima TR de VIH-1 es un heterodímero de 2 subunidades de 66 (p66) y 51 KDa (p51). La subunidad p51 es derivada de la subunidad p66 como producto de la remoción proteolítica de 15kDa de p66 llevada a cabo por las partículas virales del VIH detectables en sangre (PR de VIH -1) (Freed. E. O., Martin M. A., 2001) (Figura 3). La estructura cristalina muestra un plegamiento asimétrico en el cual las orientaciones de p66 y p51 difieren sustancialmente (Jacobo-Molina A., *et al*, 1991; Arnold E., *et al* 1992; Kohlstaed L. A., *et al*, 1992).

La subunidad p66 puede ser visualizada con fines didácticos como una mano derecha (vista con la palma hacia arriba) que incluye el sitio activo de la polimerasa, conformado como una marcada hendidura formada por los dominios de la “palma”, “dedos” y “pulgar” (Jacobo-Molina A., *et al*, 1993). El dominio de la polimerasa, está unido a la ARNasa por el subdominio de conexión. El sitio activo, localizado en la “palma”, contiene 3 residuos de ácido aspártico (D) determinantes: D110, D185, D186, que se localizan muy próximos entre sí y en coordinación de 2 iones de Mg^{2+} (Huang H., *et al*, 1997).

Mutaciones de estos residuos de D anulan la actividad de polimerasa de la TR. La subunidad p51 muestra una estructura rígida que no forma parte de la hendidura de polimerización (Arnold E., *et al* 1992; Flint S. J., 2000).

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

La TR presenta una alta tasa mutación durante la replicación, debido a que carece de un sistema de exonucleasa para la reparación y muy frecuentemente, el molde que sirve como base para la TR, cambia durante la transcripción reversa (Evans L., A., 1993; Coffin J. M., 1995). La tasa del total de mutaciones *in vivo* de VIH-1 que comprende sustituciones, cambios en el marco de lectura, detecciones simples y deleciones con inserciones, se calcula en 3×10^{-5} por el ciclo replicativo. De la misma manera, las tasas de mutaciones *in vivo* de otros retrovirus (como BLV y MuLV) se observaron entre 2 y 10 veces menores que las de VIH-1 (Mansky L. M., 1996)

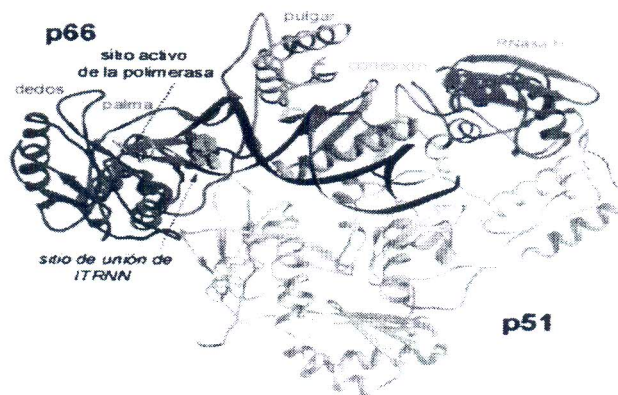


Figura 3. Transcriptasa Reversa de VIH-1

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

4.4. Diagnóstico Viroológico

Se basa en una detección de anticuerpos específicos contra el VIH-2. Detección del antígeno circulante o de ácidos nucleicos del VIH-3 aislamiento del virus. Para efectuar el diagnóstico serológico, cada muestra debe procesarse por 2 técnicas de screening y confirmada mediante IFI (inmunofluorescencia indirecta) y/o Western blot. Según el protocolo de diagnóstico serológico de la OPS/OMS, toda muestra positiva para una prueba de tamizaje realizada en un banco de sangre o en un laboratorio periférico, debe ser remitida a un laboratorio de referencia. La técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y del cultivo viral están reservadas para laboratorios de investigación y de alta complejidad.

4.5. El ciclo de replicación del VIH-1

El ciclo de replicación del VIH-1, un retrovirus del género lentivirus, es regulado tanto por proteínas virales como celulares y se puede dividir en dos fases: una fase temprana que comienza con el reconocimiento de la célula blanco por el virión maduro gracias a la interacción de receptores de la membrana celular (CD4+) con la proteína viral gp120; este proceso no es suficiente para la entrada del virus, por lo cual necesita de los correceptores celulares CXCR4 o CCR5, que se unen específicamente con la proteína viral gp41³⁷. Una vez en el interior de la célula el ARN viral es transcrito en una molécula de ácido desoxiribonucleico (ADN) de doble cadena, gracias a la enzima viral transcriptasa reversa (Figuras 3 y 4).

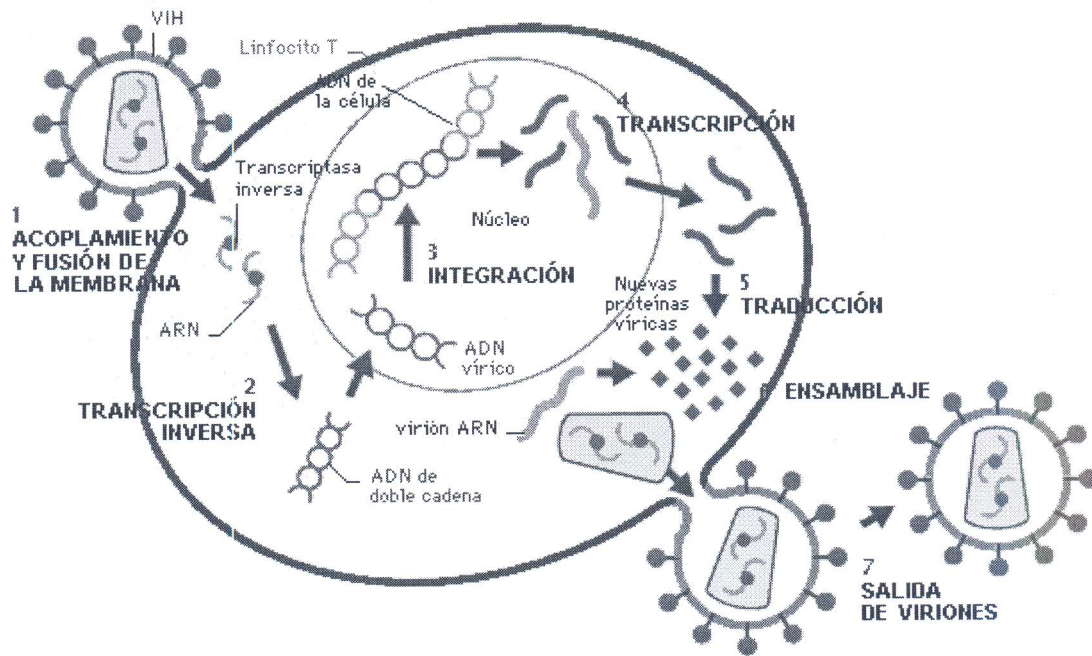


Figura 4. Ciclo Replicativo del VIH tipo 1

Por alguno de los mecanismos de transmisión conocidos el VIH-1 penetra en el organismo y llega a las células linfoides. Existen dos tipos de células humanas que son blanco principal de la infección VIH, los linfocitos T CD4 y los macrófagos de los tejidos. Como consecuencia de la llegada a las células diana se ponen en marcha un conjunto de procesos que tienen como finalidad ocasionar la entrada del virus en la célula y la utilización de los mecanismos bioquímicos de ella para poderse replicar y dar lugar a nuevos virus. El conjunto de los fenómenos que acontecen se conoce como ciclo biológico o vital del VIH y los mecanismos íntimos que lo componen presentan una enorme complejidad de interacciones entre el virus y su hospedador que no son totalmente conocidas en la actualidad y se presentan de un modo esquemático en la Figura 4.

Para que el VIH penetre en la célula se debe producir la fusión de las membranas viral y celular. La entrada del VIH-1 en la célula se produce por la interacción del virus con al menos dos tipos de receptores. El receptor específico y común a todos los VIH-1 es una proteína que se encuentra en la superficie de las células diana y que se denomina molécula CD4. Se cree que esta molécula CD4 (no confundir con el linfocito CD4) es

específica y eficiente y que la afinidad de la gp120 viral por la CD4 es mayor que la afinidad de ésta por su ligando natural, una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II. Las principales células que poseen este receptor son los linfocitos y los monocitos/macrófagos (CD4+), aunque '*in vitro*' otros tipos celulares pueden ser infectados por el VIH y no todos ellos poseen la molécula CD4 (CD4-). Los linfocitos CD8 no expresan en condiciones normales el receptor CD4 pero se sabe que tras la infección de determinados virus como el herpesvirus humano tipo-6 (HHV-6) si pueden expresarlo.

Más recientemente se han caracterizado otros correceptores del virus como son los receptores celulares del tipo CC o CXC de ciertas **quimioquinas**. El correceptor CCR5 es fundamentalmente utilizado por las cepas del VIH con tropismo por los monocitos (monocitotrópicas) mientras que el CXCR4 lo es por las que presentan linfocitotropismo; este receptor CXC también se denomina fusina y su ligando natural es el SDF-1. Se cree que las cepas inductoras de sincitios pueden utilizar ambos correceptores, aunque fundamentalmente utilicen los CXCR4. Otros receptores como el CCR3 podrían ser utilizados por las cepas en las personas que no expresan los anteriores receptores. Se cree que existen algunas sustancias, que se han denominado intracinas, que son capaces de bloquear la expresión de los correceptores a nivel intracelular. También pueden actuar como receptores los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas y receptores del complemento utilizados por complejos antígeno-anticuerpo. La presencia en la superficie viral de material celular como los antígenos HLA o la beta2-microglobulina permiten que al ponerse en contacto virus y células la unión se realice a través de zonas de adhesión que permiten la unión gp120-CD4 en los linfocitos o de la gp120-fusina en células del epitelio rectal e incluso al receptor Gal-C de algunas células del sistema nervioso, células que probablemente presenten más receptores.

La existencia en el virión de algunas enzimas como la ciclofilina se piensa que permite la interacción con las proteínas de la cápside facilitando la denudación viral y en este sentido se han ensayado derivados de la cicloserina A sin acción inmunosupresora, que ejercen acción sobre la ciclofilina, como posibles antirretrovirales este ciclo replicativo se llevará acabo en una serie de pasos (Cob P., *et al.*, 2004) (Figura 4).

1) Una vez que tiene lugar la interacción entre la gp120 y los receptores se produce la fusión entre las membranas de la célula y del virus que tiene como responsable a la gp41 que se insertará en la membrana celular permitiendo la internalización de la nucleocápside del virus y la desencapsidación de su genoma (Figura.4)

Tras la entrada se inicia la reproducción del virus (replicación) por transcripción inversa o retrotranscripción **2) mediada por la transcriptasa inversa del virión** y que conduce a la formación de la primera cadena del ADN a partir del ARN viral. La segunda cadena del ADN requiere la acción de la ribonucleasa H. La doble cadena así generada es integrada **3) por medio de la integrasa viral en el ADN de la célula**, aunque parte del ADN formado puede persistir en el citoplasma de la célula sin integrarse dentro del genoma celular. La integración del ADN proviral en el genoma celular puede depender del estado de activación de la célula, pero parece ser inespecífica. Se cree que en los linfocitos este ADN no integrado podría producirse por la entrada de múltiples viriones en la célula; se sabe que la copia del material genético del VIH como ADN se almacena en el citoplasma de la célula (latencia preintegración) y se va integrando en los cromosomas de la célula a medida que pasa el tiempo y como consecuencia de estímulos sobre la célula (este fenómeno podría explicar en parte las infecciones silentes y ser base para la preparación de vacunas con ADN desnudo). A pesar de que el VIH puede infectar linfocitos quiescentes, en éstos la transcriptasa inversa y la integrasa no parecen ser eficientes y se suele producir un estadio preintegración con ADN proviral fundamentalmente extracromosómico o complejos ARN/ADN con transcripción inversa incompleta que guardarían la capacidad de integrarse con posterioridad.

El proceso de retrotranscripción y de integración no solo depende de los factores del VIH ya que en ellos juega un papel importante la propia activación celular.

Una vez integrado en el material genético de la célula el provirus puede permanecer latente o empezar a multiplicarse de una forma controlada o de una forma masiva, en cuyo caso ocasionará efectos citopáticos sobre la célula mientras que en la latencia, producida tras la integración del provirus, no se producen alteraciones patológicas. La activación celular por diferentes factores, como antígenos, mitógenos, citoquinas o virus heterólogos pueden activarla y producir una cascada de acontecimientos que llevan a la

expresión del genoma viral; estos factores, entre los que el NF- κ B es el principal factor regulador de la transcripción del VIH a partir de su estado de latencia, llevan a una nueva transcripción **4) que supone la síntesis de ARN del virus a partir del ADN** proviral integrado en la célula. Este ARN se sintetiza como un único transcrito que debe volver al citoplasma de la célula para procesarse en transcritos de diferente tamaño y en los que son fundamentales las proteínas Tat y Rev (Figura. 4).

Se piensa que el resto de acontecimientos requieren señales específicas sin las que sólo se forman partículas virales maduras sin ARN viral. En ensamblaje **6) los correceptores ocurren** en la membrana celular y parece comenzar con la asociación de la proteína p17 de la matriz con el dominio citoplasmático de la proteína gp41. También parece que el clivaje de las proteínas del core se produce a partir de poliproteínas precursoras durante la formación de la partícula y después de ella. La síntesis de las proteínas de la envoltura viral se producen en el retículo endoplásmico de la célula huésped a partir de la gp160; ésta en el aparato de Golgi es clivada por una proteasa para producir gp120 y gp41 antes de transportarlas a la superficie de la célula.

7) El virión maduro está compuesto por una membrana, que incluye las proteínas virales gp120 y gp41, además de varias proteínas celulares, un core que contiene ARN viral, transcriptasa inversa e integrasa. Otras proteínas no son empaquetadas en los viriones y sólo actúan en los pasos que preceden a la liberación de los virus.

Se piensa que la vida libre de los viriones es muy corta, aproximadamente de 0,3-0.5 días (8-12 horas), y que en 2,6 días se realiza un ciclo viral completo con salida desde la célula infectada, infección productiva, vida libre, infección de otro linfocito, replicación intracelular y salida de nuevos viriones. De este modo se producirían unos 140 ciclos de replicación al año y en situaciones de equilibrio se estima que se producen y se destruyen del orden de 10^{12} viriones renovándose cada día alrededor del 30% de las partículas circulantes. De mismo modo se estima que del orden de 10^9 linfocitos CD4+ se producen y se destruyen diariamente probablemente a partir de la estimulación y proliferación de clones periféricos, lo que puede suponer un índice de recambio de 10 a 100 veces superior al fisiológico; en estas condiciones de equilibrio se piensa que cada 15 días se renueva la totalidad de los CD4+ circulantes siendo la vida media estimada de

un linfocito infectado por el VIH de 1,2 a 2,2 días. También se ha calculado que cada célula infectada produce del orden de 10^4 a 10^5 partículas virales muchas de las cuales son defectuosas, estimándose que un 1% del total de los linfocitos del organismo se infectan de novo cada día. Con esta dinámica poblacional y estimando la tasa de mutaciones del orden de 10^{-4} a 10^{-5} sustituciones por nucleótido copiado, se regeneran rápidamente distribuciones mutantes que podrían alcanzar los 10^{12} partículas virales circulantes en un individuo infectado (Flint. S. J., 2000; Goff P., 2001).

Por lo tanto en el organismo humano infectado el VIH se encuentra como una mezcla de variantes genéticas estrechamente relacionadas que se denominan cuasiespecies. En el modelo de cuasiespecies se acepta que la secuencia de nucleótidos del virus es indeterminada a nivel individual y sólo se definiría de un modo estadístico. En algunos casos un genoma con una secuencia definida puede ser el mayoritario (secuencia maestra) pero no siempre ocurre así ni tiene por qué coincidir con la secuencia consenso de la población viral. Las familias de virus desarrollan una serie de complejos mecanismos, llamados de escape, para no ser eliminados por la repuesta defensiva del organismo ante su presencia. En el caso de los retrovirus estos mecanismos corresponden básicamente al desarrollo de variabilidad genética debida a la alta tasa de error de la transcriptasa inversa en la retrotranscripción y a la posibilidad de permanecer en estado latente en determinados reservorios. La transcriptasa inversa del VIH tiene una tasa de error similar a la de otros virus ARN y se estima del orden de 10^{-3} a 10^{-5} sustituciones por nucleótido copiado (de cada 1.000 a 100.000 nucleótidos copiados uno es erróneo); consecuencia de esta variabilidad se producen gran cantidad de virus que da lugar a una alta diversidad de las proteínas virales que teóricamente puede permitirles escapar a los controles inmunitarios específicos y a la presión de los antirretrovirales.

Considerado globalmente el organismo humano infectado por el VIH no se puede hablar de que exista una verdadera fase de latencia, sin embargo esta es posible en células individuales y a pesar de que probablemente no contribuyan a una producción de virus superior al 1% son de gran transcendencia porque pueden explicar la recidiva tras el fallo del tratamiento antirretroviral. En sangre periférica solo están infectados entre el 1 y el 10% de los linfocitos T CD4 circulantes, sin embargo en los órganos linfoides,

especialmente los ganglios linfáticos, se piensa que pueden estar infectados más del 40% de los linfocitos CD4 presentes y que sólo una pequeña proporción de ellos, alrededor del 1%, replican activamente el genoma proviral que contienen produciendo del orden de 10^{10} viriones productivos al día y representarían a la población celular destruida (alrededor de 10^8); los virus producidos infectarían a un número parecido de células (alrededor del 1% del total) y esta población infectada de novo sería mayoritariamente de linfocitos activados para regenerar a los destruidos y en ellos el VIH experimentaría probablemente una replicación rápida sin fase de latencia. Se sabe por otro lado que el porcentaje de macrófagos infectados es muy pequeño, del orden de 1 por cada 15.000-100.000 en los órganos linfoides; a pesar de que la infección de células de las mucosas, células de Langerhans o de los macrófagos de la microglia cerebral suponen probablemente un reservorio muy pequeño del VIH, pueden jugar un papel transcendental en la transmisión sexual del virus y en la afectación del sistema nervioso central (<http://www.ctv.es/USERS/fpardo/virus.htm>).

4.6. Fármacos para el VIH/SIDA

En la actualidad hay diversos fármacos anti VIH que han sido desarrollados y comercializados.

Dichos fármacos pueden ser clasificados en 3 grupos de acuerdo con sus mecanismos de acción: inhibidores de transcriptasa reversa (ITR); inhibidores de proteasa (IP) e inhibidores de fusión (IF). Los ITR se clasifican en 2 grupos: a) análogos o nucleósidos (ITRNN ó NNRTI) que inhiben por la interacción específica con un sitio de unión alostérico (De Clerq E., 2000). Los IP se unen al sitio activo de proteasa viral y evitan el procesamiento de las proteínas virales a enzimas funcionales. Las partículas virales son producidas aún cuando la PR es inhibida pero no son infecciosas (Wlodawer A., Erickson J. W., 1993). Los IF evitan la fusión del virus –célula y por lo tanto, la infección de células blanco (kilby J. M., *et al.*, 1998). Sin embargo, el uso prolongado de esto fármacos frecuentemente provoca efectos secundarios graves (Tarinas A., *et al.*, 2000) (Cuadro1).

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

Nombre Genérico	Nombre Comercial	Tipo de inhibidor	Efectos secundarios
Zidovudina (AZT)	Retrovir®	ITRAN	SNC (dolor de cabeza, malestar), GI (náusea, vómito, diarrea, anorexia), Dermatológicos (decoloración de las uñas), hematológicos (mielosupresión) Anemia, trombocitopenia, alteraciones en los niveles de bilirrubina) y hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa)
Didanosina (ddI)	Videx® Bristol-Myers Squibb;1991	ITRAN	SNC (neuropatía periférica, dolor de cabeza) GI(diarrea, pancreatitis) hematológicos (Leucopenia)
Zalcitabina (ddC)	Hivid® Hoffmann-La Roche;1992	ITRAN	Hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa), en SNC (neuropatía periférica de manos y pies), hematológicos (anemia, leucopenia, trombocitopenia) y GI (pancreatitis)
Estavudina (d4T)	Zerit® Bristol-Myers Squibb;1994 Versión genérica	ITRAN	Hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa); SNC (neuropatía periférica), GI (náuseas,diarrea,vómito, pancreatitis) dermatológicos (prurito)
Lamivudina (3TC)	Epivir® Glaxo-Smith Kline;1995	ITRAN	SNC (dolor de cabeza,insomnio) y GI (náuseas, diarrea, dolor abdominal)
Abacacir (ABC)	Ziagen® Glaxo-Smith Kline;1998	ITRAN	Dermatológicos (prurito) GI (dolor abdominal, diarrea) SNC (dolor de cabeza)

Continúa.....

Tenofir (TDF)	Viread® Gilead Sciences;2001	ITRAN	SNC (neuropatía periférica,dolor de cabeza, fatiga); GI (náuseas, diarrea, vómito, pancreatitis, dolor estomacal); hepatotoxicidad y nefrotoxicidad
Emtricitabina (FTC)	Emtriva® Gilead Science;2004	ITRAN	SNC (dolor de cabeza); GI (diarrea, náusea), dermatológicos (salpullido, cambios en la coloración de la piel) y hepatotoxicidad
Nevirapina (NVP)	Viramune® Bohringer Ingelheim;1996	ITRNN	SNC (somnolencia, dolor de cabeza, fatiga) y dermatológicos (prurito, salpullido), GI(diarrea, náuseas), hepatotoxicidad (elevados niveles de gamma glutamiltransferasa) y fiebre
®Delavirdina (DLV)	Rescriptor® Pfizer;1997	ITRNN	Dermatológicos (salpullido), GI (náusea, vómito, diarrea); SNC (dolor de cabeza, fatiga) y hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa)
Efavirenz (EFV)	Sustiva® Bristol-Myers Squibb;1998	ITRNN	GI (náusea); SNC (dolor de cabeza, fatiga, mareo, ansiedad); Dermatológicos (salpullido)
Saquinavir (SQV)	Invirasa®, Fortovasa® Hoffmann-La Roche;1995	IP	GI(diarrea, náusea), SNC (neuropatía periférica, dolor de cabeza), Hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa) y dermatológicos(prurito)
Ritonavir (RTV)	Norvir® Abbot;1996	IP	SNC(decaimiento general),GI(náusea, vómito, diarrea) y hepatotoxicidad (elevados niveles de aspartato aminotransferasa)

Continua.....

Indinavir (IDV)	Crixivan® Merck & Co;1997	IP	GI (diarrea, náusea, vómitos, dolor abdominal), SNC (dolor de cabeza), hepatotoxicidad (elevados niveles de bilirrubina total, amilasa) y nefrotoxicidad (nefrolitiasis)
Nelfinavir (NFV)	Viracept® Pfizer;1997	IP	GI (diarrea, náusea, vómito, pérdida del apetito) y SNC (dolor de cabeza)
Amprenavir (APV)	Agenerase® Glaxo-Smith Kline;1999	IP	SNC(fatiga, dolor de cabeza), GI(náusea, vómito, diarrea) y dermatológicos(salpullido)
Lopinavir/ritonavir (LVP)	Kaletra® Abbot;2000	IP	GI (cólicos, náusea, vómito, diarrea), SNC(decaimiento general,debilidad, fatiga,dolor de cabeza), dermatológicos (irritaciones en la piel) y pancreatitis
Atazanavir	Reyataz® Bristol-Myers Squibb;2003	IP	Hepatotoxicidad (elevados niveles de bilirrubina), GI(náusea) y dermatológicos(pigmentación amarillenta en manos)
Fosamprenavir (FPV)	Lexiva® Glaxo-Smith Kline;2003	IP	SNC (dolor de cabeza), GI(náusea, vómito,diarrea,pérdida del apetito) y dermatológicos(salpullido)
Enfuvirtida (T20)	Fuzeon® Teneris and Hoffmann-La Roche;2003	IF	Dermatológicos (irritaciones en la piel), SNC (neuropatía periférica, fatiga) GI (náusea, vómito) y fiebre.

SNC: Sistema nervioso central; GI: gastrointestinales; ITRAN inhibidores de Transcriptasa Reversa Análogos a nucleósidos (NRTI, por sus siglas en inglés);

ITRNN: inhibidores de Transcriptasa Reversa no Nucleósidos (NNRTI, por sus siglas en inglés); IP: inhibidores proteasa; IF: Inhibidores de fusión.

Modificador de Tarinas A., *et al.*, 2000; Cos, P., *et al.*, 2004; www.aidsmed.com/drugs

5. METABOLISMO DE LAS CUMARINAS EN PLANTAS

De acuerdo a lo reportado por Kuklinski (2003), los componentes químicos de los metabolitos son generalmente abundantes y de estructura diversa.

De acuerdo a su naturaleza química se clasifican en:

1.-Inorgánicos: Agua y minerales

2.- Orgánicos

Los componentes orgánicos que se hallan presentes en el vegetal pueden proceder del metabolismo primario o del metabolismo secundario (Cuadro 2).

Cuadro 2. Compuestos del metabolismo de la plantas

Componentes Tradicionales del metabolismo primario	Compuestos tradicionales del metabolismo secundario
• Carbohidratos • Lípidos y ceras vegetales • proteínas • Enzimas	• Alcaloides • Glicósidos • Aceites esenciales • Shikimatos: fenoles y ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, cumarinas, antocianinas, taninos. • Saponinas • Triterpenos

Entre las diversas sustancias que se encuentran en los metabolitos podemos hallar los siguientes componentes:

- Principios activos: sustancias con actividad farmacológica a los cuales se debe su empleo terapéutico.
- Coadyuvantes: sustancias que refuerzan o modulan la acción que ejercen los principios activos.

- Principios activos antagonistas: un mismo metabolito contiene principios activos con efectos contrarios.
- Sustancias con valor diagnóstico: permiten que la identificación del metabolito (como cristales de oxalato, pigmentos, etc.). Algunas sustancias tienen, además de valor diagnóstico, actividad farmacológica.
- Sustancias de interés tecnológico: se utilizan como excipientes o coadyuvantes en la fabricación de preparados (gomas, almidón, azúcares, etc.).
- Saborizantes y aromatizantes: por ejemplo, la vainilla y el clavo.
- Sustancias con interés dietético y nutricional: por ejemplo, metabolitos ricos en lípidos, proteínas, vitaminas.
- Otros componentes: lípidos, enzimas, etc., que pueden afectar a la estabilidad y las características del metabolito.

5.1. Rutas Biosintéticas

1.- El metabolismo primario se considera esencial para la vida, en función del porcentaje que implica su presencia, siendo mayor al 90% en volumen (figura 5).

2.-El metabolismo secundario también esencial para la vida, implica todas las sustancias presentes en muy bajo porcentaje, menor al 10%; da lugar a productos (denominados metabolitos secundarios) que resultan de sumo interés desde el punto de vista farmacológico. La mayoría de los principios activos que se obtienen de las plantas medicinales proceden, de hecho, del metabolismo secundario.

En este cuadro se muestran los diferentes metabolitos secundarios y sus rutas biosintéticas (Cuadro.3 y Figura. 5).

Cuadro 3. Metabolitos secundarios

Ácidos fenólicos	Ruta del ácido shikímico
Taninos	Ruta del ácido shikímico
Flavonoides	Ruta del ácido shikímico y ruta de los policétidos
Alcaloides	Ruta del ácido shikímico y ruta del ácido mevalónico
Antraquinonas	Ruta de los policétidos
Antibióticos	Ruta de los policétidos
Lignanos y cumarinas	Ruta del ácido shikímico
Esteroides	Ruta del ácido mevalónico

Para el presente estudio la ruta biosintética que nos concierne es la de las cumarinas, ya que la planta *Calophyllum brasiliense* tiene el principio activo.

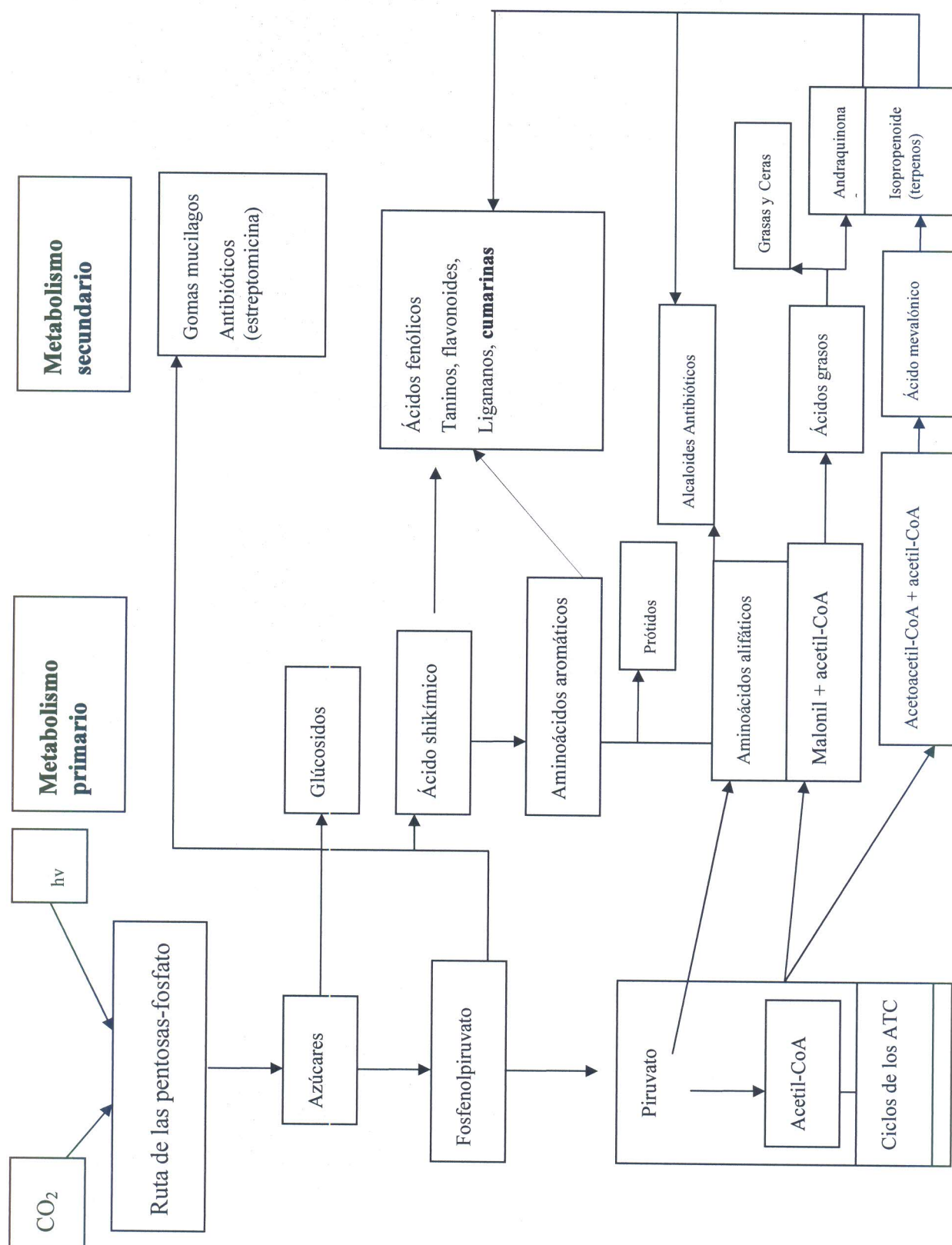


Figura 5. El metabolismo general de las plantas lo podemos esquematizar de la siguiente manera.

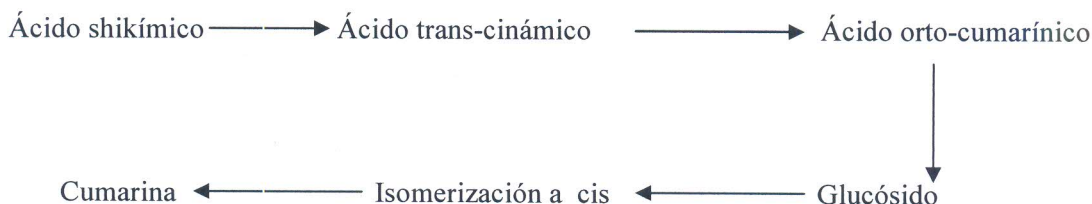
5.2. Origen Biosintético de las Cumarinas

De acuerdo a lo reportado por Kuklinski (2003), el nombre de cumarinas se conoce a un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales y tienen en común una estructura química de 2 α -1-benzopirona-2- β , denominada cumarina. Sobre esta estructura, que se origina biosintéticamente por lactonización del ácido cumarínico (2-hidroxi-Z-cinámico), se disponen sustituyentes de distinta naturaleza química lo que da lugar a distintos tipos de cumarinas: sencillas y complejas.

Es frecuente, que sobre el anillo cumarínico básico, generalmente hidroxilado en C-7, se sitúen sobre los carbonos 6 u 8 radicales isoprenílicos de 5, 10 o más raramente de 15 átomos de carbono, que por su alta reactividad pueden originar anillos adicionales de tipo furánico o piránico. A este grupo de cumarinas isopreniladas se les conoce en conjunto como cumarinas complejas debido a la gran variabilidad química de sus estructuras. Ejemplo de este tipo de principios activos es la visnadina, piranocumarina con efectos vasodilatadores presente en el *Amni visnaga*.

Como grupo, su interés farmacológico no es muy grande, sin embargo debemos mencionar sus efectos sobre el sistema vascular tanto en territorio arterial como venoso y su utilidad en el tratamiento de algunas alteraciones de la piel como por ejemplo la psoriasis debido a sus propiedades fotosensibilizantes.

Las cumarinas son metabolitos secundarios que proceden de la ruta del ácido shikímico de acuerdo a la secuencia presente que se resume a continuación (Figura 6).



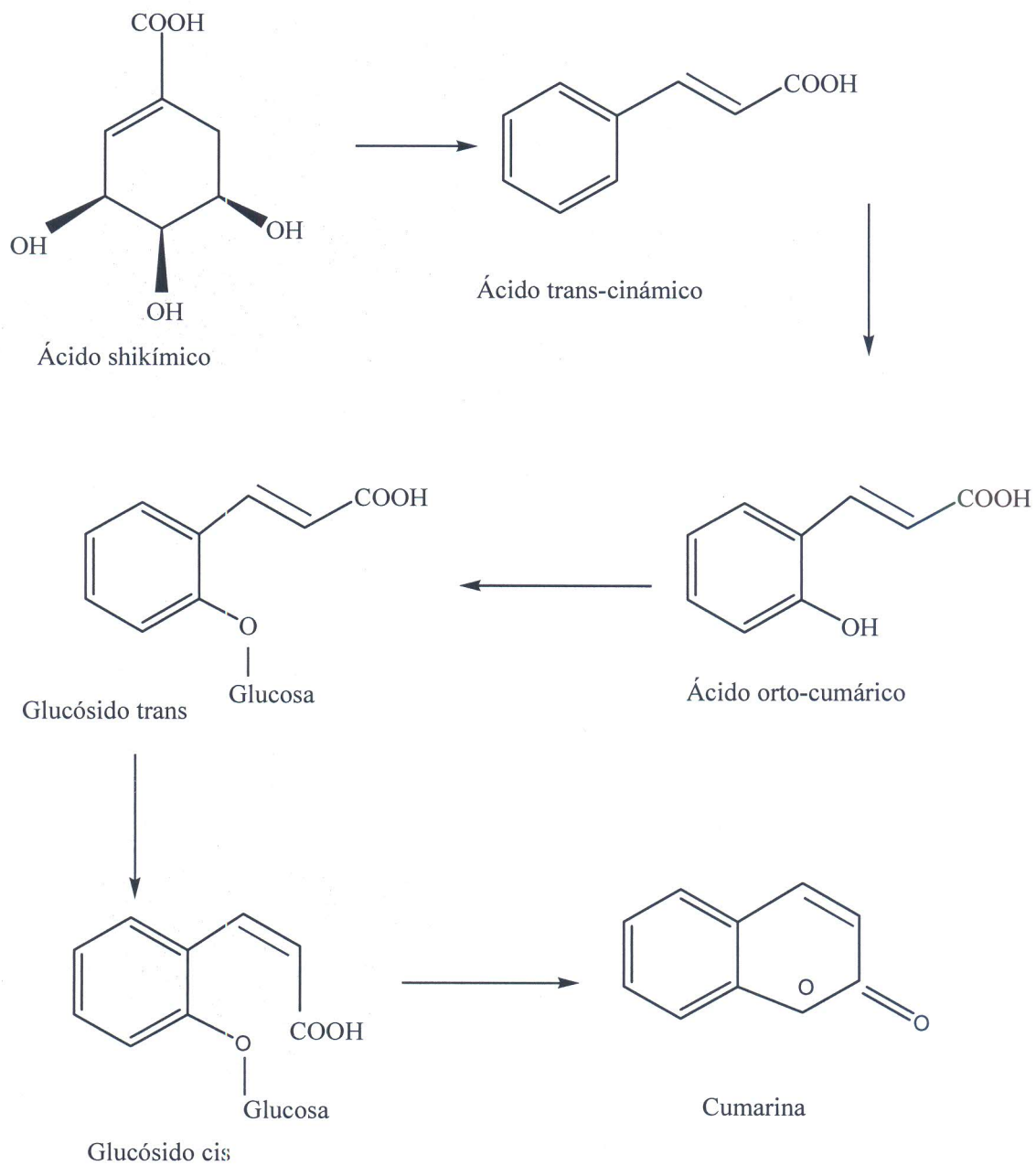


Figura 6. Las cumarinas muestran la ruta del ácido shikímico de acuerdo a la secuencia presente.

5.3. Distribución de las Cumarinas

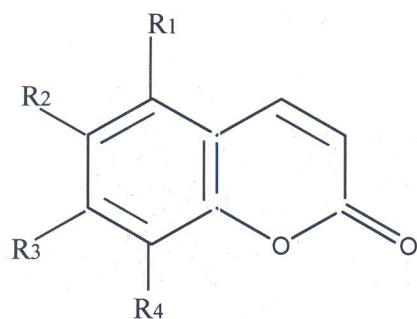
Las cumarinas se hallan ampliamente extendidas en el reino vegetal. Hay sin embargo determinadas familias que poseen una gran cantidad de cumarinas. Leguminosas (Fabáceas), Rubiáceas, Clusaceas, Rutáceas, Umbelíferas, Apocináceas y Compuestas. También se encuentran cumarinas en ciertos hongos, por ejemplo aflatoxinas de hongos del género *Aspergillus* que destacan por que son altamente tóxicos.

Estructura Química

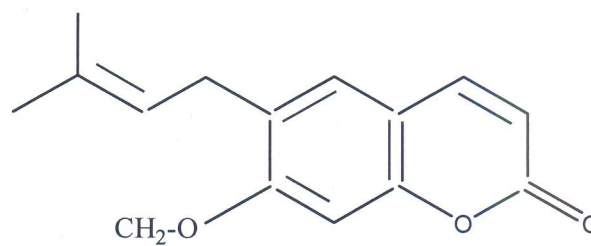
Las cumarinas son derivados de benzo- α -pirona. Muchas de ellas son fenólicas, por lo que se incluyen dentro de los derivados fenólicos (Figura 7).

Clasificación:

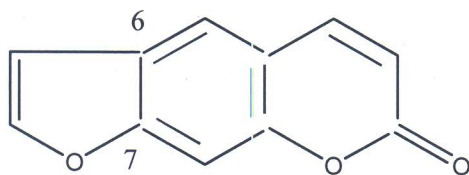
1. Cumarinas sencillas: poseen el núcleo base de benzo- α -pirona con más o menos sustituyentes en las posiciones 5,6 ,7 y 8. Los radicales son generalmente H, OH, ó OCH₃ (hidroxi y metoxicumarinas). Casi todas las cumarinas poseen función hidróxilo o metoxilo en posición 7.
2. Cumarinas c-predniladas llevan enlazadas al anillo de benzo- α -pirona unidades isoprenicas, generalmente C₅ o C₁₀.
3. Furanocumarinas: llevan adosado al anillo de benceno un anillo de furano. Son 6,7-furanocumarinas y 7,8-furanocumarinas.
4. Piranocumarinas: llevan adosado al anillo de benceno un anillo pirano. Son 6,7-piranocumarinas y 7,8-piranocumarinas.
5. Dicumarinas: son estructuras dímeras. como el dicumarol.



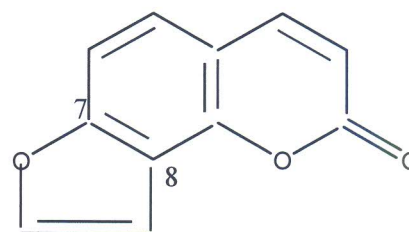
Cumarinas sencillas



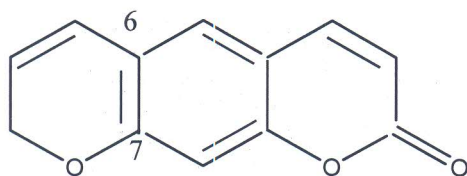
Cumarina c-prednilada:suberosina



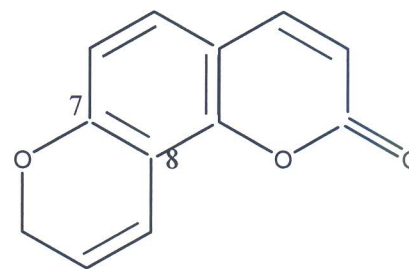
6,7-Furanocumarinas



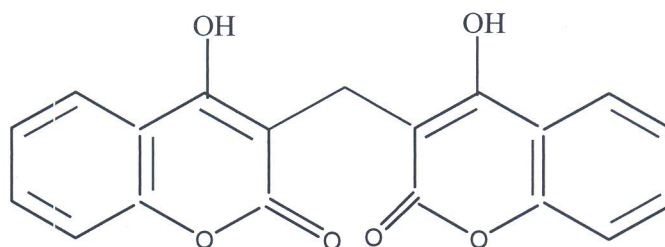
7,8-Furanocumarinas



6,7-Piranocumarinas



7,8-Piranocumarinas



Dicumarol

Figura 7. Las cumarinas son derivados de benzo- α -pirona. Muchas de ellas son fenólicas, por lo que se incluyen dentro de los derivados fenólicos

5.3.1. Propiedades

1.-Son sólidos cristalizables de color blanco amarillento

2.-Solubilidad: las hidroxycumarinas son solubles en disolventes orgánicos (éter, cloroformo, alcoholes); los glucósidos son solubles en agua y alcoholes y las furanocumarinas y piranocumarinas lo son únicamente en disolventes orgánicos apolares (éter, etílico, cloroformo).

3.-Fluorescencia a la luz ultravioleta (UV): las cumarinas presentan fluorescencia (azul, amarilla, verde, púrpura), lo cual permite su reconocimiento.

Extracción e Identificación: Se extraen con mezclas hidroalcohólicas, se realiza una cromatografía de capa fina (CCF) y se identifican por fluorescencia al UV o revelado con el éster aminocetílico del ácido difenilbórico (comúnmente llamado “reactivo de productos naturales”) por que permite detectar también otras sustancias naturales como los flavonoides).

4.-Extracción

A partir de las plantas desecadas, como hay variación de estructura y solubilidad, es mejor hacer extracción con distintos disolventes, empezando por los menos polares y aumentando progresivamente. Eter de petróleo, cloroformo, éter, acetato de etilo, metanol, agua.

5.-Purificación

Se usan distintas columnas cromatográficas con distintos adsorbentes y una vez aislados se hace la caracterización por espectroscopía.

Para las hidroxycumarinas, extraemos con álcali diluido y caliente, se abre el anillo de lactona y se forman las sales correspondientes del ácido hidroxycinámico, para lavar las impurezas el álcali diluido se extrae con éter, acidificamos y la cumarina vuelve a formarse. Se extrae con éter la cumarina pero es frecuente que existan otros ácidos fenólicos junto a la cumarina. Para eliminarlos, extraemos con bicarbonato de sodio, ahí pasarán los ácidos y en el éter quedarán las cumarinas puras.

6.-Ensayos

Normalmente la extracción se hace con metanol caliente y se lleva el extracto a cromatografía. Se pueden usar reacciones de color:

- a) clorhidrato de hidroxilamina más tricloruro de hierro
- b) Ester amino etílico del ácido difenilbórico

7.-Valoración

- a) Fluorimetría, Castaño de Indias
- b) Colorimetría
- c) Coagulación con sales de diazonio de fenoles

8.-Acciones Farmacológicas.

Los compuestos que se engloban bajo la denominación de cumarinas tienen estructuras muy variadas y, debido a ello, se observa una gran variabilidad en sus acciones farmacológicas.

Las principales acciones que se han apreciado para las diferentes cumarinas son:

- 1.-Acción vitamínica P (Bioflavonoides): disminuyen la permeabilidad capilar y refuerzan los capilares.
- 2.- Tónicos venenosos (vénotónicos).
- 3.-Fotosensibilizadoras (furanocumarinas)
- 4.-Antiinflamatorios
- 5.-Antiespasmódicos
- 6.-Vasodilatadores coronarios
- 7.-Ligero efecto hipnótico
- 8.-Sedantes
- 9.-Anticoagulantes (dicumarol).
- 10.- Acción analgésica
- 11.- Acción hipodérmica
- 12.- Acción antibacteriana
- 13.- Propiedades estrogénicas

Reconocimiento de algunos, metabolitos (mana, solanaceas midriaticas, castaño de indias)

5.3.2. Principales Cumarinas

A continuación se esquematizan algunas de las principales especies vegetales que contienen cumarinas indicando las características más destacadas.

Cuadro 4. Especies que contienen cumarinas

Especie	Principales metabolitos	Principales acciones
Sumidades floridas de <i>Melilotus officinalis</i> Melitoto, trébol de olor	Cumarina: se forma al desecar a partir de melitósido y dicumarol , Flavonoides, Saponósidos	Antiespasmódico, venotónico, anticoagulante, diurético suave, antiinflamatorio, hipnótico, digestivo.
Semillas y corteza de <i>Aesculus hippocastanum</i> Castaño de Indias	Flavonoides (escina), Saponinas, glucósidos, cumarínicos (esculósido, esculetósido).	Vasodilatador coronario, antianginoso, venotónico, vasoprotector, antiinflamatorio.
Frutos de <i>Ammi visnaga</i>	Furocromonas (kelina, visnagina) Furanocumarinas, aceite esencial.	Vasodilatador coronario, antianginoso, antiespasmódico.

5.3.3. Derivados de las Cumarinas

5.3.3.1. Gamma-Pirano:

- Derivados del Gamma-Pirano propiamente dicho: Entre ellos tenemos el ácido Chelidónico, presente en la *Chelidonia*; su derivado hidroxilado, el ácido Mecónico, presente en diversas Papaveráceas como la amapola.
- Derivados de la Cromona: Los Flavonoides: La cromona por si misma no se encuentra en el reino vegetal, pero sus derivados hidroxilados son pigmentos amarillos muy extendidos en el reino vegetal a cuyo grupo se le ha dado el nombre de derivados flavínicos o flavonoides que existen más frecuentemente

bajo la forma de heteróxidos: los flavonósidos, que son generalmente más solubles en agua que sus geninas.

- Entre las flores amarillas, algunas les deben su color, que es por otra parte más acentuado como la molécula está más hidroxilada y el pH es más elevado.

La flavona propiamente dicha es la fenil-2-cromona. Esta no se encuentra en las plantas, pero se hallan sus derivados hidroxilados: el crisol, la luteonina, la apigenina, etc.

Cuando aparece un hidroxilo alcohólico en 3, se obtiene los flavonoles, de los que más extendido es el quercetol y el Kaempferol, que se encuentra particularmente en el Sen.

Las chalconas son derivados de las flavononas, con apertura de un anillo.

Las isoflavonas son derivados de la fenil-3-cromona. Estas sustancias están poco coloreadas.

La rotenona y los rotenoides, principios citotóxicos e insecticidas, son sustancias complejas con 5 anillos a los que actualmente se les considera como constructores de una isoflavona.

En razón de las reacciones comunes, se estudian generalmente con los flavonoides:

-Las xantonas o dibenzopironas, que son también pigmentos amarillos, como la gentiseina de la Genciana, a la que debe su coloración.

-Las benzolcumaranonas o auronas, son pigmentos rojos de las flores de las escrofuláceas.

Cumarinas de *Mammea* spp.

1.-Todas las cumarinas aisladas del genero *Mammea* reciben el nombre de Mammea

2.- El nombre de mammea es seguido por una letra que se designa el tipo de substituyente localizado en el carbono 4:

A= fenilo

B=propilo

C=pentilo

D=1-metilpropilo

E=1-acetoxipropilo

1.- Una diagonal separa a esta letra de una segunda letra la cual indica sí el sustituyente acilo esta presente, así como la posición de este con respecto al sustituyente prenilo:

A=6-acilo ó B=8-acilo

2.- Una tercera letra define el tipo de sustituyente acilo:

A=3-metilbutiril B=2-metilbutiril

C=butiril D=2-metilpropionyl

3.- En los casos en donde el sustituyente prenilo se ha modificado por ciclización, la tercera letra es seguida por el prefijo ciclo y una cuarta letra indica el tipo de heterociclización:

Ciclo D= 2,2-dimetilcromeno

Ciclo E=3-hidroxi-2,2-dimetildihidropirano

Ciclo F=2-(1-hidroxi-1-metiletil) dihidrofuerano

Xantonas

Las xantonas presentan un esqueleto básico de la benzofenona. Tienen su origen en la fenilamina merced a su producto de degradación; el ácido m-hidrobenczoico (C_6-C_1) y su posterior condensación con tres unidades de malonato. Otra ruta podría ser; la combinación de una unidad C_6-C_3 , por ejemplo un ácido cinámico con dos unidades de malonato para obtener benzofenona. El acoplamiento oxidativo podría conducir a la formación de xantonas (Figura 8) (Gros *et al.*, 1985). Las xantonas pueden ser simples o modificadas. En este último caso la presencia de un sustituyente glicosídico o grupo prenilado (2,2 dimetilalil) (Figura 8). Además por grado de oxigenación que presenten

pueden ser clasificadas como mono, di, tri, o tetraoxigenadas ((Bennett *et al.*, 1989); Peres *et al.*, 1997).

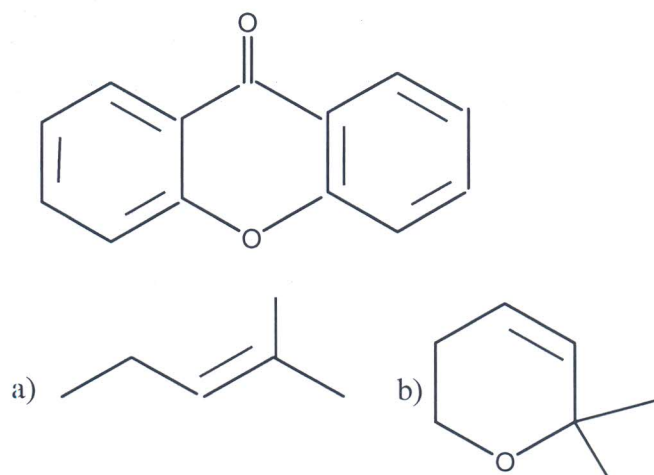


Figura 8. Xantonas y sus sutituyentes isoprenilo (2,2 dimetilalil). b) substituyente cromeno producto de la ciclización del isoprenilo con un OH fenólico de la xantona

5.3.3.2. Importacia de los Flavonoides en Fitoterapia

- Las propiedades tintoria de las plantas con flavonoides, hoy no son muy utilizadas.
- Los pigmentos flavónicos desprovistos de toxicidad para el hombre, tienen propiedades diuréticas y antiespasmódicas

Poseen propiedades vitamínicas P (Bioflavonoides), interesantes en dietética.

- Algunas isoflavonas lipófilas, están dotadas de propiedades estrogénicas.
- La hidrogenación de las chalconas del limón, da derivados azucarados empleados como edulcorantes.

Las Furanocromonas:

Los principios activos de una planta Umbelífera, concretamente de los frutos de la Kella (*Ammi vinaga*), pertenecen a este grupo. El más importante es la *Kellina*, acompañada de sustancias vecinas como la visnagina, el ammiol, el visamminol y el Khellolglucósido. La *Kellina* es un vasodilatador coronario y antiespasmódico.

5.3.3.3. Derivados del Fenil-2-Cromano: Catequinas y Leucoantocianinas

Catequinas o Catecoles: Son derivados polihidroxilados incoloros de la flavona. Los catecoles son antisépticos y astringentes ligeros. Tienen propiedades vitamínica P (Bioflavonoides) marcadas, pero desgraciadamente, no son sustancias estables. Su presencia en plantas con cafeína, retarda su efecto, lo que explica su acción menos brutal y más prolongada de la cafeína en las plantas frescas ricas en catequinas, (cola en particular).

Leucoantocianinas: Son derivados de la dihidroxi-flavonona. Son incoloras, pero enrojecen rápidamente al contacto con el aire. Tratadas por el ácido clorhídrico caliente, dan una coloración rojo violácea intensa por formación de una antocianidina. Abundan en los granos de cacao, las uvas, diversas acacias, las hojas de ciertas Casias, pudiendo falsificar las especies medicinales de Sen (*Cassia acutifolia Delile*), son inestables al aire libre.

5.3.3.4. Derivados del Fenil-2-Benzopirilo: Las Antocianinas.

Estas sustancias tienen un esqueleto muy parecido al de los catecoles y al de los flavonoides, y son intermediarios entre estas dos categorías de compuestos por su estado de oxidación.

Son pigmentos hidrosolubles, a los que las flores, las hojas (sobre todo las hojas amarillas u otoñales) y los frutos, deben sus tintes rojos, violetas o azules.

Son heterósidos (antocianósidos) que se encuentran disueltos en los jugos celulares, y que por hidrólisis ácida dan las geninas y las antocianidinas, que cristalizan bajo formas de sales.

Son colorantes en los que su presencia puede ayudar a la caracterización de ciertas plantas y de sus preparaciones.

Los antocianósidos son muy utilizados en las afecciones de los capilares y de las venas, así como en ciertas afecciones oculares (Klinski, 2003).

5.4. Plantas con componentes anti-VIH en el mundo

Los productos naturales han proporcionado sustancias químicas potencialmente útiles en el tratamiento del SIDA, además de constituir moldes para el diseño de nuevos fármacos. A la fecha se han identificado más de 60 productos naturales anti-VIH-1.

Estos compuestos se han extraído principalmente de plantas superiores, pero también de bacterias, hongos, invertebrados terrestres y marinos (Matthée *et al*, 1999; Vlietnick *et al.*, 1998; Huang, Fong & Yeung, 1997).

Los productos naturales anti-VIH presentan una gran diversidad estructural: alcaloides, polisacáridos sulfatados, carbohidratos, cumarinas, taninos, derivados de ácidos fenólicos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, iridoides, lignanos, xantonas, tiofenos, saponinas (Cuadro 5). Para algunos de ellos, se ha determinado su forma de acción, destacando aquellos que inhiben la actividad de la transcriptasa reversa (RT) (Matthée *et al*, 1999), la adsorción del virus a los linfocitos CD4+, la formación de sincicio (unión de células infectadas y no infectadas dando lugar a una célula multinucleada), así como la inhibición de la proteasa e integrasa (Huang, Fong & Yeung, 1997; Vlietnick *et al.*, 1998).

Cuadro 5. Algunos productos naturales de origen vegetal con actividad anti –VIH-1

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

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

Dentro de los productos de origen natural se han encontrado los compuestos pertenecientes a la familia de las cumarinas y en especial el (+)- calanólido A es un inhibidor potente de la RT del VIH-1, pero es inactivo contra la RT del VIH-2. El (+)- Calanolido A fue aislado por primera vez de los brotes y frutos del árbol tropical *Calophyllum lanigerum* de Malasia por investigadores del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (dependencia gubernamental) como parte de estudios bioprospectivos. Se describieron sus propiedades anti VIH mediante ensayos in vitro de viabilidad celular con células humanas infectadas (Kashman *et al*, 1992);

Resultando ser un inhibidor de la enzima reversa transcriptasa del VIH-1. También se aislaron 7 compuestos relacionados con actividad antiviral pero menos potente. De los compuestos mencionados en la Cuadro 5 el (+)- Calanólido A ha sido sintetizado químicamente (Figura 9) y se han realizado modificaciones estructurales sobre el grupo hidroxilo unido al carbono 12 con la finalidad de conocer la importancia

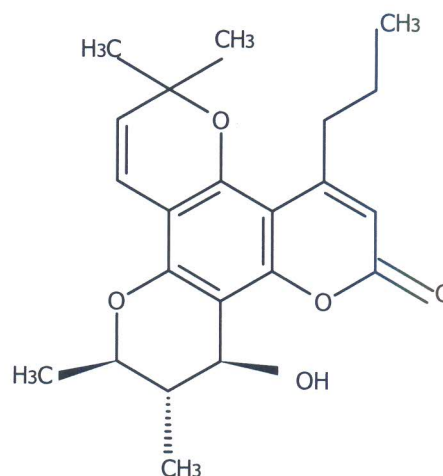
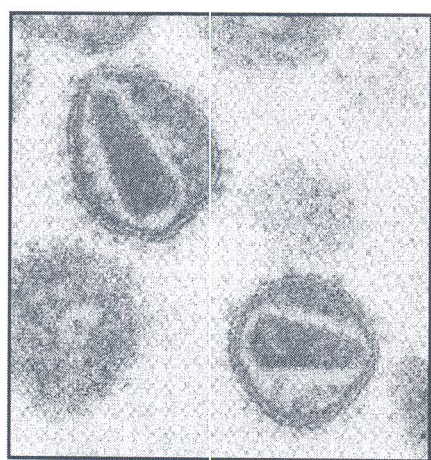


Figura 9. Células linfoblásticas T humanas infectadas, y al lado se encuentra (+)-12-metoxicalanólido A aislado de de un extracto de frutos y brotes de *Calophyllum lanigerum* var *austrocoriaceum*, donde por primera vez se probaron en este tipo de compuestos las propiedades anti-VIH, en estas células linfoblásticas T.

De este sustituyente en la actividad anti-viral. Concluyendo que la presencia de un OH sobre el carbono 12 de los calanólidos es importante para la actividad anti-viral. Virus de Inmunodeficiencia Humana –Tipo 1 (Figura 9).

El (+)- Calanolido A es activo únicamente contra el VIH-1 (distribuido en el continente Americano) y se encuentra actualmente (2004), en la fase de estudios clínicos II/III (fase clínica) con pacientes VIH-1 positivos, donde se evalúa su actividad a largo plazo conjuntamente con otros agentes antiVIH y se asegura la persistencia de tales combinaciones. De superar esta etapa podría convertirse en el primer fármaco originalmente extraído de una especie vegetal, que se aprobase para uso clínico en el tratamiento del SIDA (Creagh *et al.*, 1998).

También se ha estudiado su efecto sobre quimeras moleculares, las cuales contienen segmentos complementarios de las transcriptasas reversas del virus tipo 1 y tipo 2, con la finalidad de conocer que segmentos o sitios de la secuencia de aminoácidos son críticos para la inhibición. Encontrando que el segmento crucial se encuentra entre los residuos 94 a 157 en la transcriptasa reversa del viral (Kashman *et al.*, 1992; Mckee *et al.*, 1996; Patil *et al.*, 1993; Fuller *et al.*, 1994).

Cuadro 6. Cumarinas aisladas del género *Calophyllum* inhibidoras de la DNA polimerasa dependiente de RNA tipo I (transcriptasa reversa) enfermedad viral.

Compuesto	Fuente	Dosis EC ₅₀ *mM	Dosis IC ₅₀ *mM
(+)-Calanólido A	<i>Calophyllum lanigerum</i>	0.1	20.0
(-)-Calanolido B	<i>Calophyllum lanigerum</i>	0.4	15
Calanólido F	<i>Calophyllum lanigerum</i> <i>varausstrocoriaceum</i>	2.84	12.7
Inofilina B	<i>Calophyllum inophyllum</i>	1.40	55.0
Inofilina P	<i>Calophyllum inophyllum</i> <i>Lin</i>	1.60	25.0
Costatólido	<i>Calophyllum tesysmannii</i>	***	
Soulattrólido	<i>Calophyllum tesysmannii</i>		

Kashman *et al.*, 1992; Mckee *et al.*, 1996; Patil *et al.*, 1993; Fuller *et al.*, 1994;*Concentración efectiva que inhibe el 50% de la producción viral, 50% de la infectividad, o 50% de los efectos citopáticos inducidos por el virus. ** Concentración efectiva que reduce en 50% el crecimiento celular o la viabilidad de células no infectadas. ****Actividad intermedia entre el Calanólido A y B.

Los derivados cumarínicos aislados de *Calophyllum sp* son candidatos potenciales para ser examinados en estudios clínicos. Se ha estudiado la farmacocinética en ratones, de compuestos como el costatólido, dihidrocostatólido y el calanólido A, los cuales fueron administrados por vía oral la biodisponibilidad de los compuestos es muy poca, mientras que por vía intravenosa e intraperitoneal la biodisponibilidad fué de alrededor de 95% de cada producto (Creagh *et al.*, 1998).

Por otro lado se ha determinado el perfil de seguridad del (+) -calanólido A sintético en individuos sanos (HIV-1 negativos). El efecto adverso más común fué mal sabor de boca y mareo. Se ha concluido que el (+)-calanólido A es tolerado en dosis de hasta 800mg, por lo cual es factible que pronto se evalúe en pacientes HIV positivos (Creagh *et al.*, 1998). Se ha determinado que el mecanismo de acción del calanólido A es completamente diferente al que se observa en drogas del tipo no nucleosídico como la nevirapina y de tipo nucleosídico como el HEPT (Creagh *et al.*, 1998).

5.4.1. Plantas Mexicanas de la familia Clusiaceae con actividad Anti-VIH

En esta Cuadro 7 se exponen con ejemplares colectados en diferentes lugares de la República Mexicana, y se realizó un sondeo en de actividad Anti- VIH, obteniendo los siguientes resultados (Huerta-Reyes, 2004).

Cuadro 7. Sondeo de actividad inhibitoria Transcriptasa Reversa del Virus de Inmunodeficiencia tipo 1 de los extractos CH₂Cl₂-MeOH (50µg/ml) de las Clusiaceae mexicanas

Especie	Colector	Estado	Herbario	Parte Usada	%inhibición de TR VIH-1
<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess	R. Reyes Chilpa s/n 10 de septiembre de 1999	Veracruz (Los Tuxtlas)	IMSSM	Hoja	70.3 ± 3.1
<i>Chryochalmys</i> Guatemaltecaza. Donn.Sm.	T.Went et al.2642	Veracruz	MEXU	Hoja	60.4 ± 1.0
<i>Chryochalmys</i> (Oerst.,Planch.&Triana) Hemst.	B.Ortiz y Martiniano 170	Veracruz	IMSSM	Hoja	58.7 ± 0.5
<i>Chryochalmys</i> (Oerst.,Planch.&Triana) Hemst.	B.Ortiz y Martiniano 170	Veracruz	IMSSM	Flor	31.0 ± 2.0
<i>Clusia guatemalensis</i> Hemst	A. Mendez95	Chiapas	MEXU	Hoja	70.8 ± 1.2
<i>Clusia lundellii</i> Standl.	L.Lozada 2424	Oaxaca	IMSSM	Hoja	48.0 ± 1.5
				Cáscara fruto	59.4 ± 1.6
				Semilla	50.0 ± 1.0
				Tallo	27.8± 3.4
<i>Clusia flava</i> Jacq	R.Reyes-Chilpa s/n	Veracruz	IMSSM	Hoja	1.0 ± 0.4
<i>Clusia massonoana</i> Lundell	E.Ramírez 414	Oaxaca	FCME	Hoja	72.9± 1.4
				Flor	53.6 ± 2.4
<i>Clusia minor</i> L.	T.P. Ramanamoorthy 2395	Oaxaca	FCME	Hoja	56.1±1.1
<i>Clusia pringlei</i> Lundell	J.Panero 3923	Guerrero	MEXU	Hoja	37.6 ± 0.6
<i>Clusia quadrangula</i> Bartlett	L.Lozada 2428	Oaxaca	IMSSM	Hoja	65.6 ± 1.2
				Cáscara fruto	51.9 ± 1.2
				Semilla	56.6± 0.6
				Tallo	59.7± 1.9
<i>Clusia rosea</i> Jacq.	C.Beutelspacher 15 de marzo de 1969	Veracruz	MEXU	Hoja	16.9 ± 2.0
<i>Vismia mexicana</i> Schldl.	E.Martínez 18999	Chiapas	FCME	hoja	72.9 ± 1.0 ^c
				Flor	56.8 ± 2.8

a) Extracto hexánico; b) extracto Acetónico; c) extracto metabólico. Los valores son las medias de D.E., n=3 (Huerta-Reyes, 2004)

Entre las plantas con presencia de compuestos con actividad anti VIH, en especial contra TR, dentro de la familia Clusiaceae, se encuentra *Calophyllum brasiliense* la cual se encuentra en nuestro país, razón por la cual se planteó un estudio con diferentes vertientes como son la Etnobotánica, anatomía, fitoquímica y bioensayos.

6. ANTECEDENTES DE *Calophyllum brasiliense*

6.1. Taxonomía

Calophyllum brasiliense es un árbol caducifolio con una altura aproximada de 40 a 50 metros y con un diámetro a la altura del pecho de aproximadamente 1.80 metros ramas ascendentes, copa redonda y densa, pertenece a la familia Clusiaceae (Guttiferae) la cual incluye alrededor de 1 000 especies confinadas principalmente a los trópicos, con algunas excepciones. Esta familia está constituida por seis subfamilias (Figura 10).

Una de estas subfamilias es *Calophylloideae* que contiene la tribu *Calophylleae* y esta a su vez agrupa a tres géneros entre éstos al género *Calophyllum*, el cual está constituido con alrededor de 187 especies, entre éstas está *C. brasiliense* (Pennington T.D., Sarukhán J., 1998, todos ellos árboles tropicales, la mayoría (179) se encuentran en el Viejo Mundo en especial en la zona Indo-Malasia con extensión hacia las islas de Madagascar y Fidji.

Se estima que solo 8 especies se distribuyen en el Continente Americano (Stevens P.F., 1980). En cuanto a diversidad, destacan Cuba con 5 especies de *Calophyllum* y Colombia con tres especies; *Calophyllum brasiliense* es la única especie del género que se encuentra en México (García, 1992).



Figura 10. Árbol de *Calophyllum brasiliense*

6.1.1. Morfología

La corteza es de un espesor aproximado de 10 a 20 mm, es café, y produce un exudado lechoso de color amarillo intenso (Figura 11). El duramen varía de color rosa claro a café rojizo, frecuentemente marcado por bandas finas más oscuras de parénquima; la albura es de un espesor aproximado de entre 3.5 y 6.5 cm de color claro, la zona de transición entre la albura y el duramen está bien definida. Su textura es media y uniforme. Es poco lustrosa sin olor ni sabor, parecida a la caoba.



Figura 11. Corteza del tronco del árbol de *Calophyllum brasiliense*

Las hojas son coriáceas, simples decusadas, elípticas u oblongas, con el ápice agudo, de color verde oscuro y brillante en el haz, y verde pálido en el envés, con nervaduras numerosas y paralelas. Algunos árboles de esta especie tiran las hojas en abril o mayo en las zonas más secas de su área de distribución. Presentan flores blancas dioicas en panículas axilares de 2 a 5 cm de largo, glabras, con ovario súpero, presentan de 7 a 12 estambres, flores masculinas despiden un ligero aroma (Pennington T.D., Sarukhán J., 1998; Kearns D.M., *et al.*, 1998).

Este árbol florece de julio a diciembre. El fruto (Figura 12) se presenta en drupas de 2.5 a 3 cm de largo, ovoides o esféricos verde amarillentos, en la madurez de olor fragante, con el endocarpio duro, contienen semillas ovoide o esférica, de 10 a 15 mm de largo, testa color crema, suave, esponjosa de 1 mm de grosor. El embrión es recto, de color blanco o amarillo crema y ocupa toda la cavidad de la semilla la cavidad de la semilla y esta mide desde 1.5 x 1.3 cm, madura de octubre a diciembre, con dos cotiledones gruesos, carnosos y la radícula es corta (Pennington T. D., Sarukhán J., 1998; Kearns D. M., *et al.*, 1998).

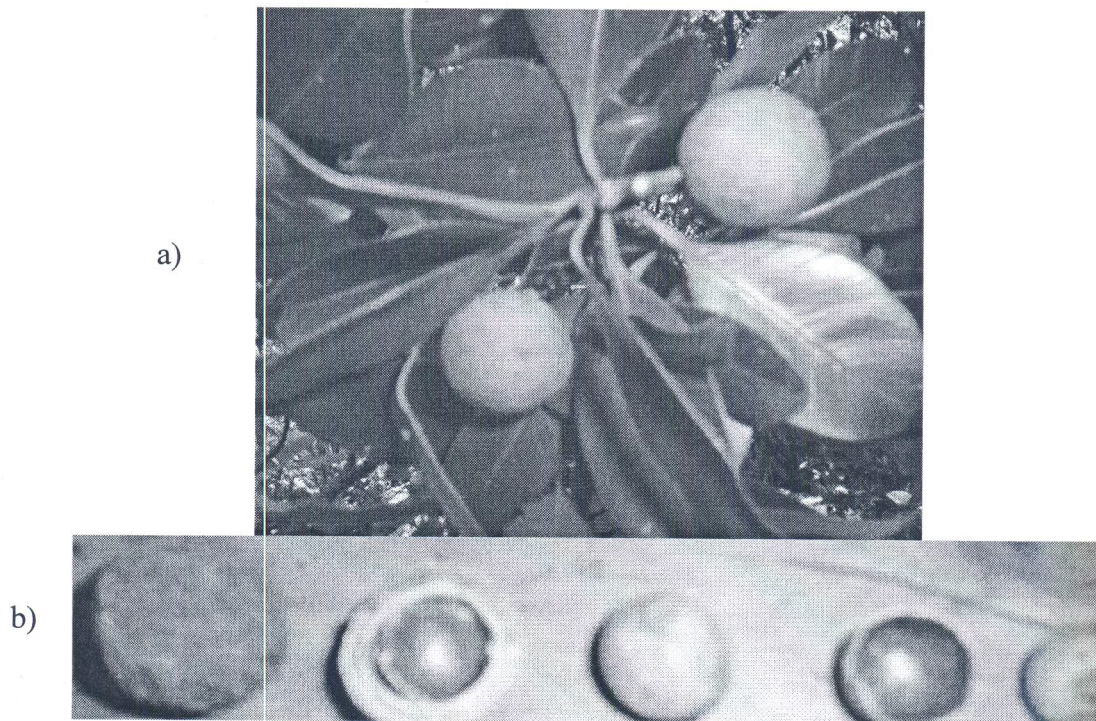


Figura 12. Se presentan a) frutos recién de colectados, b) se observan las diferentes capas desde el fruto: pericarpio, exocarpio, mesocarpio, endocarpio hasta la semilla.

6.1.2. Distribución y Ecología

Calophyllum brasiliense se distribuye en la vertiente del Golfo de México desde el sur de Veracruz, hasta Quintana Roo, y en la vertiente de Pacífico desde Nayarit hasta Chiapas.

Se encuentra principalmente como componente de selvas altas perennifolias y sudcaducifolias, en suelos con buen drenaje, derivados tanto de material calizo como ígneo y metamórfico. En el sur de Veracruz, oeste de Tabasco y norte de Chiapas, es especie muy abundante y codominante de la selva alta perennifolia (Pennington T.D., Sarukhán J., 1998).

Cuadro 8. Nombres comunes de *Calophyllum brasiliense* en México (Echenique-Manrique, 1970; Ortega, et al., 1991).

NOMBRES COMUNES EN MÉXICO:	LOCALIDAD Y ESTADO
Barí	Pichucalco, Chiapas
	Sur de Tabasco
	Sur de Tabasco
	Costa de Oaxaca
Barillo	Oaxaca
Barillo	Oaxaca
Cedro Cimarrón	Oaxaca
Cimarrón	Oaxaca
Guaya ó Gluaya	Campamento San Joaquín, Chiapas
	Teapa, Tabasco
	Costa de Oaxaca
Leche María	Oaxaca
	Chiapas
	Tabasco
	Veracruz
Mariquita	Sierra de Atoya, Guerrero
Palo María	Nayarit, Sierra de Atoyas, Guerrero
Santa María	Chiapas
María	Chiapas
Marilo	Chiapas
Ocú	Tehuantepec Oaxaca
Sacbalamté o Sakbalamte	Lengua Tzeltal, El Real, Chiapas.

6.1.3 Etnobotánica (usos)

6.1.3.1. Medicinales

Los campesinos de la Cuenca del Río Balsas, en el Estado de Guerrero utilizan el aceite de las semillas, para curar algunas enfermedades cutáneas. El látex llamado “bálsamo de María “, dicen: “De las incisiones hechas en la corteza brota un látex amarillo empleado como tópico por la gente del campo para cicatrizar el ombligo de los recién nacidos cuando este tiene tendencia a no secar” (García, 1992). En la sierra de Átoyac, Guerrero, el té elaborado con la corteza de este árbol se da de beber a las parturientas durante nueve días para que les limpie la matriz (Soto, 1995).

El látex de la corteza de este árbol es usado tradicionalmente por los indígenas del Popoluca el sur de Veracruz para tratar el dolor de dientes y para prevenir infecciones por microorganismos.

6.1.3.2. Industriales

La madera de esta especie es considerada de muy buena calidad y es empleada en la fabricación de durmientes, duela, vigas para puentes, accesorios agrícolas, mangos para herramientas, chapa para vistas de madera tércida y triplay, construcción de muebles finos, tejamanil, armazones, paredes exteriores e interiores y columnas (Echenique-Manrique, 1970; Pennington *et al*, 1968; Barcenás, *et. al.*,1980).

6.1.4. Fitoquímica

6.1.4.1. Frutos

Plattner R. D., *et al* (1974) reportaron compuestos del aceite de las semillas de los cuales encontraron 2 cromanonas, ácido apetalico e isopetalico (Figura.13).

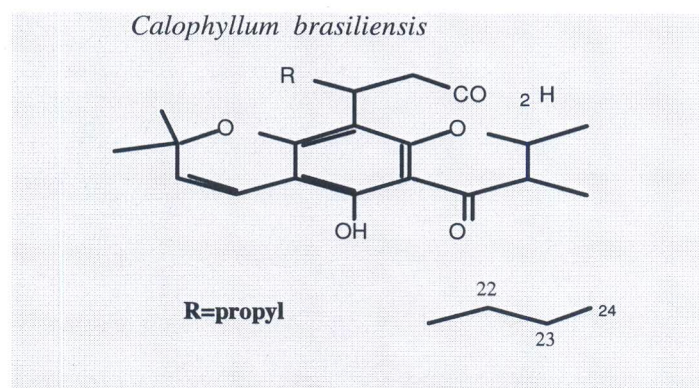


Figura 13. Cromanona aislada del aceite de semilla de *Calophyllum brasiliense*

En el laboratorio del instituto de química de la UNAM, se analizaron los frutos *Calophyllum brasiliense* de un ejemplar colectado en la Sierra de Santa Martha, Veracruz. Obteniendo los siguientes compuestos del tipo del las cumarinas, que fueron los constituyentes mayoritarios en los extracto de hexano y diclorometano. Dichas cumarinas poseen una mezcla de cumarinas las cuales son las siguientes:

Mammea A/BA, Mammea A/BB, Mammea epi A/BB, todas las cumarinas antes mencionadas se han aislado de *Mammea Americana* Figura, (Cuadro, 9) (González Paredes, 1999) (Figura 14).

Mammea

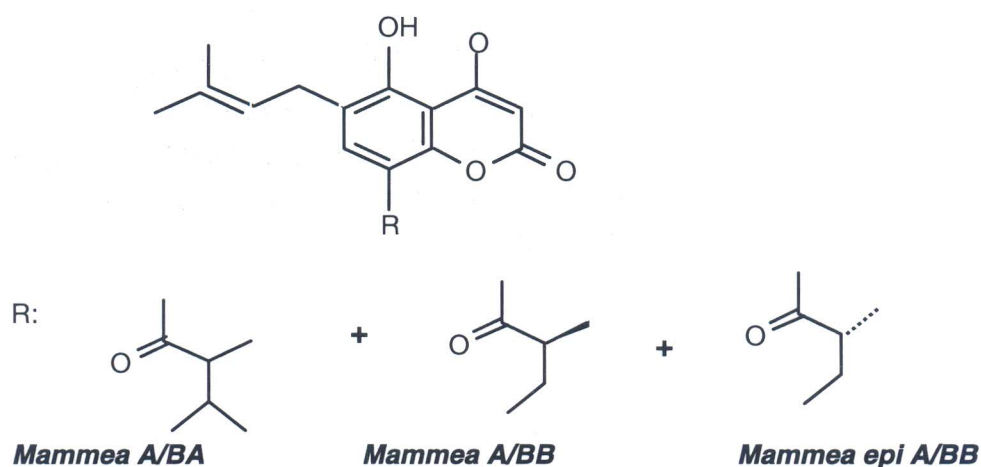


Figura 14. Cumarinas aisladas de los Frutos de *Calophyllum brasiliense* colecta en Santa Martha, Veracruz

6.1.4.2. Hojas

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

En el Laboratorio del Instituto de Química de la UNAM, se analizaron las hojas de un ejemplar colectado en la Sierra de Santa Martha, Veracruz. Presentó como componentes principales cumarinas del tipo de las mammeas, como son mammea A/BA, A/BB, isomammeigina, mammea B/BA, B/BB, C/OA, C/OB, B/BA ciclo F y B/BB ciclo F (Figura 15). También se aislaron triterpenos como la friedelina y canofilol, el biflavonoide amentoflavona y los ácidos protocatehuico y shikímico (Figura 15). Las cumarinas mostraron efecto citotóxico sobre líneas tumorales K562 (linfoma), U251 (sistema nervioso central) y PC3 (próstata) (Cuadro 9). Las mezclas de mammea A/BA+A/BB y mammea C/OA + C/OB inhibieron el crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo, cuando estos compuestos fueron evaluados contra TR VIH-1, ninguno de ellos mostró actividad mayor al 10% de inhibición (Reyes-Chilpa R., *et al.*, 2004).

Se realizó un nuevo estudio de hojas de otro lugar en San Andrés Tuxtla, Veracruz dado que al analizar un ejemplar por cromatografía en capa fina, se encontró que la composición química de los extractos de hexano era diferente. Por lo que se procedió a investigar más a fondo; se identificaron 10 compuestos de las hojas, de los cuales las cromanonas, ácido apetalico, ácido isoapetalico, así como los triterpenos, friedelina y canofilol y un bioflavonoide, amentoflavona, fueron inactivos contra VIH-1 (Figura 15).

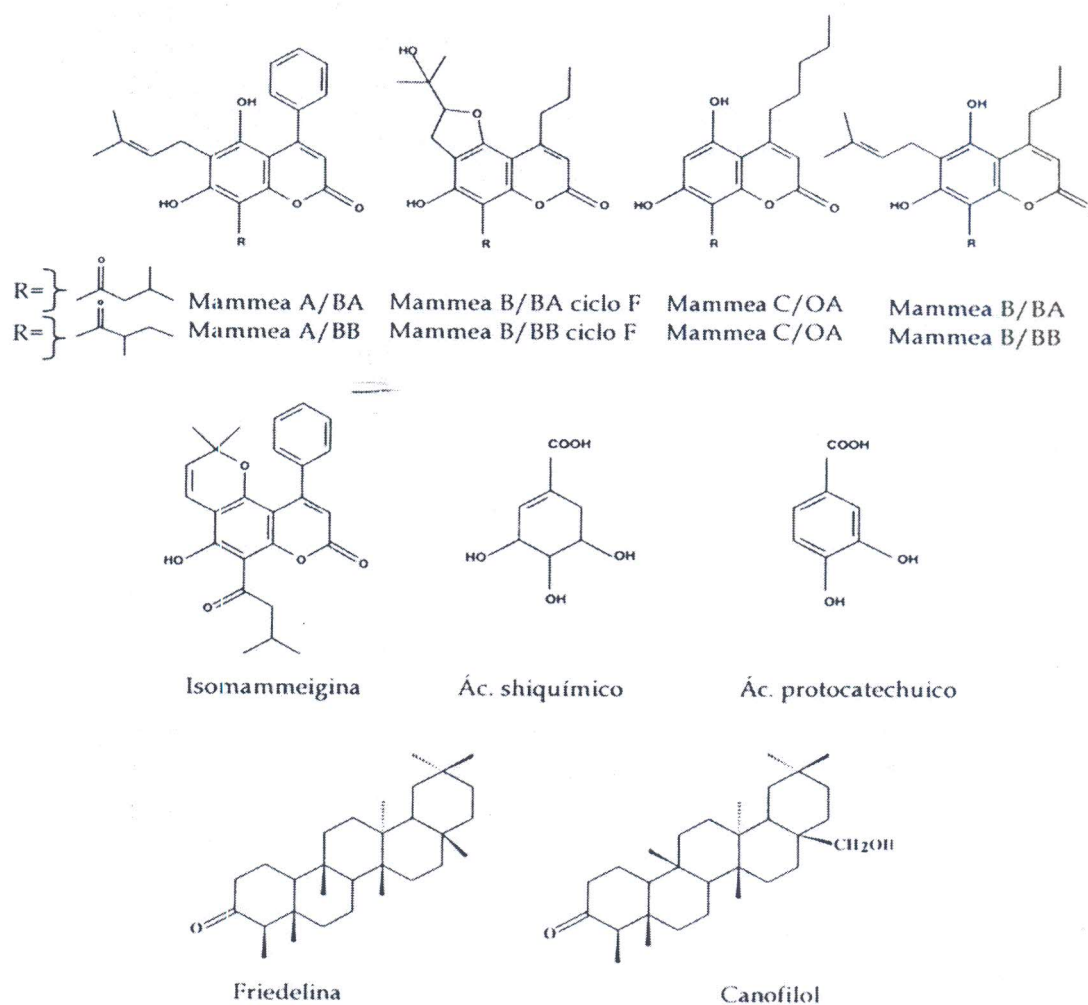


Figura 15. Cumarinas, ácidos y triterpenos aislados de las hojas de *Calophyllum brasiliense* colecta en Santa Martha, Veracruz.

Pero las dipiranocurnarinas (+)-calanólido A (6), (-)-calanólido B (7), y soulattrólido (9) fueron identificados como responsables de las propiedades anti VIH evaluadas, mientras

que el (+)-calanolido C (8) mostró una actividad inhibitoria moderada sobre TR VIH-1 (Figura 16) (Cuadro 9) (Huerta-Reyes., 2004).

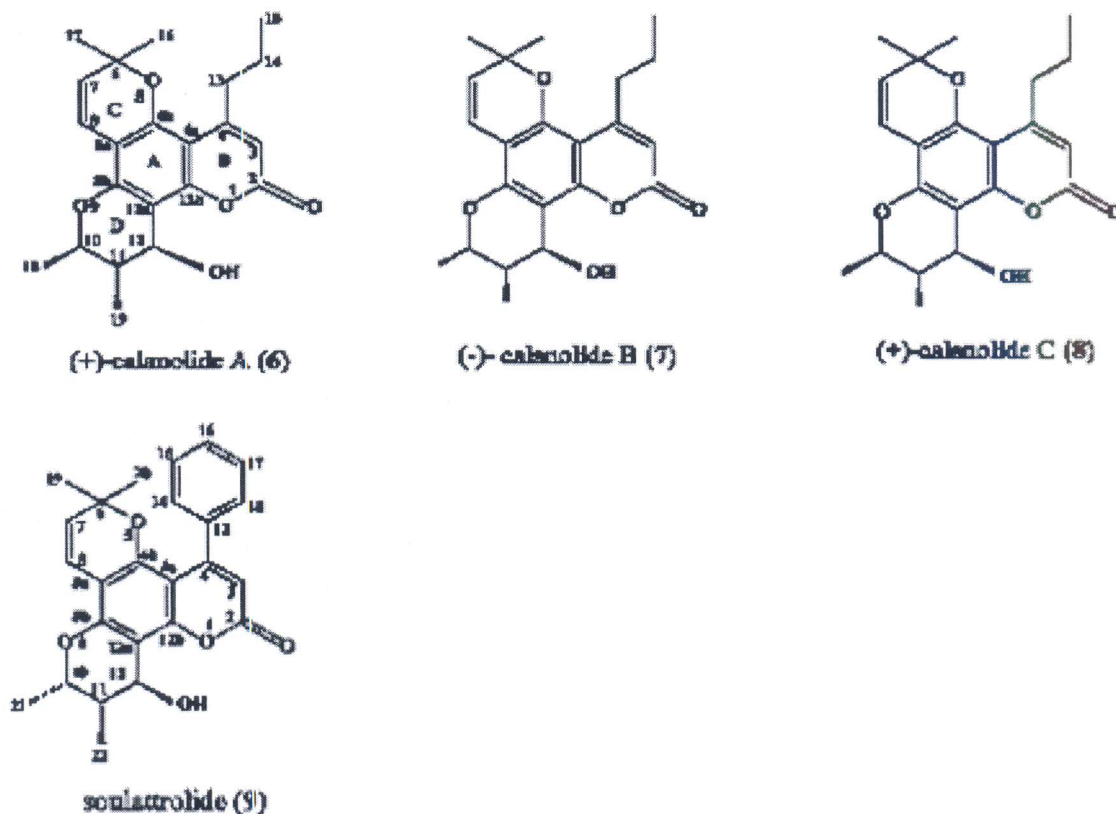


Figura 16. Cumarinas aisladas de las hojas *Calophyllum brasiliense* colecta en San Andrés Tuxtla, Veracruz

6.1.4.3. Corteza

Se realizó un estudio por Ito C., *et al.* (2002) se aislaron 7 nuevas xantonas (brasixantonas I, II, III, IV, V, Va) (Figura 17) aisladas de la corteza de un ejemplar colectado en Brasil, y 3 nuevas cumarinas 4- sustituida (Ito C., *et al.*, 2003c) (Figura 17). Entre estos compuestos 4 xantonas y las 3 cumarinas mostraron actividad inhibitoria significativa sobre la activación del virus Epstein-Barr (Cuadro 9).

En otro estudio, la corteza de un ejemplar colectado en nuestro país en Soteapan, Veracruz. Se aislaron 6 nuevas cromononas, como los ácidos: brasiliemsofilico C e isobrasiliemsofilico C de la corteza de *Calophyllum brasiliense*. Las cuatro primeras cromononas presentan u anillo ciclobutiril poco frecuente y las últimas cromononas

presentan sustituyentes isopropílico (Figura 17). Las cromanonas se evaluaron en ensayos de actividad antibacteriana contra las bacterias gram-positivas *Bacillus cereus* y *Staphylococcus epidermis*, donde sólo brasiliensofílico A e isobrasiliensofílico A mostraron alta actividad inhibitoria (MIC= 1 µg/ml). Los compuestos ácido brasiliensofílico B, isobrasiliensofílico B, presentaron moderada actividad inhibitoria (MIC= 4 µg/ml), mientras que los brasiliensofílico C e isobrasiliensofílico C fueron menos activos (MIC= 16 µg/ml).

La presencia de un anillo ciclobutiril en los compuestos brasiliensofílico A, isobrasiliensofílico A, ácido brasiliensofílico B e isobrasiliensofílico B puede contribuir a la actividad antibacterial observada. Estas 6 cromanonas también fueron probadas en ensayos de citotoxicidad en líneas celulares como KB, HeLa, jurkat T y células canceríneas de miosarcoma; sin embargo ninguno de los compuestos presentó actividad significativa (IC₅₀>20µg/ml)= (Cottiglia F., *et al.*, 2004).

6.1.4.4. Resina

Stout G. H., Krahn M. M. y Breck G. D. (1968) estudiaron la resina de la corteza de *C. brasiliense* var *rekoi* (Costa rica) y obtubieron de 2 cromanonas, el ácido brasiliénsico y el ácido isobrasiliénsico (anteriormente reportadas del aceite de semillas).

6.1.4.5. Madera

Del Duramen de *C. brasiliense* proveniente de los ejemplares colectados en brasil (Pereira M. O., Gottlieb O. R., Magalhaes M. T., 1966; 1967) y también de un ejemplar de México (Chiapas) se han aislado principalmente xantonas simples y prenildas, así como triterpenos del tipo de la friedelina. La muestra mexicana presentó únicamente xantonas prenildas, mientras que la de Brasil contuvo ambos tipos. Las xantonas prenildas jacareubina, 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona, 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona mostraron actividad inhibitoria (67.3%) del crecimiento micelial del hongo de pudrición morena *Postia placenta* (Reyes Chilpa R., Jimenez – Estrada M., Estrada–Muñiz E., 1997). Recientemente, Abe F., *et al.*, 2004, reportó estas xantonas (poseen alta actividad tripanocida (vs. *Tripanosoma cruzi*)).

ninguno de ellas mostró actividad inhibitoria (Estrada- Muñiz E., 2001).

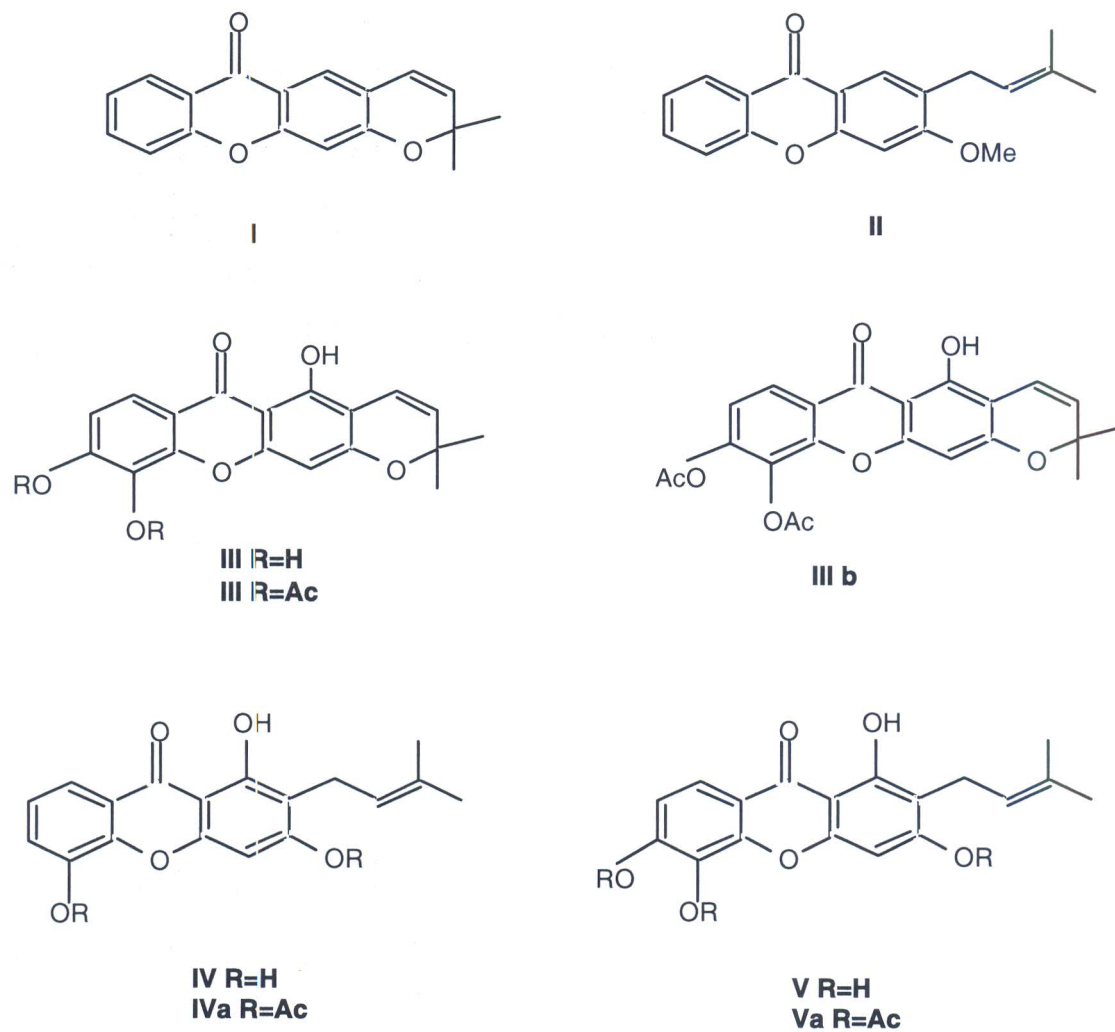


Figura 17. Xantonas aisladas de *Calophyllum brasiliense*

Calophyllum brasiliense con propiedades antitumorales y actividad antiviral

Siguiente Cuadro muestra lo estudiado de *Calophyllum brasiliense*, en pruebas biológicas con líneas celulares tumorales y ensayos hechos líneas infectadas con el Virus tipo 1.

Cuadro 9 Compuestos aislados de *Calophyllum brasiliense*

Clase	Compuesto Químico	Parte de la Planta	Lugar	Sitio de Acción	Fuente
Triterpeno	Friedelina	Hojas	Santa Martha, Veracruz	Líneas Celulares (PC-3)	Estrada-Muñiz, E. 2001
Triterpeno	Canofilol	Hojas	Santa Martha Veracruz	Líneas Celulares (HEp-2)	Estrada-Muñiz, E. 2001
Xantonas	I	Duramen	Santa Martha, Veracruz	Líneas Celulares (HeLa, HEp-2, PC-3, U251) virus Epstein-Barr	Estrada-Muñiz, E. 2001
Xantonas	III	Duramen	Santa Martha, Veracruz	Líneas Celulares (HeLa,U251, HEp-2) virus Epstein-Barr	Estrada-Muñiz, E, 2001
Xantonas	III y IV	Duramen	Santa Martha, Veracruz	Líneas Celulares (HeLa, HEp-2) virus Epstein-Barr	Estrada-Muñiz, E. 2001
Xantonas	V	Duramen	Santa Martha, Veracruz	Líneas Celulares (HeLa,K562,HEp-2, U251) virus Epstein-Barr	Estrada-Muñiz, E, 2001
Cumarinas	Isomameigina (Mammea A/BA ciclo D)	Hojas	Santa Martha, Veracruz	Líneas Celulares (PC-3)	Estrada-Muñiz, E. 2001

Continúa.....

Cumarinas	Mammea A/BA + A/BB	Hojas	Santa Martha, Veracruz	Líneas Celulares (HeLa, HEp-2, PC-3, K562, U251)	Estrada- Muñiz, E. 2001
Cumarinas	Mammea C/COA + C/OB	Hojas	Santa Martha, Veracruz	Lineas Celulares (HeLa, HEp-2, PC-3, K562, U251)	Estrada- Muñiz, E. 2001
Cumarinas	Mammea B/BAc.F + B/BB c. F	Hojas	Santa Martha, Veracruz	Líneas Celulares (K562, U251)	Estrada- Muñiz, E. 2001
Dipiranocumarinas	(+)-Calanólido A	Hojas	San Andres Tuxtla, Veracruz	Inhibición TR VIH-1	Huerta- Reyes, M. 2004
Dipiranocumarinas	(-)-Calanólido B	Hojas	San Andres Tuxtla, Veracruz	Inhibición TR VIH-1	Huerta- Reyes, M,2004
Dipiranocumarinas	Soulatrólido	Hojas	San Andres Tuxtla, Veracruz	Inhibición TR VIH-1	Huerta- Reyes, M. 2004
Dipiranocumarinas	(+)-Calanólido C	Hojas	San Andres Tuxtla, Veracruz	Inhibición moderada TR VIH-1	Huerta- Reyes, M. 2004
Cumarinas	Mammea A/BA	Semilla Endocarpio y exocarpio	Santa Martha, Veracruz	No probados Posibles Líneas Celulares (HeLa, HEp-2, PC-3, K562, U251)	González- Paredes, M, 2000
Cumarinas	Mammea A/BB	Semilla Endocarpio y exocarpio	Santa Martha, Veracruz	No probados Posibles Líneas Celulares	González- Paredes, M, 2000

Continúa.....

Cumarinas	Mammea C/CA	Semilla Endocarpio y exocarpio	Santa Martha, Veracruz	No probados Posibles Líneas Celulares (HeLa, HEp-2, PC-3, K562, U251)	González-Paredes, M, 2000
Cumarinas	Mammea C/CB	Endocarpio y exocarpio	Santa Martha, Veracruz	No probados	González-Paredes, M, 2000
Cumarinas	Mammea C/BA	Endocarpio y exocarpio	Santa Martha, Veracruz	No probados	González-Paredes, M, 2000

(HeLa, HEp, líneas epiteliales)

6.2. Aspecto Económico

Lo único que se ha estudiado a nivel económico hasta nuestros días es el rendimiento de las hojas del *Calophyllum brasiliense*

La biomasa de la copa del árbol ocupa el 25 % de la biomasa total arbórea, por lo que el peso de la biomasa de la copa del árbol es de 988.514 kg de peso en verde y la biomasa cosechable es de un tercio, dado que se debe podar el árbol de manera que este aprovechamiento sea sustentable. Para la obtención tanto de (+)- Calanolido A como de sus otros componentes se requiere follaje en seco, lo cual reduce el peso en verde en aproximadamente la mitad de su peso en verde lo cual nos da como resultado 188.29 kg aprovechables de follaje en seco (Cuadro 10).

Cuadro 10. Rendimiento de la Biomasa de la Copa de *Calophyllum brasiliense*

Biomasa arbórea	Biomasa total de la copa	Biomasa cosechable de la copa	
		Kg / verde	Kg / seco
3954.055	988.514	329.504	188.29

Fuente: Elaboración propia con base en www.dcf.ufla.br/Cerne/revistav2n2-1996/021_95.PDF

De un kilogramo de hojas secas de *C. brasiliense* procesado en 2 litros de hexano se obtuvieron 52 gr. de extracto de los cuales 260 mg son (+)-calanolido A (cuadro 5.6). Aunque en relación a los demás componentes que se obtienen de las hojas de *C. brasiliense* el (+)- Calanolido A es menor; al cosechar una tercera parte del total de la copa del árbol obtenemos 48955.4 mg de (+)- Calanolido A por árbol.

Cuadro. 11 Rendimiento de extractos obtenidos de la hojas de *Calophyllum brasiliense*

Extractos obtenidos de las hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i>								
Hexano.	H. Secas	Extracto	(+)-C A	(-)- C B	Friedelina	Canofil.	Biflov.	Croman.
lt	kg	gr	mg	mg	mg.	mg	mg.	mg.
2	1	52	260	1560	582.64	524.37	407.84	
4	2	104	520	3120	1165.28	1048.74	815.69	
30	15	780	3900	23400	8739.60	7865.55	6117.60	
50	25	1300	6500	39000	14566.01	13109.25	10196.02	
96	48	2496	12480	74880	27966.72	24169.76	19576.31	
376.58	188.29	9791.08	48955.4	293732.4	109774.39	98733.63	76792.20	

Fuente: (Huerta-Reyes, M., 2004)

Considerando que en una hectárea habitan 125 árboles de *C. brasiliense* y que de cada árbol se obtienen 188.29 kilogramos de follaje en seco, entonces tendremos 23,536.25 kilogramos en seco por hectárea en cada cosecha, la cual es anual, en los meses de abril o mayo; y que representa 6, 119,425 mg de (+)- Calanolido A (Huerta-Reyes, 2004).

6.2.1. Evaluación económica comparada con medicamentos antivirales

El precio del Calanolido A se estableció bajo el principio de bienes sustitutos, el cual nos dice que el bien B es sustituto de A. Es decir, un bien que podemos reemplazar por otro. que en este caso los anti retrovirales: Nevirapina y AZT (Zidovudina), son bienes sustitutos del (+)-Calanolido A. Los precios del ATZ (Zidovudina) y Nevirapina, fueron tomados de la *Negociación de la Subregión Andina Para el Acceso a Medicamentos Antiretrovirales*. Siendo el precio mínimo el del AZT (Zidovudina) y el precio máximo el de la Nevirapina por lo que sacando una media el precio hipotético del (+)-Calanolido A es de 80.50 pesos por cada 250 mg (Cuadro 12).

Cuadro 12 Precios de los medicamentos Antiretrovirales

PROCESO DE NEGOCIACIÓN CONJUNTA PARA EL ACCESO A MEDICAMENTOS ANTIRETROVIRALES EN LA SUBREGION ANDINA (PESOS)			
DOSIS	AZT (ZIDOVUDINA)	NEVIRAPINA	CALANOLIDO A (pesos)
250 mg	75.00	86.25	80.50
200 mg	60.00	69.00	64.50
100 mg	30.00	34.50	32.00
25 mg	7.50	17.25	12.38

Fuente: www.gcth-sida.org/pdf/nego/laborat.pdf

Dado el precio del (+)- Calanolido A por cada 250 mg, tenemos que el valor total de la producción si se vendiera 6, 119,425 mg. de (+)- Calanolido A sería de 1, 970, 454.85 pesos obtenidos en una hectárea por cosecha.

El valor presente neto se obtuvo con una tasa de interés de 6.5%, y se calculó la razón beneficio/costo El precio hipotético del Calanolido A se fijó por medio de los precios de sus bienes sustitutos, en este caso el ATZ y la nevirapina, (precios dados por el Instituto Nacional de Cancerología de México) (Cuadro 12) (López Tapia, 2005).

7. CARACTERÍSTICAS DEL ÁREA DE ESTUDIO

7.1. Localización de San Andrés Tuxtla, Veracruz

El municipio de San Andrés Tuxtla se encuentra localizado geográficamente en el Norte del Estado de Veracruz entre las coordenadas extremas del meridiano $95^{\circ} 00'$ al $95^{\circ}23'$ de longitud Oeste y del paralelo $18^{\circ} 14'$ al $18^{\circ} 44'$ de latitud Norte. Su altitud promedio es de 323 metros sobre el nivel del mar.

Tiene una superficie de 918.77 kilómetros cuadrados, lo cual representa el 1.26 por ciento del total del estado. Limita al Norte con el Golfo de México, al Sur con el municipio de Hueyapan de Ocampo, al Este con Catemaco y al Oeste con Ángel R. Cabada y Santiago Tuxtla.

7.1.1. Geología

En los Tuxtlas la roca madre que predomina es la sedimentaria.

7.1.2. Orografía

Esta situado en la zona sur del estado, sobre estribaciones del conjunto montañoso de los Tuxtlas presenta una amplia división de zonas que van desde la clasificación “ondulado”, “quebrado”, “cerril”, y hasta escarpado o muy “escarpado. También en el municipio se encuentra ubicado en la zona sur del Estado y dentro del conjunto montañoso de la Sierra de los Tuxtla o de San Martín (SG, 1988).

Limitando al norte con las llanuras de Sotavento, al oeste con el estado de Oaxaca y por el sur y el sureste con Chiapas y Tabasco, se localiza la Región de Las Selvas.

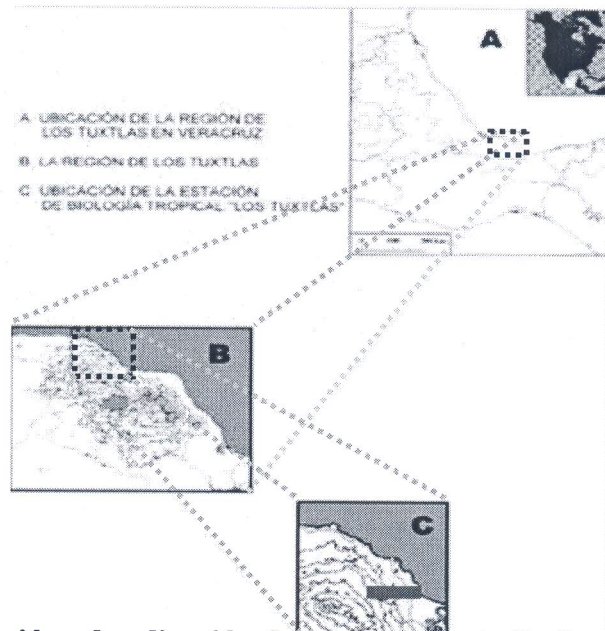


Figura 18. Ubicación y localización de la zona de estudio San Andrés Tuxtla Veracruz

7.1.3. Hidrografía

El río San Andrés y arroyos múltiples, como Sihuapan, Matosapa, Tejelate y Pipizole, que son tributarios del Río San Andrés y éste del afluente Río San Juan que descarga sus aguas en el Papaloapan.

7.1.4. Clima

Su clima es tropical y su régimen térmico cálido –regular, con una temperatura media anual de 24.6°C, siendo una de las zonas de mayor precipitación pluvial del estado.

7.1.5. Clasificación y uso del suelo

Su suelo es variado, clasificándose dentro del acrisol y litosol, cuyas características son acumulación de arcilla, pobres nutrientes con vegetación de selva o bosque y susceptibles a la erosión.

7.1.6. Flora y Fauna

La vegetación predominante es la selva alta perennifolia, vegetación dunas costeras y vegetación secundarias.

La fauna está representada por una gran variedad de especies como son los mamíferos changos, manzate, jabalí, armadillos, etc. Entre las aves se encuentra el cotorro, la paloma, etc.

7.1.7. Agricultura

La actividad agrícola que se realiza en el municipio gira en torno al cultivo de los siguientes productos: maíz (*Zea mays* L.), plátano (*Musa paradisiaca* L.), mango (*Mangifera indica* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), café (*Hibiscus esculentus*), arroz (*Oryza sativa* L.), naranja (*Citrus aurantium* L.), sandía (*Citrullus lanatus*) y chile verde (*Capsicum frutescens*).

7.1.8. Grupos étnicos

Las únicas lenguas indígenas habladas en San Andrés Tuxtla son Popoluca, Nahuatl, Chinanteca y Zapotecas. Es evidente que el legado cultural de los pueblos indígenas está presente en todas las dimensiones de la historia actual en Veracruz, pero sus conocimientos, saberes y prácticas respecto al ambiente, como un referente cultural primordial de los pueblos indios, son casi desconocidos y subvaluados (SG, 1988).

7.2. Localización de Atoyac de Álvarez, Guerrero

El Municipio de Atoyac de Álvarez se localiza al suroeste de la capital del Estado, en la región Costa Grande, a 84 kilómetros de distancia aproximadamente de Acapulco a la cabecera municipal sobre la carretera Acapulco-Zihuatanejo. Determinada su

localización de los paralelos 17° 03' y los 18° 32' de latitud Norte los 100° 05' y 100°34' de longitud Oeste, respecto del meridiano de Greenwich.

Al norte colinda con los municipios de San Miguel Totolapan, Ajuchitlán del progreso y Heliodoro Castillo; al sur con el municipio de San Jerónimo; al este con el de Coyuca de Benítez y Chilpancingo y al oeste con el Techan de Galeana. Tiene extensión territorial de 1,688.4kilómetros cuadrados que representan al 2.64 % de la superficie estatal y el 11.44 por ciento de la regional.

7.2.1. Geología

En el Municipio de Atoyac Álvarez la roca madre que predomina es sedimentaria.

7.2.2. Orografía

El municipio es montañoso en toda la parte norte, sobre la Sierra Madre Occidental se hallan las elevaciones conocidas como: el cerro de Teotepec, o Montaña de Dios, considerando el más alto estado, que alcanza una altitud de 3,705 metros sobre el nivel del mar; Cabeza de venado a 2,160; Patacuas 1,800; El Plateado 1,650; Este aspecto de relieve abarca aproximadamente el 70% de la superficie municipal, mientras que las zonas semiplanas el 20% y planas el 10%.



Figura 19. Ubicación y localización de la zona de estudio Atoyac de Álvarez, Guerrero

7.2.3. Hidrografía

El terreno Municipal se encuentra regado por los recursos hidrológicos siguientes: el río Atoyac principalmente, con un escurrimiento anual de 835.6 millones de metros cúbicos y una cuenca de captación de 914 kilómetros cuadrados, cuya desembocadura se encuentra en el Océano Pacífico. También están entre los recursos del municipio, los ríos El Chiquito, y la Pintada; entre los arroyos están el Santiago, el Camarón, El Paraíso, Las Delicias y otros. Por otro lado cuenta con una obra muy importante en cuanto a captación se refiere, la Presa Atoyac; y recibe las aguas de la laguna Mitla.

7.2.4. Clima

Los climas predominantes en el municipio son los subhúmedos cálidos. Y subhúmedos semicálidos, con temperaturas que oscilan entre 28 a 30°C y régimen de lluvias que abarcan los meses de junio, julio, agosto y septiembre, cuya precipitación promedio anual es de 1,236 milímetros; la dirección de los vientos presentan ligeras variaciones, pero en general son de suroeste a noroeste.

7.2.5. Clasificación y uso del suelo

Respecto a los tipos de suelos en el municipio predominan los chernozem o negros, café grisáceos, café rojizo y amarillo bosque, estepa pariré o pradera con descalcificación, además de dominara las rocas graníticas en las vienen depósitos de tungsteno de variedad de suelita (9wo3). También se localizan terrenos salitrosos bañados por las aguas de la laguna de Mitla, existen mantos de piedra caliza, de donde se obtienen cal; y mantos de arcilla que es aprovechada para la fabricación de ladrillos.

7.2.6. Flora y Fauna

La flora es de tipo baja mediana caducifolia, caracterizada por que sus especies son de talla baja con altura de menos de 15 metros. La fauna: mariposas, venados, panteras, etc.

7.2.7. Agricultura

La superficie de destinada a la agricultura es de 41,960 hectáreas que presentan el 24.9 por ciento de la extensión territorial municipal, de las cuales el 83.7% son de temporal y el 16.1% de riego. La extensión ejidal dedicada a la actividad ganadera es de 3,800 hectáreas, de las cuales el 82.3% son de tierras de agostadero y el 17.6% de praderas.

7.2.8. Grupos étnicos

Las únicas lenguas indígenas habladas en Atoyac de Álvarez, Macro-Mixteco, Zapoteca y otros (SG, 1988).

La distribución geográfica de *C. brasiliense* en la República Mexicana abarca los siguientes Estados: Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco y Veracruz.

C. brasiliense se distribuye en altitudes que oscilan entre los 200-3000 m.s.n.m. Siendo la más frecuente, la que va del rango de los 200-1000 m.s.n.m. Los climas donde se desarrolla son: subhúmedo, semicálido o cálido, sub ó húmedo, semi ó cálido y también en húmedos semicálido, como se puede observar en mapas anexos se puede decir que esta planta crece en zonas con mucho mayor precipitación. Por otra parte, se observó que la planta se encuentra en una gran diversidad de rocas principalmente en sedimentarias, suelos vertisol, regosol, andosol, acrisol y nitosol, por lo que respecta a su vegetación predomina la Selva alta y lo encontramos también en matorral espinoso. Se encontró un mapa en Internet (Modificado de Missouri Botanical Garden pagina www.mobot.org.) también creado en una base de datos, en donde se tiene considerados casi los mismos estados antes mencionados, pero ellos no encontraron que en Jalisco también crece la planta, así que nosotros lo reportaremos como nuevo en la revisión . En lo que respecta a los grupos étnicos encontrados son diversos, la lengua que predomina es la Maya, Macro-Mixteco, y Yutazteco-Cuitlatleco, pero ahora que se realizó la exploración etnobotánica se pudo observar que quedan pocas comunidades y por tanto pocos grupos étnicos.

Los materiales obtenidos para este estudio se generaron de 2 colectas, una en el estado de Veracruz, comunidad San Andrés Tuxtla que se encuentra a 2000 m.s.n.m., con clima húmedo semicálido, el tipo de roca que predomina es sedimentaria y el suelo es el

acriso, mitosol y regosol, su vegetación es selva alta prerennifolia, la lengua Yuzazteco, cuitlatleco y Maya, pero de esta última es la que encontramos en las comunidades que hablan y el otro lugar de colecta fue Guerrero comunidad el Paraíso que está a una altitud de 1602 m.s.n.m., con clima subhúmedo semicálido, la rocas son sedimentarias y metámorficas, el tipo de suelo es regosol, su vegetación es selva baja caducifolia; lengua registrada es Macro-mixteco (SG, 1988).

8. METODOLOGÍA

La metodología propuesta para cumplir los objetivos del presente trabajo, consistió en 2 fases:

8.1. Exploración Etnobotánica

8.1.1 Revisión Bibliográfica (Gabinete)

La información obtenida (nombre científico, nombre común, familia, estado, localidad, municipio, latitud, longitud, altitud y usos) de las etiquetas de los siguientes herbarios UNAM, IPN, IMSS, CP y UACH; se utilizaron para realizar el mapa de distribución silvestre.

8.1.2 Entrevistas

La aplicación del cuestionario se realizó en el municipio de Catemaco y en las localidades de Montepío y San Andrés Tuxtlas, pertenecientes al Estado de Veracruz, México. Así como en el Municipio de Atoyac de Álvarez y en la localidad de El Paraíso perteneciente al Estado de Guerrero, México. El Cuestionario se realizó mediante el intercambio de conocimientos y materiales con la gente utilizando la metodología “flujo de información bilateral” (Estrada, 1999).

Cuestionario a pobladores y curanderos los municipios Atoyac de Álvarez (Paraíso) de Guerrero y Veracruz (Montepío, San Andrés Tuxtla y Laguna Escondida):

1. Nombre del poblado:

2. Nombre de la persona:

3. Edad.

4. Sexo.

5. ¿Conoce la planta?

Si___ No___

Si la respuesta es sí pase a la pregunta 6.

6. ¿Sabe cómo se llama o con qué nombres la conocen?

7. ¿Sabe para qué sirve?

Si___ No___

Si la respuesta es si pase a la pregunta 8.

8. ¿Para qué se usa y cómo se toma?
9. ¿Qué parte de la planta se usa?
10. ¿Dónde o de quién aprendió los usos de la planta? (abuelita, curandero, etc.).
11. Desde cuándo la conoce?

8.1.3. Colectas del material Biológico

La colecta del material biológico se realizó el 4 de febrero de 2006 en San Andrés Tuxtla (Veracruz, México).

En el estado de Guerrero, se realizó la colecta el 19 de marzo del 2006 en el Municipio de Atoyac de Álvarez en la localidad el Paraíso.

Ambas colectas se localizaron por coordenadas geográficas (San Andrés Tuxtla, Veracruz Longitud Oeste: 95° 04' Y 95° 9' Latitud Norte: 18° 34' y 18° 36', Atoyac de Álvarez, Guerrero Latitud Oeste: 17° 24'57'' y Longitud Norte: 100° 90'46''), éstas fueron:

- 1.- Se seleccionó el material Biológico con las siguientes características: que las ramas tuvieran hojas y frutos no fragmentados.
- 2.- Ya seleccionada la rama se cortó (con pinzas de podar)
- 3.- El espécimen se prensó; para luego desecarlo.
- 4.- Se monta el ejemplar en hojas de papel opalina anexando la etiqueta con datos (nombre científico, nombre común, familia, Estado, localidad, municipio, latitud, longitud, altitud, fecha de colecta, colector y usos (según la localidad)).

8.1.4. Colecta de material edáfico

Las colectas de suelo se realizaron el 4 de febrero del 2006 en San Andrés Tuxtla y la otra 19 de marzo del 2006 en el Paraíso, Guerrero, en ambas se localizó la zona en donde crece *C. brasiliense* de manera silvestre, se realizaron dos muestreos de suelo a una profundidad de 30 cm aproximadamente, los cuales se mezclaron y se obtuvo una muestra de un kilogramo con el objetivo de efectuar un análisis físico-químico del suelo

en el laboratorio de Fruticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

8.2. Trabajo de laboratorio

8.2.1. Anatomía del fruto de *C. brasiliense*

Por medio de técnicas histológicas, se analizaron los frutos de la manera siguiente:

1) Fijación con FAA

El material se fijo en una solución FAA (contiene 50% de etanol 5% ácido acético, 10% de (formaldehído al 37-40% y 35% de agua), permitiendo una mejor manipulación para los cortes.

2) Corte en parafina

a) El tejido se deshidrató y se embebió en: etanol 50%, 70%, 96 % (dos cambios), 100% (dos cambios), etanol-xileno 1:1, xileno 100% (tres cambios), y parafina fundida (dos cambios), etanol-xileno 1:1, xileno 100% (tres cambios), y parafina fundida (dos cambios) durante 4 ó 6 horas en cada cambio, dependiendo del grosor del tejido.

b) Los tejidos se colocaron en bandejitas de aluminio con parafina fundida (56-58° de punto de fusión), orientado el espécimen en el plano deseado. Se aplicó vacío para obtener una mejor penetración de la parafina y de esta manera reducir los problemas que se tiene con el corte del micrótomos.

d) Una vez solidificada la parafina, se cortaron trozos pequeños, los cuales se adhirieron a bases de madera mediante calor.

e) Se cortaron en un micrótomos rotatorio a grosores de 10 μ m. Una vez obtenida la cinta de cortes en serie, se seleccionaron los cortes en serie, bajo el microscopio estereoscópico. Se hicieron cortes transversales y longitudinales de pericarpio provenientes de Guerrero y Veracruz.

f) Los cortes seleccionados se adhirieron en portaobjetos con adhesivo de Haupt (1% de gelatina + 13% glicerol, + 2% de fenol, en agua) y unas gotas de 10% (formaldehído al 37-40%), en agua.

El tejido se extendió en la platina a 55°C; Finalmente los portaobjetos se dejaron sobre la platina a la misma temperatura, por al menos 24 horas.

g) La parafina se removió del tejido, colocando los cortes en tres cambios de xileno (3 minutos en cada cambio). Luego se hidrataron parcialmente, pasando los cortes de etanol 100%, 96%, 70% y 50%, con duración de 3 minutos en cada concentración.

h) Tinción con safranina y verde fijo

i) Los cortes desparafinados y parcialmente hidratados se ponen en safranina saturada (0.05% safranina 0 (saturada) + 13% p/v sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0.01% fenol, en agua) durante 3 horas a 55 °C.

j) Los cortes se lavaron en agua: luego se deshidrataron, pasándolos a etanol 50%, 70%, 96 y 100% (15 seg. en cada concentración). Posteriormente se tiñeron de verde fijo (0.12% de verde fijo en etanol al 96%) de 15 a 30 seg., dependiendo de la naturaleza del tejido.

Finalmente se lavaron con isopropanol 100% y se pusieron en xileno.

k) Antes de montar en resina, se eliminó el alcohol residual mediante tres cambios de xileno (3 minutos en cada cambio) para posteriormente observar en el microscopio.

8.2.2. Estudio Fitoquímico y Biológico

8.2.3. Preparación de extractos

Del material biológico (fruto maduro y hojas por separado) se molieron en fracciones pequeñas, para mejorar la superficie de contacto con el disolvente y así mejorar la extracción. Se realizaron extracciones a temperatura ambiente (24°C) durante una

semana con cada disolvente de polaridad creciente (hexano, acetona y metanol) con las correspondientes repeticiones (3,2, 2).

Los extractos se filtraron con papel filtro (Whatman) del número 4, para luego ser concentrados al vacío en un rotavapor.

8.2.4. Análisis por Cromatografía en capa fina

Se tomaron muestras de los extractos para el análisis por cromatografía en capa fina (c.c.f.) en fase normal (cromatofolios de Sílica Gel de 0.25mm de espesor Machery-Nagel) y en fase reversa (cromatoplasas de sílica gel C-18 de 0.15 mm de espesor Machery-Nagel). Como eluyentes se emplearon diferentes disolventes orgánicos. Como reveladores se utilizaron luz ultravioleta y una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N. Se determinó el Rf (frente de referencia de los compuestos en c.c.f.(Sílica Gel, 0.25mm de espesor). El Rf se calculó mediante la fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto (cm)}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente (cm)}}$$

Para lograr una adecuada dilución de las diferentes muestras de tal forma que fuese homogénea, probaron varios disolventes y mezclas de éstos. La óptima para todos los extractos fue diclorometano-hexano (9:1). Para tratar de eliminar errores en cuanto a la cantidad de extractos analizados, se pesaron muestras de estos y se diluyeron hasta alcanzar una concentración similar para todas. Para ello, se procedió a determinar los volúmenes para la dilución de cada una de las muestras. Se aplicaron también muestras de los extractos hexánicos de las hojas de *C. brasiliense* quimiotipo 1 (QTP1) y quimiotipo 2 (QTP2), así como compuestos puros previamente aislados en el laboratorio para determinar la identidad de los compuestos observados en las placas cromatográficas (Cuadro 13).

Cuadro 13. Muestras analizadas por cromatografía en capa fina en fase normal y fase de reversa.

Muestra	Tipo de muestra	Peso de la muestra (miligramos)	Volumen de Dilución* (mililitros)	Concentración de la solución (mg/ml)	Muestra Aplicada en (microlitros)
1	Hojas Santa Martha (HSM) Quimiotipo 1	52.1	3.2	16.0	20
2	Hojas San AndrésTuxtla (HT) Quimiotipo 2	9.2	0.5	16.0	20
3	Hojas Guerrero (HG)	291.0	4.9	16.0	30
4	Semilla San AndrésTuxtla (ST)	70.4	4.4	16.0	30
6	Endocarpio y exocarpio San AndrésTuxtla (CT)	72.9mg	28.2	16.0	20
7	Mammea B/BA ciclo F (M-59P)	1.0	3.0	3.0	20
8	Friedelina (Fr)	1.9	1.4	3.0	20
9	Canofilol (Ca)	0.3	2.4	3	20
10	Mammea A/BA (Suria-46)	0.2	1,8	3.0	20
11	Ácido apétalico	0.4	14.8	3	20

*Diclorometano-hexano 9:1

8.2.5. Constantes Físicas

Para el punto de fusión se determinó en un aparato fisher johns

8.2.6. Análisis Espectroscópicos

Los compuestos aislados se identificaron en espectros de infrarrojo (IR), utilizando espectrofotómetro (Perkin elmer 283-B y Nicolet FT-JR55X).

Espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN¹ H) se realizaron en espectrofotómetros Varian Gemini 2000(200MHz).

Espectros de carbono (RMN¹³C) éstos se determinaron en un espectrofotómetro Varian Gemini 2000(200MHz).

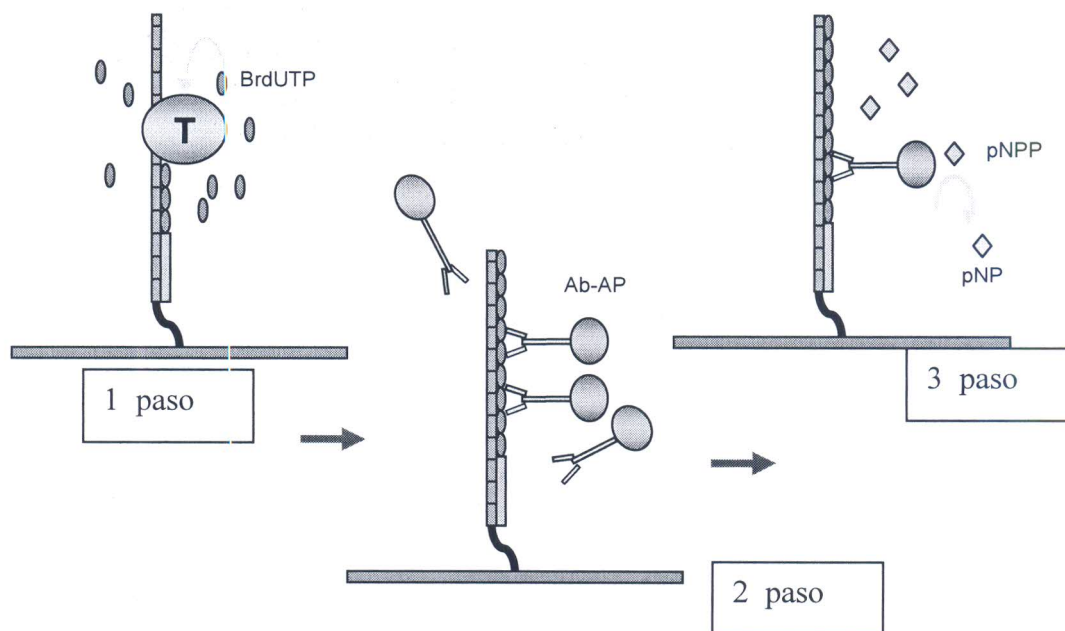
8.2.7. Evaluación biológica

Se evaluaron los extractos obtenidos con el kit Lenti-RT TM. La determinación de la actividad inhibitoria sobre la enzima TR VIH-1 de los extractos crudos se llevó acabo mediante un ensayo inmunológico, no radioactivo y colorimétrico denominado Lenti RT. Dicho ensayo consiste en determinar:

1^{er} paso, la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdUTP) a un molde de poliadenina (PoliA) cuya reacción es catalizada por la adición de una transcriptasa reversa recombinante de VIH-1, así como una secuencia iniciadora(Figura.20).

2^{do} paso, la bromodesoxiuridina unida al molde es reconocida por un anticuerpo monoclonal conjugado a fosfatasa alcalina y la adición del paranitrofenilfosfato ocasiona que la fosfatasa realice su actividad hidrolítica obteniendo un cromóforo que absorbe a 405nm (Figura.20). Los extractos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO a 10% v/v) y probados a 50µg/ml. El método consiste en determinar la incorporación de bromo desoxiuridina (BRDUTP) a un molde de poliadenina (poli A) inmovilizado en microplacas de 96 pozos. La BRdUTP es reconocida posteriormente por un anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina.

3^{er} paso, la adición del reactivo paranitrofenilfosfato ocasiona que la fosfatasa alcalina hidroliza el grupo fosfato a paranitrofenil. Esta reacción es colorida y puede registrarse en un Lector de Elisa a 405 nm.



Shao, X., et al. 1997. *Antiviral Chemistry & Therapy* 8(2):149-159.

Figura 20. Función de la actividad de la transcriptasa reversa con cada uno reactivos del Kit lenti RT.

Para la evaluación de la actividad sobre la RT se realizaron 2 ensayos, las sustancias se probaron a una concentración de 250 μ l.

Para determinar las condiciones de temperatura bajo las cuales la actividad de la RT era favorable, se incubaron en un intervalo de 28°C a 33°C, el cual fue viable.

Las reacciones proceden lenta o rápidamente hasta alcanzar valores de absorbancia de 2.5 (nm) después de 4 horas de haber agregado el paranitrofenil fosfato. Por lo que se decidió que la temperatura óptima es de 33°C (Huerta, 2004).

Nota: Como control positivo se usó nevirapine, inhibidor de la RT bajo las mismas condiciones de molaridad.

8.2.7.1. Análisis Estadístico

Para cada uno de los 14 extractos, se utilizó la prueba de t para una media, tomando como la media de referencia a una absorbancia a 2 nm, el cual es igualado o rebasado esto indica que hubo una inhibición en los extractos.

El juego de hipótesis, quedó de la siguiente manera:

$$H_0: \mu_0 \geq 2.0 \text{ vs } H_a: \mu_0 < 2.0$$

H_0 : El extracto X sí inhibe la transcriptasa reversa del VIH tipo -1

H_a : El extracto X no inhibe la transcriptasa reversa del VIH tipo - 1

$$H_0 \text{ vs } H_a$$

Los cálculos que se hicieron fueron los siguientes:

$$\bar{X} = (1/n) \sum_{i=1}^n X_i$$

$\bar{X}$ = media muestral, n es el tamaño de la muestra y X_i : representa el i -ésimo de los valores observados.

La varianza $S^2 = [\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2/n]/(n-1)$ y su desviación estándar $S = \sqrt{S^2}$

Se definió:

$$t_0 = \frac{\sqrt{n} (\bar{X} - \mu_0)}{S}$$

Y se aplicó la siguiente regla de decisión: Rechazar H_0 si

$$t_0 \leq -t_{\alpha(n-1)}$$

En donde $t_{\alpha, n-1}$ es el valor de la variable T de Student tal que $P [T > t_{\alpha, n-1}] = \alpha$ y α es la variable de significancia.

Cabe señalar que para cada uno de los extractos se contó con 7 repeticiones, que sirvieron para calcular la media y la desviación estándar.

Después de haber preparado las placas se procedió a medir la capacidad inhibidora de los extractos sobre la transcriptasa reversa del virus de inmunodeficiencia adquirida del tipo-1 (RT-VIH-tipo-1) de lo anterior con ayuda de un lector especial y registrando datos a los tiempos 20min, 35min, 50min, 65min, 80min, 95min, 110min y 140min.

La prueba de t de Student al 1 % de significancia ya mencionada, se realizó solamente para los datos a los 140 minutos, y para los datos de los tiempos restantes se realizó una prueba de media y varianza para caracterizarlos.

Para el análisis estadístico se utilizaron programas computacionales: Excel y Origin. Se realizó una regresión lineal a los datos de la enzima RT-VIH-tipo-, ya que es la que no tiene extracto y si todos los demás reactivos está es el testigo que tuvo la mayor inhibición a partir de 2.0 nm, y también al extracto que tenga igual o mayor inhibición

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Trabajo de Gabinete

9.1.2. Distribución Geográfica

De los 4 herbarios visitados: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el Colegio de Posgraduados; se obtuvo más información de la planta en el herbario de la UNAM; se revisaron 250 ejemplares de los cuales 76 fueron seleccionados, ya que destacaban características importantes de la planta. En el Departamento de Agroforestales se encontraron 10 ejemplares útiles (Universidad Autónoma de Chapingo (UACH)). En el IPN se localizaron 32 ejemplares de los cuales sólo 20 fueron representativos en la información que contenían y 5 útiles. En el IMSS los ejemplares son donaciones del Dr. Ricardo Reyes quien es investigador en la UNAM. En el Colegio de posgraduados se encontraron 5 ejemplares.

Los datos de las colectas realizadas en Veracruz y Guerrero, se reportaron con 76 ejemplares de herbario; cuyos datos se ubicaron en mapas de la República Mexicana, de acuerdo a sus coordenadas (Figura 21), posteriormente, registrar la información de cada lugar para cada mapa siendo los resultados:

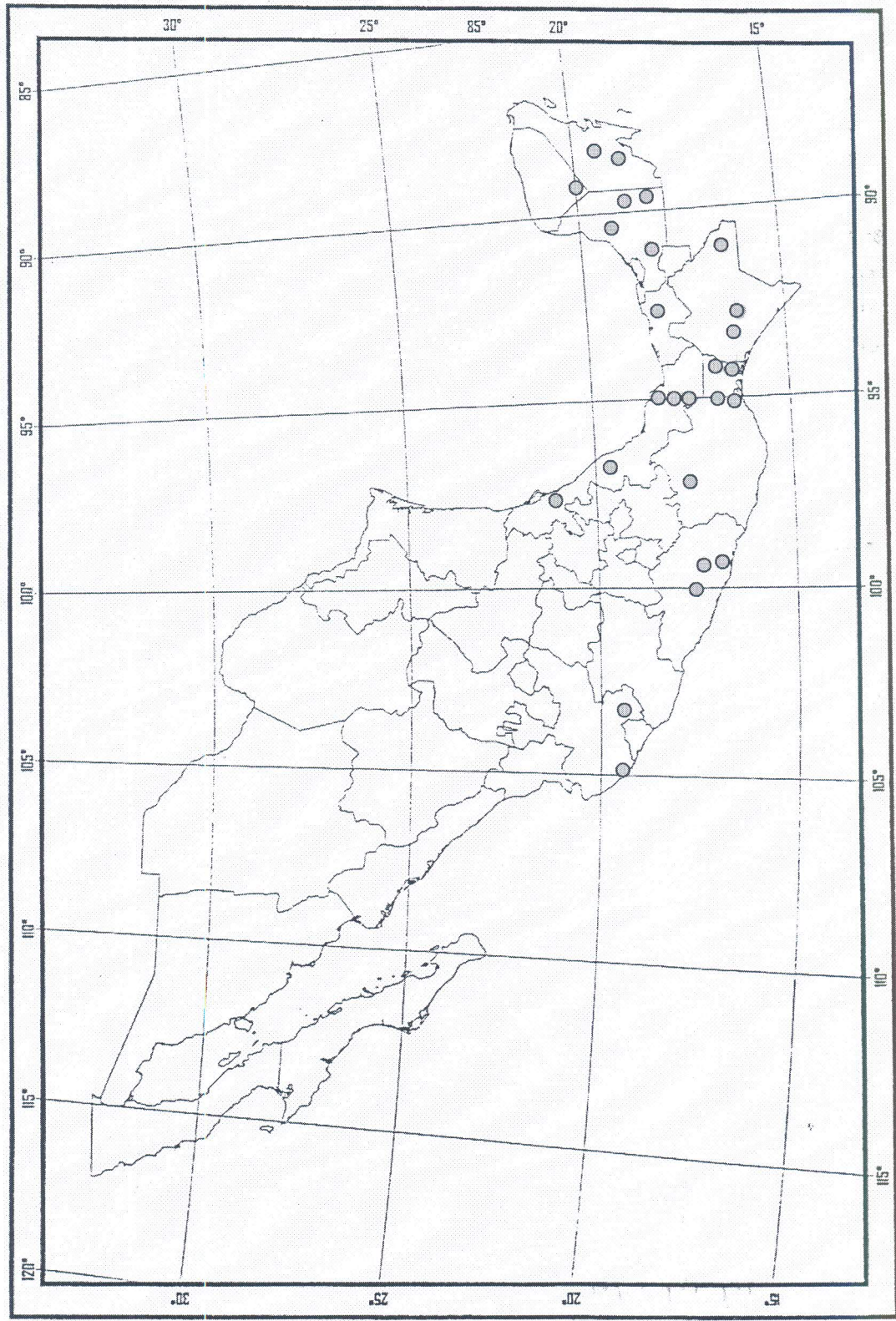


Figura 21. Distribución geográfica de *Calophyllum brasiliense* en México.

C. brasiliense se distribuye en altitudes que oscilan entre los 200-3000 m.s.n.m. siendo frecuente, el rango de los 200-1000 m.s.n.m (Cuadro 14 y Anexo 3). Los climas donde se desarrolla son: subhúmedo, semicálido o cálido, subhumedo, semicálido y húmedo semicálido, como se puede observar en (Cuadro 14 y Anexo 4), por lo que se puede decir que esta planta crece en zonas con mayor precipitación. Por otra parte, se observó que la planta se encuentra en una gran diversidad de rocas principalmente en sedimentarias (Cuadro 14 y Anexo 2), suelos vertisol, regosol, andosol, acrisol y nitosol (Cuadro 14 y Anexo 5) y con respecto a su vegetación predomina la selva alta así como en selva mediana y baja (Cuadro 14 y Anexo 6). Se encontró un mapa en internet (Modificado de Missouri Botanical Garden) página el cual fue creado con una base de datos ya reportados (**www.mobot.org**) en donde se tiene considerados Estados con estas características entre los que destacan: Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco y Veracruz. Con respecto a los grupos étnicos encontrados son diversos. La lengua que predomina es la Maya, Mixteco, y Yutatzeco-Cuitlatleco (Cuadro 14 y Anexo 7) al realizar la exploración etnobotánica se pudo observar que quedan pocas comunidades y con pocos grupos étnicos.



Figura 22. Distribución geográfica de *Calophyllum brasiliense* en Latinoamérica.

Los materiales obtenidos para este estudio fueron colectados en 2 localidades. Una de Veracruz, comunidad San Andrés Tuxtla, situada a una altitud de 2000 m.s.n.m., con clima húmedo semicálido, el tipo de roca que predomina es sedimentaria y el suelo es el acrisol, mitosol y reogol, su vegetación es selva alta perennifolia, la lengua Yutazteco-cuitlatleco.

En el Estado de Guerrero, comunidad El Paraíso, situada a una altitud de 1602 m.s.n.m., con clima subhúmedo semicálido, la rocas son sedimentarias y metámorficas, el tipo de suelo es regosol, su vegetación es selva baja caducifolia; lengua registrada es Macro-mixteco.

Cuadro 14. Factores ambientales y/o culturales de la distribución geográfica de *Calophyllum brasiliense*

Lugar	Estado	Altitud	Roca	Clima	Suelo	Vegetación	Lengua	Usos
Calakmul	Campeche	200-1000	Sedimentaria	Subhúmedo cálido	Vertisol Gleysol	Selva caducifolia	baja Maya	maderable
El tormento	Campeche	200-1000	Sedimentaria	Subhúmedo cálido	Vertisol Litosol	Selva alta	Maya	maderable
Carmen	Campeche	200-1000	Sedimentaria	Subhúmedo semicálido	Regosol	Selva alta	Maya	maderable
Champoton	Campeche	200-1000	Sedimentaria	Subhúmedo semicálido	Regosol	Selva alta	Maya	maderable
Pochucla	Chiapas	200-2000	Metamórficas	Subhúmedo cálido	Litosol Regosol	Bosque Mixto Matorral Espinoso con plantas carnosas	Mangue- Tlapaneco, y Zoque	maderable
La Chamarrá	Chiapas	200-2000	Metamórficas	Subhúmedo cálido	Litosol Regosol	Bosque Mixto Matorral Espinoso con plantas carnosas	Maya	maderable
Ocosingo	Chiapas	200-1000	Sedimentaria Metamórficas	Húmedo cálido	Acrisol nitosol	Selva alta	Maya	maderable
Chamela	Jalisco	200-1000	Sedimentaria	Subhúmedo calido	Regosol	Selva baja o mediana	Yutazteco- Cuicatleco	maderable
Zimapan	Jalisco	1000-2000	Ígnea extrusiva	Subhúmedo calido	Regosol	Selva caducifolia	baja Mangue- tlanapaneco	maderable
Acapulco	Guerrero	2000-3000	Ígneas Extrusivas	Subhúmedo semicálido	Andosol Litosol	Matorral Espinoso con plantas carnosas y pastizal	Macro- Mixteco	maderable

Chilpancingo	Guerrero	1000-2000	Sedimentaria	Subhúmedo semicálido	Regosol	Matorral Espinoso con plantas carnosas y pastizal	Macro-Mixteco	maderable
Atoyac de Alvarez	Guerrero	1000-2000	Metamórficas	Subhúmedo semicálido	Feozem Regosol	Selva Baja caducifolia	Macro-Mixteco	El latex, para las heridas infectadas maderable
Distrito de Juquila	Oaxaca	200-1000	Metamórfica	Semiárido semicálido	Litosol	Matorral Espinoso	Macro-Mixteco	maderable
San Carlos Yautepec	Oaxaca	200-2000	Sedimentaria	Húmedo cálido	Acrisol y nitosol	Matorral Espinoso	Zoque	maderable
Santa María Chimalapa	Oaxaca	200-2000	Metamórfica	Subhúmedo cálido	Feozeml	Selva Baja caducifolia	Macro-Mixteco	maderable
Oaxaca de Juárez	Oaxaca	200-3000	Sedimentaria	Húmedo cálido	cálido	Matorral espinoso y selva baja caducifolia	Zoque	maderable
Putla	Oaxaca	200-3000	Metamórfica	Subhúmedo cálido	Litosol	Selva Baja caducifolia	Yuzcateco	maderable
Felipe Carrillo	Quintana Roo	200-1000	Sedimentaria	Subhúmedo cálido	Vertisol	Selva alta	Maya	maderable
Benito Juárez	Quintana Roo	200-1000	Sedimentaria	Subhúmedo cálido	Litosol	Selva alta	Maya	maderable
Balacon	Tabasco	200-1000	Metamórficas	Subhúmedo cálido	Regosol	Selva Baja o mediana sabana	Yutatzeco y cuicatleco	fruto comestible
Villa hermosa	Tabasco	200-1000	Ígneas Extrusivas	Subhúmedo semicálido	Feozem	Selva Baja caducifolia	Mangue-Tlapaneco	maderable

Continúa.....

Montepío	Veracruz	2000-3000	Sedimentaria	Subhúmedo Cálido	Acrisol nitosol	y Selva mediana sabana	Yutazteco o Cuicatleco	maderable
Catemaco	Veracruz	2000-2000	Sedimentaria	Húmedo semicálido	Acrisol nitosol	y Selva Alta	Yutazteco- Cuicatleco	maderable
Chemax	Yucatán	200-1000	Sedimentaria	Suhúmedo semicálido	Regosol	Selva baja mediana sabana	Maya y	Ornamental

La distribución geográfica de *C. brasiliense* en la República Mexicana abarca los siguientes Estados: Campeche, Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Figura 21).

9.2. Exploración etnobotánica en Veracruz

9.2.1. Exploración etnobotánica de Catemaco, Veracruz

Del cuestionario realizado a la población del Municipio de Catemaco, Veracruz, que consistió principalmente en preguntarles si conocían la planta de *C. brasiliense*, se obtuvieron los siguientes resultados. Se observó que la mitad (52 %) conoce a la planta y la otra mitad (48%) no la conoce (Cuadro.15); se trata de una planta medicinal conocida prácticamente sólo por la gente de la comunidad, por lo que los otros pobladores de ese municipio conocen sólo algunos usos de la planta (madera de construcción). El nombre popular es “cedrillo”.

La población de 51-60 años reconocen la planta para la construcción de muebles.

Cuadro 15. Resultados de las entrevistas realizadas en Catemaco, Veracruz, el 4 de febrero del 2006.

Edad en años (personas entrevistadas)	Total de personas	No la conocen		La conocen de vista a <i>Calophyllum brasiliense</i>		Sabe algún uso medicinal, u otros usos (maderable)	
		No.	%	No.	%	No.	%
20-30	1	1	4	0	0	0	0
31-40	4	1	4	3	12	3	12
41-50	10	8	32	2	8	2	8
51-60	7	0	0	7	28	7	28
61-70	2	2	8	0	0	0	0
> 70	1	0	0	1	4	1	4
Total	25	12	48	13	52	13	52

9.2.2. Exploración etnobotánica en San Andrés Tuxtla, Veracruz

En los cuestionarios en San Andrés Tuxtla, comunidad la Laguna Escondida, está una comunidad reciente, ya que tiene menos de 30 años de establecida. La población es pequeña y joven, ésta colabora con los investigadores de la Reserva Ecológica de la UNAM. También se encontró que el 87 % de la población entrevistada conocen a la planta de vista con el nombre popular de “ocú” “cedrillo”, y el 12.5 % no la conoce (Cuadro 16).

La población de 20-30, así como de la 51-60 años sí conocieron la planta.

Cuadro 16. Resultados de las entrevistas realizadas en San Andrés Tuxtla, el 4 de febrero del 2006.

Edad en años (personas entrevistadas)	Total de personas	No la conocen		La conocen de vista a <i>Calophyllum brasiliense</i>		Sabe algún uso medicinal, u otros usos(maderable)	
		No.	%	No.	%	No.	%
20-30	7	2	12.5	5	31.3	5	31.3
31-40	2	0	0	2	12.5	2	12.5
41-50	1	0	0	1	6.3	1	6.3
51-60	5	0	0	5	31.3	5	31.3
61-70	0	0	0	0	0.0	0	0.0
> 70	1	0	0	1	6.3	1	6.3
Total	16	2	12.5	14	87.5	14	87.5

9.2.3. Exploración etnobotánica en Montepío, Veracruz

Del cuestionario aplicado en Montepío se encontró que el 60 % de la población entrevistada conocen a la planta de vista, sólo el 40 % no la conoce sus usos medicinales; sin embargo, conocen su uso maderable (Cuadro.17).

La población de 41-50 y de 61-70 años conoce la planta con el nombre popular de ocú y cedrillo.

Cuadro 17. Resultados de las entrevistas realizadas en Montepío Veracruz, el 4 de febrero del 2006.

Edad en años (personas entrevistadas)	Total de personas	No la conocen		La conocen de vista a <i>Calophyllum brasiliense</i>		Sabe algún uso medicinal, u otros usos	
		No.	%	No.	%	No.	%
20-30	2	2	13.3	1	6.67	1	6.67
31-40	3	0	0	3	20	3	20
41-50	4	0	0	3	20	3	20
51-60	1	0	0	1	6.67	1	6.67
61-70	4	4	26.7	0	0	0	0
> 70	1	0	0	1	6.67	1	6.67
Total	15	6	40	9	60	9	60

En esta población el Sr. Bernardo Mozo (Curandero de la población) conocido como el venado comentó saber del uso medicinal de *C. brasiliense* como desinflamatorio, para la colitis, reumatismo crónico, regular la menstruación. En cocción (la hoja hervida en agua por 10 minutos se consume como agua de uso) para el dolor de espalda y el herpes (se muelen las hojas y se colocan en alcohol, se aplica como cataplasma en la zona afectada), El curandero conoce a *C. brasiliense* como okú, palo maría. Comenta que el comenzó a aprender el oficio de curandero a partir de los 13 años, siendo discípulo de Dimas Santos, de él aprendió los usos de muchas de estas plantas como de *C. brasiliense*, Don Dimas tiene 80 años de edad y 60 años viviendo de este oficio que heredó de sus abuelos.

9.2.4. Exploración etnobotánica en el Municipio de Atoyac de Álvarez, Guerrero

El cuestionario aplicado a esta comunidad arrojó que el 60 % de la población entrevistada conocen la planta de vista y la edad en años es mayor de 70. El 40 % no la conoce. Su uso es conocido en la industria maderera, con el nombre común de palo maría (Cuadro 18).

Cuadro 18. Resultados de las entrevistas realizadas en Atoyac de Álvarez, el 18 de marzo del 2006.

Edad en años (personas entrevistadas)	Total de personas	No la conocen		La conocen de vista a <i>Calophyllum brasiliense</i>		Sabe algún uso medicinal, u otros usos (maderable)	
		No.	%	No.	%	No.	%
20-30	5	3	10	2	6.7	2	6.7
31-40	6	3	10	3	10	3	10
41-50	5	1	3.3	4	13.3	4	13.3
51-60	4	2	6.7	2	6.7	2	6.7
61-70	4	2	6.7	2	6.7	2	6.7
> 70	6	1	3.3	5	16.7	5	16.7
Total	30	12	40	18	60	18	60

9.2.5. Exploración etnobotánica en el Municipio del Paraíso, Guerrero

El cuestionario aplicado en la población del Paraíso arrojó que el 76% de la población la conoce, el 23.3 % no la conoce (Cuadro 19).

Entre 41-50 años es el intervalo de edad de la población que conoce a la planta. Su nombre común es palo maría. En esta comunidad la Sra. Margarita Castro, de 74 años de edad, tiene 40 años de ejercer el oficio de curandera. Los usos que recomienda son: como cocción (2 hojas en un litro agua hirviendo) para la inflamación del vientre aplicado como cataplasma regulariza la menstruación y como desinflamatorio; el oficio fue heredado de su abuelita.

El Sr. Eleazar Cisneros Corona (Curandero) de 70 años de edad recomienda un engüento para las reumas, dolores y desinflamante, como cicatrizante para el ombligo de los niños recién nacidos (el látex se coloca en la zona donde se desea cicatrizar y se unta). Este oficio fue aprendido de su abuelo y de sus padres; lo conocen como palo maría y cedrillo.

Cuadro 19. Resultados de las entrevistas realizadas en el Paraíso, el 19 de marzo del 2006.

Edad en años (personas entrevistadas)	Total de personas	No la conocen		La conocen de vista a <i>Calophyllum brasiliense</i>		Sabe algún uso medicinal, u otros usos (maderable)	
		No.	%	No.	%	No.	%
20-30	4	2	6.7	2	6.7	2	6.7
31-40	4	2	6.7	2	6.7	2	6.7
41-50	11	2	6.7	9	30	9	30
51-60	3	0	0	3	10	3	10
61-70	3	0	0	3	10	3	10
> 70	5	1	3.3	4	13.3	4	13.3
Total	30	7	23.3	23	76.7	23	76.7

Los 5 nombres populares registrados a través de la exploración etnobotánica en municipios de Guerrero y Veracruz son: “cedrillo”, “ocú”, “okú” y “palo maría”

Los usos reportados son los siguientes:

Desinflamatorio en la colitis, vientre, espalda y dolores, reumatismo crónico para regula la menstruación, el herpes, como cicatrizante y en la industria madera para la construcción.

El uso maderable es el más reportado (Echenique-Manrique, 1970; Pennington *et al.*, 1968; Barcenas *et al.*, 1980) y como medicinal desinflamatorio en el vientre (Soto, 1995) cicatrización del ombligo de los recién nacidos (García, 1992), los demás usos no están reportados, pero la presencia de cumarinas se explican los usos antes mencionados (Kuklinski, 2003).

En los Municipios en donde la gente conoce más a la planta es: en el Paraíso en Guerrero y Montepío, Veracruz

9.3. Análisis de suelo

De acuerdo con Vázquez (1997), el propósito del análisis químico del suelo es establecer el punto de fertilidad natural del mismo. Para ello es necesario tener información en relación a las determinaciones analíticas. El análisis químico del suelo refleja que tan fértil es; en que condiciones se encuentra y desde luego también da información para desarrollar un cultivo potencial en particular.

En el caso específico de las muestras de suelo recolectadas en San Andrés Tuxtla, Veracruz y El Paraíso, Guerrero, *Calophyllum brasiliense* crece en el suelo en el cual produce los principios activos (Calanólidos).

Cuadro 20. Los resultados del análisis son los siguientes en San Andrés Tuxtla, Veracruz:

pH	C.E.	Nt	MO	P	K	Ca	Mg	CIC
1:2	DMS ⁻¹	%	%	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	C mg kg ⁻¹
6.5	1.2	0.1	2.0	12	250	700	115	9.0
Lig. Ácido	No salino	Medio	Medio	Bajo	Rico	Pobre	Rico	Baja
Arena %		Limo %		Arcilla %		Clasificación		
18		45		37		Arcilla limosa		

El pH muestra un valor de 6.5 que corresponde a un suelo ligeramente ácido que conforme a la escala con la cual se establece un patrón de referencia (Johns y Word, 1984) en los valores corresponde a un pH ligeramente ácido, lo que permite que se desarrollen prácticamente la mayoría de los cultivos agrícolas sin ningún problema, los suelos con un potencial de cultivo agrícola generalmente se sitúan en el rango de 6.5-7 (Alarcón, 2000).

La determinación de la conductividad eléctrica (C.E.), de la muestra analizada arrojó un valor de 1.2 dSm^{-1} , que corresponde a un suelo no salino (Pérez, 2005), esto permite inferir que el suelo no tiene ninguna limitación en cuanto al contenido de sales por ello hace apto para el desarrollo de cualquier cultivo agrícola.

Para el Nitrógeno (N) total, se encontró que el valor del suelo analizado corresponde a 0.01%, lo que indica que este suelo se encuentra limitado en relación a su fertilidad natural, es decir, el elemento está carente en el suelo y se sugiere aplicaciones de fertilizantes químicos o abonos orgánicos (Pérez, 2005) de acuerdo con la propuesta de la agricultura orgánica, y considerando la proporción tan alta de pedregosidad la adición de composta alta en nitrógeno, en pocos años serían estos suelos aptos para el cultivo de *C. brasiliense*; verificando la eficacia farmacológica después de cada ciclo agrícola.

Respecto al Fósforo (P), del análisis químico se encontró una concentración de 12 ppm ($12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de suelo), que de acuerdo a la interpretación lo sitúa en un rango medio; arriba de 11 es alto. Por lo tanto, está en un rango adecuado.

El análisis de suelo presentó un valor de 250 ppm, de Potasio (K) conforme a la interpretación corresponde a un suelo muy rico, lo que significa que hay suficiente K para cubrir las necesidades de cualquier cultivo agrícola.

La materia orgánica (M.O.), presentó 2.0 % por lo tanto, se encuentra en la categoría de medianamente pobre. Se sugiere la aplicación de abonos orgánicos para aumentar el porcentaje de M.O. en el suelo.

En relación a los componentes de textura el análisis de suelo nos indicó que éste corresponde a un Arcilla limosa, lo que indica un suelo de textura franca.

El coeficiente de intercambio catiónico (C.I.C.), fue de 9.0 CmoLkg⁻¹ lo que indica una baja C.I.C., un suelo que tiene medianamente alta o muy alta C.I.C. oscila en un valor de 15 CmoLkg⁻¹ en adelante (Vázquez, 1997).

El calcio fue de 700 mg kg⁻¹ indicando un bajo rendimiento. Si bien los suelos ácidos tienen bajos contenidos de Ca.

De manera general, se puede señalar que el suelo en estudio cumple con los requisitos de un suelo agrícola, sólo sería recomendable elevar el contenido de nitrógeno y materia orgánica; un suelo bien fertilizado puede incrementar la concentración de principios activos y, que técnicamente se puede introducir en esta zona la *C. brasiliense* al cultivo.

Cuadro 21. Los resultados del análisis son los siguientes en el Paraíso, Guerrero:

pH	C.E.	Nt	MO	P	K	Ca	Mg	CIC
1:2	DMS ⁻¹	%	%	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	C mg kg ⁻¹
5.0	0.6	0.05	1.0	5	127	565	113	7.4
Muy Ácido	No salino	Pobre	Pobre	Bajo	Medio	Pobre	Rico	Baja
Arena %		Limo %		Arcilla %		Clasificación		
18		42		40		Arcilla limosa		

El pH arrojó un valor de 5.0 que corresponde a un suelo muy ácido que conforme a la escala se establece un patrón de referencia (Johns y Word, 1984) corresponde a un pH muy ácido por lo que es un poco difícil que se pueda cultivar ya que los suelos con un potencial de cultivo agrícola generalmente se sitúan en un rango de 6.5-7 y este no lo presenta por su pH (Alarcón, 2000).

La determinación de la conductividad eléctrica (C.E.), de la muestra analizada arrojó un valor de 0.6 dSm⁻¹, que corresponde a un suelo no salino (Pérez, 2005), esto permite inferir que el suelo

no tiene ninguna limitación en cuanto al contenido de sales y lo hace apto para el desarrollo de cualquier cultivo agrícola.

Para el Nitrógeno (N) total, se encontró que el valor del suelo analizado corresponde a 0.05%, lo que indica que este suelo es muy pobre en relación a su fertilidad natural, es decir, el elemento está carente en el suelo y se sugiere aplicaciones de fertilizantes químicos o abonos orgánicos como lo recomienda Pérez (2005); de acuerdo con la propuesta de la agricultura orgánica, y considerando la proporción tan alta de pedregosidad la adición de composta alta en nitrógeno, en pocos años serían estos suelos aptos para el cultivo de *C. brasiliense*; verificando la eficacia farmacológica después de cada ciclo agrícola.

Respecto al Fósforo (P), se encontró que el análisis químico se obtuvo una concentración de 5 ppm (5 mg·kg de suelo), que de acuerdo con los resultados se considera un rango bajo; esta por debajo del 11. Por lo tanto, este en un rango no adecuado.

El análisis de suelo presentó un valor de 127 ppm, de Potasio (K) conforme a los resultados corresponde a un suelo medio, lo que significa que hay medianamente K para cubrir algunas de las necesidades de un cultivo agrícola.

La materia orgánica (M.O.), presentó 1.0 % por lo tanto, se encuentra en la categoría pobre. Se sugiere la aplicación de abonos orgánicos para aumentar el porcentaje de M.O. en el suelo.

En relación a los componentes de textura el análisis de suelo correspondió a un Arcilla limosa, éste es apto para el desarrollo de cultivo agrícolas lo ideal sería tener un suelo de textura franca.

El coeficiente de intercambio catiónico (C.I.C.), fue de 7.4 CmoLkg^{-1} lo que indicó una baja C.I.C., un suelo que tiene medianamente alta o muy alta. La C.I.C. oscila en un valor de 15 CmoLkg^{-1} en adelante (Alarcón, 2000).

El calcio es de 565 mgkg^{-1} es un suelo muy pobre y Magnesio tiene 113 mgkg^{-1} , lo que significa que es un suelo muy rico en magnesio. El Ca, el Mg y el K compiten por sitios de absorción en las raíces.

De manera general, se puede señalar que el suelo en estudio no es favorable con los requisitos de un suelo agrícola típico, ya que es muy bajo en pH, muy pobre en materia orgánica, en fósforo,

Ca, intercambio catiónico, comparado con el anterior de Veracruz, se encuentren los metabolitos que tienen la actividad pero seguramente sean componentes minoritarios, en Veracruz que es donde sí se encuentran los calanólidos.

Es importante que cumpla con las características edáficas de Veracruz para tener un buen éxito farmacológico en el cultivo *C.brasiliense* cuando este se quiera introducir al cultivo.

9.4. Trabajo de laboratorio

9.4.1. Anatomía de los frutos de *C. brasiliense*

Un fruto es el ovario fecundado y maduro, acompañado o no de partes florales. La pared del ovario maduro se llama pericarpio este, se constituye por 3 tejidos: (figura 23) 1). El exocarpio es la capa más externa (piel, cáscara), 2) Mesocarpio que es la parte carnosa y 3) El endocarpio es la capa interna y generalmente contiene a las semillas. En botánica una baya es el tipo de común de fruta carnosa simple, en el cual la pared entera del ovario madura es el pericarpio comestible de *Calophyllum brasiliense* presenta un tipo de fruto característico a una baya de acuerdo con lo reportado por Corner en 1976 en *Calophyllum inophyllum* es un fruto de 4cm de ancho, el pericarpio es de color verde, tiene un endocarpo donde se encuentra en el tejido canales gumíferos y lignificados las células se encuentran aplastadas en la semilla, y la cubierta seminal llamada testa está rodeada de forma masiva que conecta a través de redes intercelulares entre sí, esto es algo característico del género de *Calophyllum*.

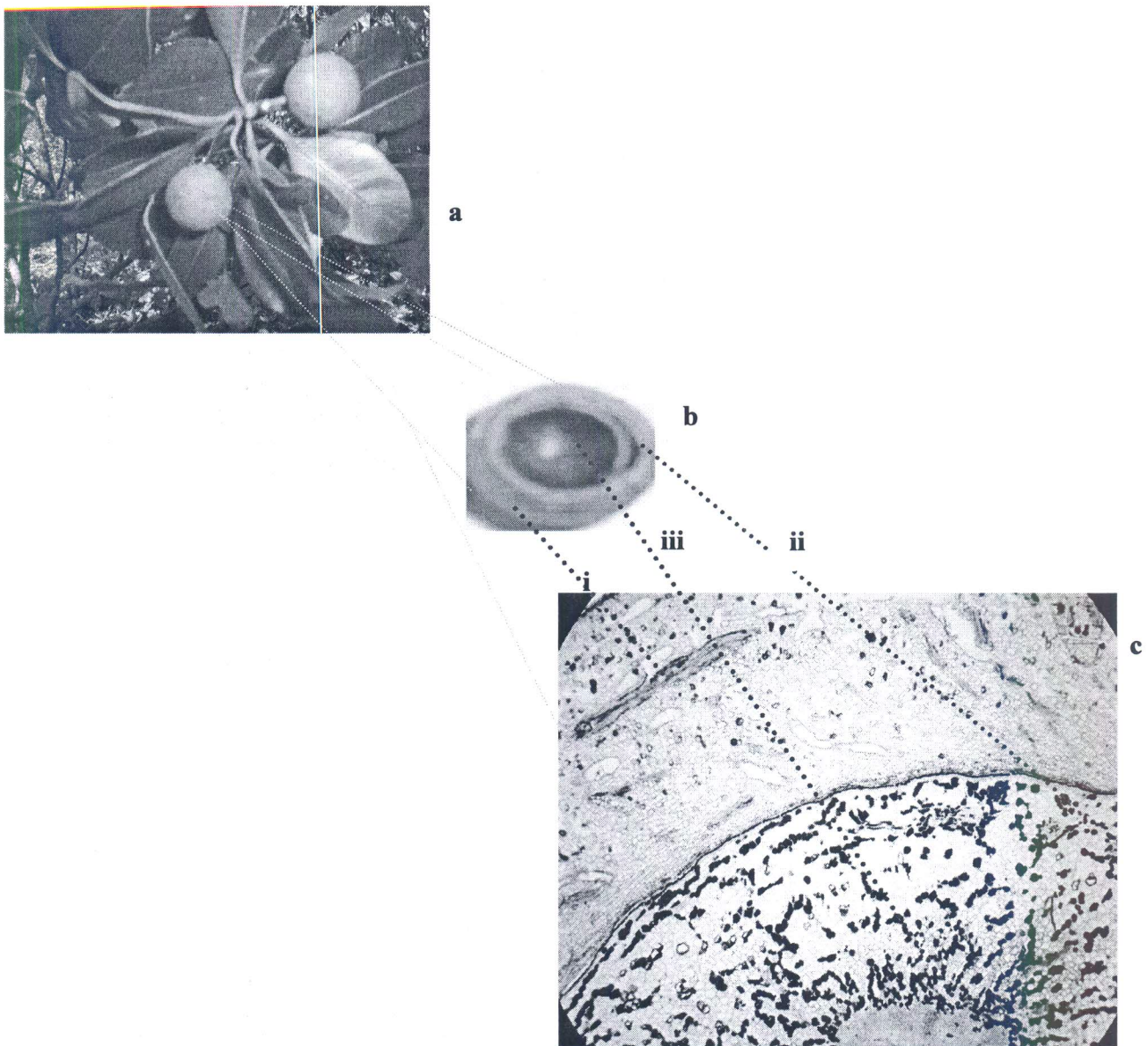


Figura 23. Fruto de *Calophyllum brasiliense*: a) Fruto b) pericarpio cortado transversalmente.

i) exocarpio de coloración café, ii) mesocarpio café claro iii) endocarpio café oscura

c) corte anatómico transversal del pericarpio con los 3 tejidos antes mencionados.

Se describió el pericarpio por medio de cortes anatómicos transversales:

El pericarpio tiene tejido fundamental (haces vasculares xilema y floema) donde se acumulan lípidos, y esta acumulación se acentúa más en el fruto que ha alcanzado su tamaño final y sobre todo durante el ablandamiento de la pulpa, en ésta nunca almacena almidón solo se encuentra en los cloroplastos del exocarpo (Figura 24, 25).

Exocarpo.- del fruto maduro es la parte que se desprende del fruto al pelarlo, está formado de:

- 1) La epidermis externa, la cual posee algunos tricomas y numerosos estomas. La epidermis siempre divide anticlinalmente y está cubierta por una cutícula gruesa (10-17 μ m), se encuentran canales resiníferos.
- 2) Tejido subepidérmico.- de 6-8 estratos de células pequeñas, alargadas tangencialmente, con pocos taninos y numerosos cloroplastos. En esta capa subepidérmica encontramos braquiesclereidas aisladas o en grupos.

Mesocarpo.- Constituye la pulpa del fruto. Esta pulpa está formada por el parénquima localizado entre el exocarpo y el endocarpo.

Se caracteriza por la presencia de células grandes, paredes delgadas, espacios intercelulares y numerosas glándulas de aceite, de origen lisígeno, encontramos pequeños cristales llamados drusas (compuestos de oxalacetato) (Figura 25).

Endocarpo.- es una estructura fibrosa y dura que cubre la semilla. Ésta proviene de 3 regiones de la pared del ovario:

- 1) Epidemis pluriestratificada, 2) Tejido fundamental (xilema y floema)(Figura 25) se encuentra debajo de la epidermis y 3) Red de tejido vascular que rodea al eje del fruto.

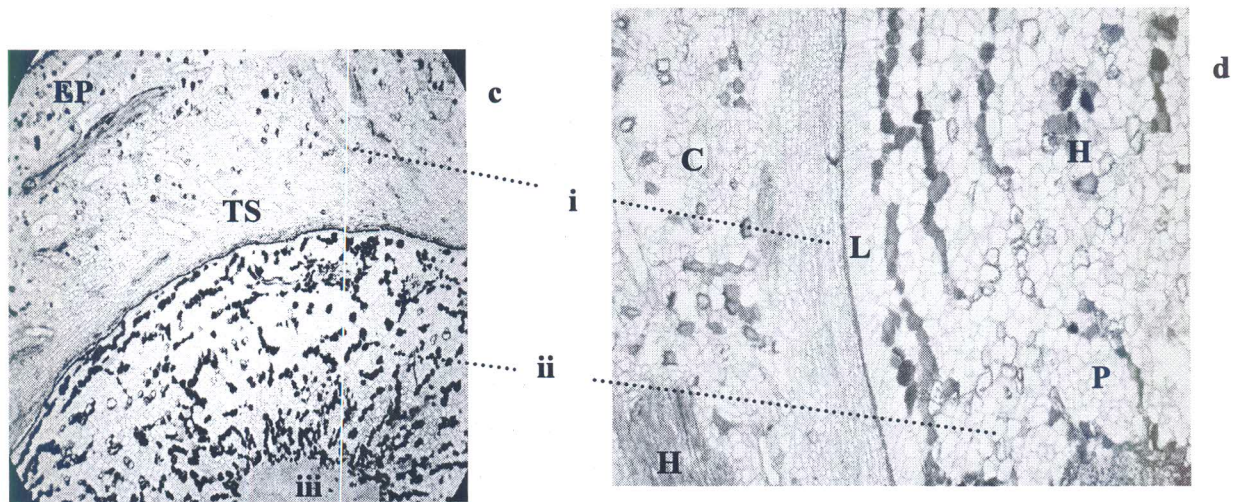


Figura 24. Cortes anatómicos transversales del pericarpio de *Calophyllum brasiliense*: c) EP.-Epidermis externa, TS.- Tejido Supdermico y d i) exocarpio, ii) mesocarpio y iii) endocarpio(exepto b, no se observa). En d) C.-Canales resiníferos, L.-lignificación, H-haces vasculares, P.-parenquima

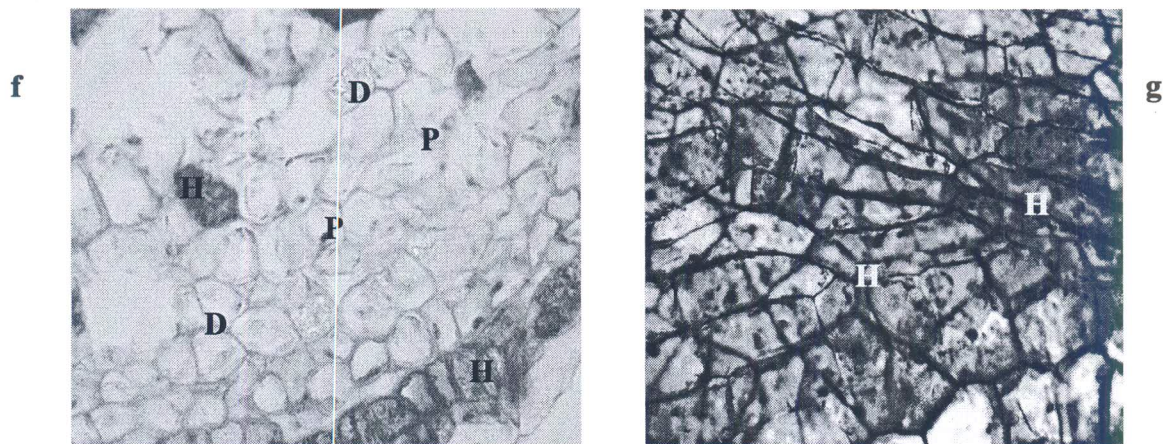


Figura 25. Cortes anatómicos transversales del pericarpio de *Calophyllum brasiliense*: f) mesocarpio: P parenquima y D Drusas y g) H.- Haces vasculares xilema y floema los cuales se encuentran en los 3 tejidos.

El estudio anatómico de los frutos de ambas localidades no muestran diferencia a pesar de que crecen en suelos y climas diferentes, lo que podría explicar también una similitud con la composición química.

9.4.2. Estudio Fitoquímico y Biológico

Se empleó material botánico de *Calophyllum brasiliense* donado para el presente trabajo, colectados en 2 localidades diferentes (Cuadro 21):

1.- Laguna Escondida. Los Tuxtlas, Municipio San Andrés Tuxtla, Veracruz, el 28 de agosto de 2003, se obtuvieron frutos maduros.

2.- El Molote en el municipio de Atoyac de Álvarez, Guerrero, el 10 de octubre del 2004. Colecta de los biólogos J. Rojas y E. Santiago de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Se obtuvieron hojas y frutos inmaduros muy pequeños.

9.4.2.1. Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos (en peso seco de hojas y frutos), obtenidos con hexano, acetona y metanol que se muestran en el siguiente cuadro. El extracto que mostró mayor rendimiento fue de el hexano en hojas (10.77%), sabiendo que se pesaron 430.93 gramos, el cual fue mucho mayor que con respecto a los demás, después del extracto hexánico del pericarpio (3.05%) y de acetona (1.19%) del pericarpio, semilla extracto hexánico (1.95%), así sucesivamente los demás, el que tubo menor rendimiento fue el extracto metanólico en hojas (0.63%) (Cuadro 21).

Cuadro 22 de Rendimiento de los extractos de *Calophyllum brasiliense*

Parte usada de la planta/u otro	Lugar de colecta	Extracto	Clave	gramos Biomasa	rendimiento %
semilla	Veracruz/San Andrés Tuxtlas	hexánico	sth1	33.87g	1.95%
pericarpio(exocarpio y endocarpio)	Veracruz/San Andrés Tuxtlas	hexánico	ct2h	56.48g	3.05%
hojas	Guerrero/Atoyac de Álvarez	hexánico	hg3h	430.93 g	10.77%
hojas	Veracruz/San Andrés Tuxtlas	acetona	st5a	33.87g	0.41%
semilla	Veracruz/San Andrés Tuxtlas	acetona	ct6a	56.48g	0.95%
pericarpio(exocarpio y endocarpio)	Guerrero/Atoyac de Álvarez	acetona	hg7a	430.93 g	1.19%
semilla	Veracruz/San Andrés Tuxtlas	metanol	stm9	33.87g	0.98%
pericarpio(exocarpio y endocarpio)	Veracruz/San Andrés Tuxtlas	metanol	ct10m	56.48g	0.66%
hojas	Guerrero/Atoyac de Álvarez	metanol	hg11m	430.93 g	0.63%

9.4.2.2. Análisis por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

9.4.2.2.1. Colecta de Guerrero: Hojas

Del extracto hexánico de hojas Guerrero en ccf (cromatografía en capa fina) usando como revelador sulfato cérico y con UV onda larga (365 nm) se observó (Figura 26, Cuadro 22) un patrón cromatográfico (0.23) similar al del quimiotipo 2 (Calánolidos (0.23)), pero se apreciaron algunas manchas de mayor polaridad que no se presentan en el quimiotipo 2. Las hojas del ejemplar de Guerrero presentan ácido apetalico (0.38) o bien una cromanona similar en su estructura a este compuesto. Si se observa con respecto al quimiotipo 1 (0.71) el frente de referencia no es el mismo que presentó el extracto hexánico hojas Guerrero.

9.4.2.2.2. Colecta de los Tuxtlas: Semilla y Pericarpio

Después de analizarlas dichas muestras por ccf usando como revelador sulfato cérico se observó (tabla y cronograma) que las muestras 4 (Semilla Los Tuxtlas (0.65)) y 6 (pericarpio Los Tuxtla (0.22)) son similares en su patrón cromatográfico al estándar del quimiotipo 2(0.23) de las hojas. Esto significa que los frutos de *C. brasiliense* de los Tuxtlas, en especial pericarpio, contiene Calanólidos (0.23) por presentar casi el mismo frente de referencia, y también presente ácido apetalico(0.38), se observa una segunda mancha. En la semilla de acuerdo a su frente de referencia tendrá algunos otros compuestos como fridelina (0.40) y aceites (Figura 26, Cuadro 22).

Los demás compuestos testigos (M-59,50a, sum-46) que se utilizaron para las cromatografías, no coinciden con el frente de referencia de los extracto hexánico Guerrero, semilla y pericarpio San Andrés tuxtla, Veracruz (Figura 26, Cuadro 22).

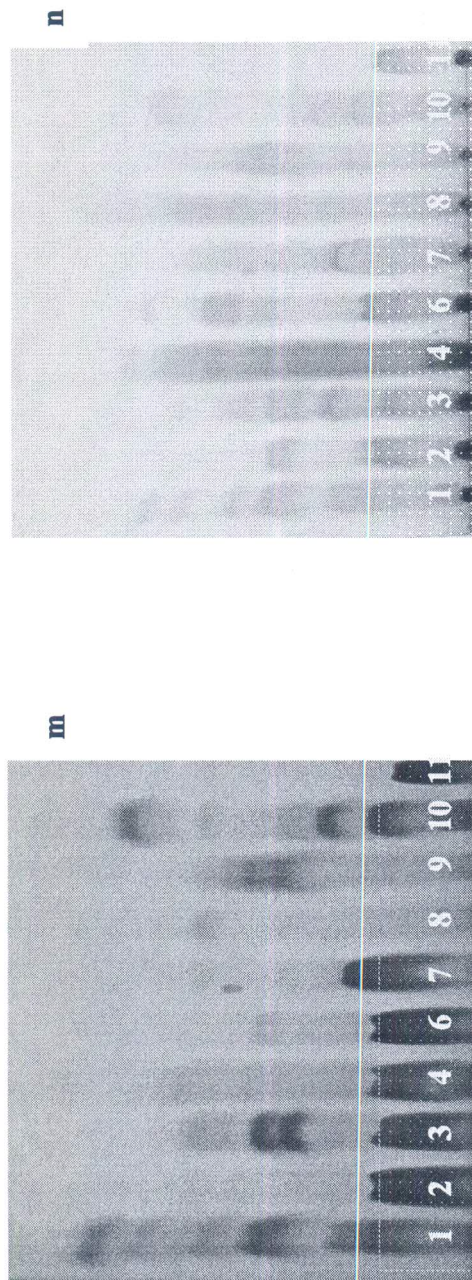


Figura 26. Placa cromatografía de capa fina observadas: m) bajo luz UV en onda larga (365 nm), y n) sulfato cérico. Extractos de hexano de muestras de *Calophyllum brasiliense*. (Cada uno de los carriles se encuentran en la tabla)

Cuadro 23 Cronogramas con los frentes de referencia de los extractos de *Calophyllum brasiliense*

	Parte usada de la planta	Lugar de colecta	Extracto	Tipo de muestra	Posible quimiotipo/comp	Rf/Silica	Referencias
1	hojas	Veracruz/Santa Martha	hexano	Qt1	Qt1	0.71	Estrada-Muñiz, E, 2001
2	hojas	Veracruz/San Andrés Tuxtla	hexano	Qt2	Qt2(Calanólido)	0.23	Huerta-Reyes, M, 2004
3	hojas	Guerrero/Atoyac Álvarez	hexánico	hg3h	Qt2	0.23	González-Paredes, M, 2006
4	semilla	Veracruz/San Andrés Tuxtla	hexánico	sth1	Qt2	0.65	González-Paredes, M, 2006
6	pericarpio	Veracruz/San Andrés Tuxtla	hexánico	ct2h	Qt2	0.22	González-Paredes, M, 2006
7	hojas	Veracruz/Santa Martha	hexano	M-59P	Qt1/ mammea B/BA ciclo F	0.28	Estrada-Muñiz, E, 2001
8	hojas	Veracruz/San Andrés Tuxtla	hexano	Fr	Qt2/Friedelina	0.77	Huerta-Reyes, M, 2004
9	hojas	Veracruz/San Andrés Tuxtla	hexano	50a	Qt2/Canofilol	0.41	Huerta-Reyes, M, 2004
10	hojas	Veracruz/Santa Martha	hexano	sum-46	Qt1/ mammea A/BA	0.58	Estrada-Muñiz, E, 2001
11	hojas	Veracruz/San Andrés Tuxtla	hexano	5a	Qt2/Apétalico	0.38	Huerta-Reyes, M, 2004

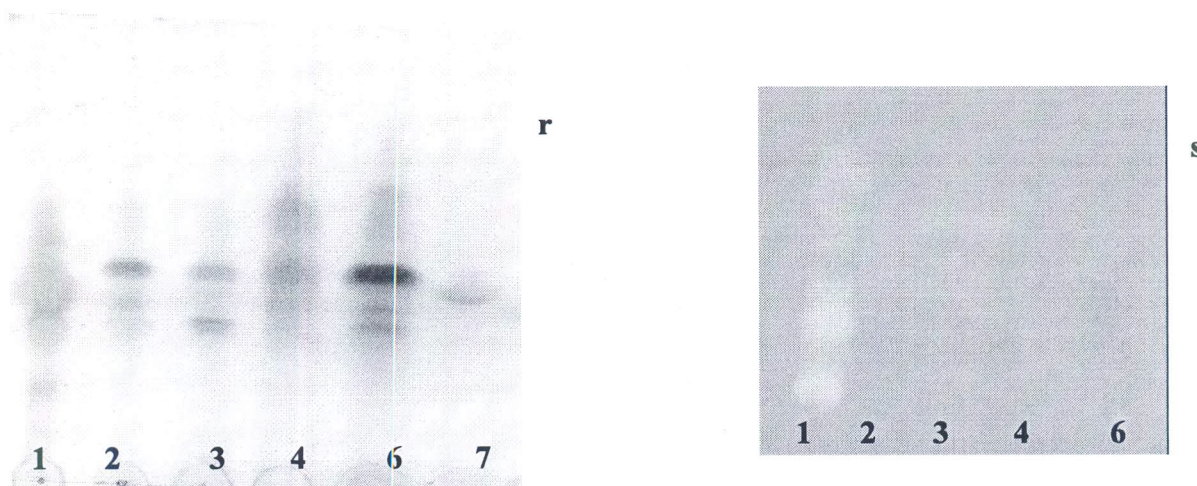


Figura 27. Placa cromatografías en: r) fase reversa revelada con Sulfato Cérico y s) Luz UV onda larga (365 nm). Extractos de hexano de muestras de *Calophyllum brasiliense*.

9.2.3. Análisis Espectroscópico

9.2.3.1. Infrarrojo (IR)

Se compararon los espectros de IR de los extractos de hexano de las hojas del Quimiotipo 1, 2 y de la colecta de Guerrero, para detectar diferencias en sus grupos funcionales. En términos generales los espectros fueron similares. Las tres muestras presentan bandas en las regiones de grupos carbonilo ($1700-1740\text{ cm}^{-1}$) y $\text{C}=\text{C}$ (ca. 1600 cm^{-1}). Por otra parte, también se apreció que las principales diferencias se encuentran en la zona de los grupos hidroxilo ($3100-3600\text{ cm}^{-1}$). El Quimiotipo 1 parece tener un mayor grado de hidroxilación que el quimiotipo 2 y el material de Guerrero (Anexo 10).

9.2.3.2. Resonancia Magnética de Nuclear de Protones (RMNP)

Para corroborar la presencia de cromanonas, por ejemplo del ácido apetalico, en la muestra de las hojas de la colecta de Guerrero. Parte del extracto hexánico se sometió a ccfc preparativa. Se obtuvieron las dos manchas de mayor polaridad y se analizaron por RMNPN.

El espectro de la fracción 1 (HG-1) mostró señales dobles características de los protones H-6 en 5.46 ppm ($J = 10\text{ Hz}$) y 6.54 ppm ($J = 10\text{ Hz}$) típicos del anillo dimetilpirano de las cromanonas como el ácido apetalico e isopetalico.

9.2.3.3 *Colecta de Guerrero: Hojas*

Del extracto hexánico al disolverlo con hexano y acetato de etilo caliente, precipitaron unos polvos verdes claro, se trató de volver a cristalizar con hexano y acetato de etilo caliente, se obtuvieron unos polvos blancos, los cuales por medio de los análisis espectroscópicos por el tipo de bandas, tanto en RMN e IR y constante física (283°C), así como por cromatografía en capa fina (identifico $R_f(0.72)$), se dilucidó que se trataba un triterpeno 3β -Hidroxi-7-oxofriedelina (Anexo 8 y 9).

9.3. Evaluación biológica

La parte más importante del presente proyecto fue la evaluación biológica de los extractos de los frutos, Veracruz y hojas, Guerrero fueron evaluados sobre TR-VIH-1 de los cuales presentaron mayor inhibición sobre TR-VIH-1 el extracto hexánico (Figura 28 y Cuadro 24) del pericarpio hasta de un 100%, las hojas Guerrero extracto hexánico fue de un 76.8% (Figura 28. inhibición en la RT).

Los extractos acetona: semilla, pericarpio, Veracruz y hojas Guerrero sus porcentajes están entre 11 y 16.8%, de los extractos de metanol: la semilla, el pericarpio y extracto de hojas Guerrero se observa una no inhibición sobre TR-VIH-1 (Figura 29 y Cuadro 24).

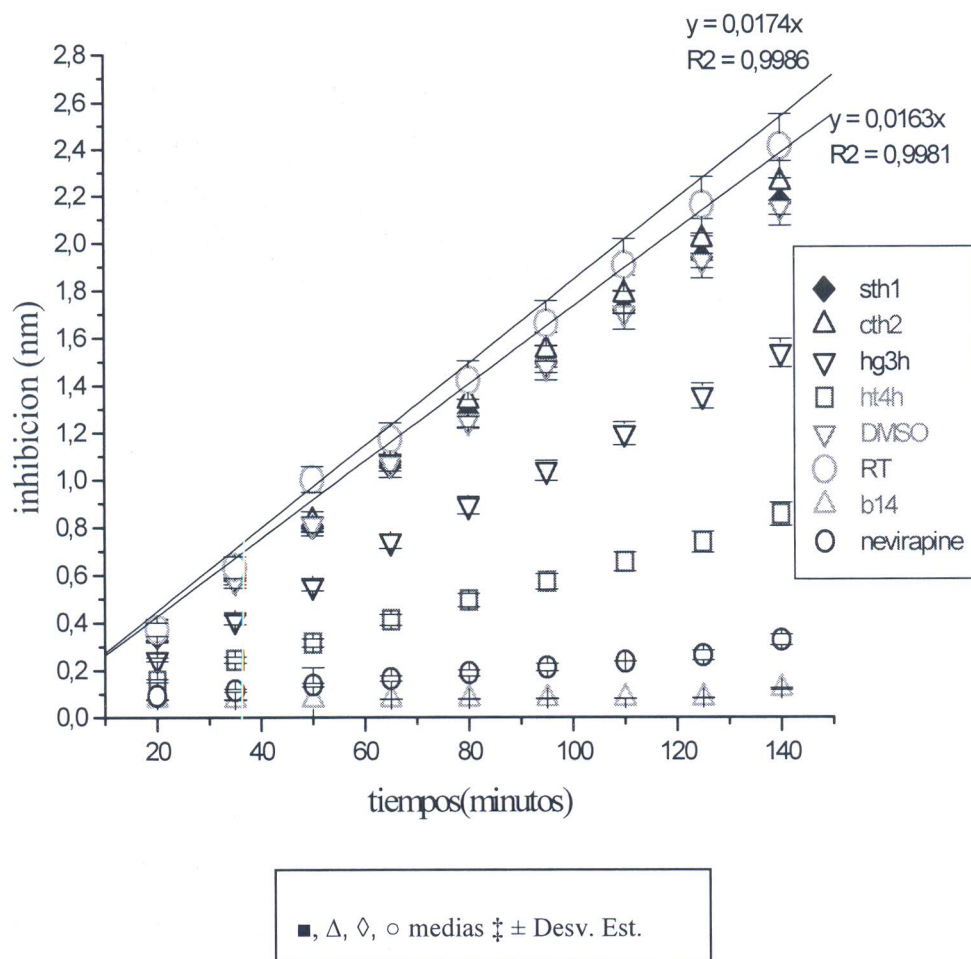


Figura 28. Gráfica de los extractos que tuvieron inhibición de la transcriptasa reversa

Sth1(semilla extracto hexánico colecta Veracruz muestra 1) cth2 (pericarpio extracto hexánico colecta tuxtla Veracruz muestra 2), hg3h (hojas extracto hexánico colecta Guerrero muestra 3, ht4h (hojas extracto hexánico colecta Veracruz muestra 3 testigo (Quimiotipo 2)), DMSO (dimetilsulfóxido testigo (con lo que se disolvieron las muestras)), RT(Transcriptasa Reversa testigo (Enzima sin extractos y con todos los reactivos)), b14 (testigo(muestra sin enzima y con todos los reactivos), nevirapine (testigo medicamento inhibidor de la transcriptasa reversa del virus de inmunodeficiencia tipo 1).

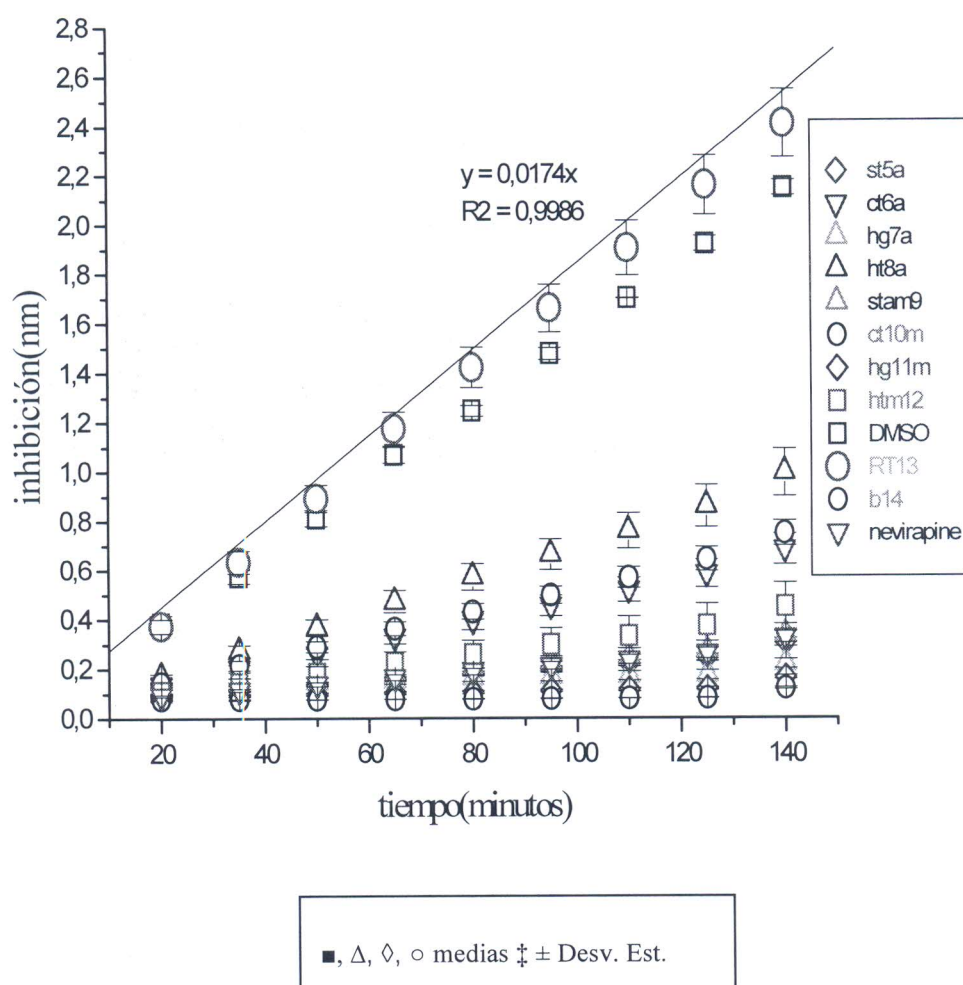


Figura 29. Gráfica de los extractos que no tuvieron inhibición de la transcriptasa reversa

St5a (semilla extracto de acetona colecta Veracruz muestra 5), ct6a (pericarpio extracto de acetona colecta tuxtla Veracruz muestra 6), hg7a (hojas extracto de acetona colecta Guerrero muestra 7, ht8a (hojas de acetona colecta Veracruz muestra 8 testigo), Star9 (semilla extracto de metanol colecta Veracruz muestra 9), ct10m (pericarpio extracto de metanol colecta tuxtla Veracruz muestra 10), hg11m (hojas extracto de metanol colecta Guerrero muestra 11, htm12 (hojas de metanol colecta Veracruz muestra 8 testigo), DMSO(dimetilsulfóxido testigo(con lo que se disolvieron las muestras)), RT13 (Transcriptasa Reversa testigo (Enzima sin extractos y con todos los reactivos)), b14(testigo (muestra sin enzima y con todos los reactivos), nevirapine (testigo medicamento inhibidor de la transcriptasa reversa del virus de inmunodeficiencia tipo 1).

Cuadro 24. Extractos de *Calophyllum brasiliense* En este caso en sus $t_{calculadas}$ se rechaza H_0 ya que sólo en 2 muestras de extracto hexánico que son la semilla y el pericarpio resultaron con inhibición y no se rechaza la hipótesis alternativa ya que el resto no tuvieron inhibición con un nivel de significancia del 1 %.

Parte usada de la planta/u otro	Lugar de colecta	Extracto	Clave	Media/ D.S.± (nm)	t calculada	t tablas	Se/No rechaza H_0
semilla	Veracruz	hexánico	sth1	2.174 ± 0.100	4.613	- 3.142	NS
pericarpio(exocarpio y endocarpio)	Veracruz	hexánico	ct2h	2.255 ± 0.092	7.335	- 3.142	NS
hojas	Guerrero	hexánico	hg3h	1.536 ± 0.059	-20.883	- 3.142	S
hojas	Veracruz	hexánico	ht4h	0.856 ± 0.049	-62.002	- 3.142	S
semilla	Veracruz	acetona	st5a	0.306 ± 0.016	-282.106	-3.142	S
pericarpio(exocarpio y endocarpio)	Veracruz	acetona	ct6a	0.686 ± 0.063	-54.912	- 3.142	S
hojas	Guerrero	acetona	hg7a	0,22 ± 0,019	-249.436	- 3.142	S
hojas	Veracruz	acetona	ht8a	0.998 ± 0.096	-27.737	- 3.142	S
semilla	Veracruz	metanol	stm9	0.336 ± 0.046	-96.227	-3.142	S
pericarpio(exocarpio y endocarpio)	Veracruz	metanol	ct10m	0.751 ± 0.051	-64.236	- 3.142	S
hojas	Guerrero	metanol	hg11m	0.166 ± 0.007	-660.918	- 3.142	S
hojas	Veracruz	metanol	hg12m	0.451 ± 0,098	-41.629	- 3.142	S
DMSO	testigo	testigo	DMSO12	2,149 ± 0.031	12.556	- 3.142	S
RT	testigo	testigo	RT13	2.411 ± 0.138	7.907	- 3.142	S
No RT	testigo	testigo	b14	0.121 ± 0.004	-1050.392	- 3.142	S
nevirapina	testigo	testigo	nevirapina	0.328 ± 0.023	-189.275	-3.142	S

NS = No se rechaza S= Se rechaza

Podemos concluir que en los extractos acetona y metanol hay una menor inhibición en la RT-VIH-1. De acuerdo con lo reportado por Huerta-Reyes (2004) se tiene que en los extractos que al menos en uno es donde tienen mayor actividad de inhibición es en el extracto hexánico, y que podríamos decir que probablemente pueden ser mejores medicamentos de origen natural, que un medicamento sintético de mayor costo (López V. E y Tapia T. E. 2005).

10. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos se concluye lo siguiente.

1. *Calophyllum brasiliense* se distribuye en 9 Estados de la República Mexicana, los cuales se presentan en orden decreciente: Oaxaca, Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz, Yucatán, en altitudes que oscilan entre 200-3000 m.s.n.m; los climas donde prospera son: húmedo, subhúmedo, semicálido crece en una gran diversidad de rocas, suelos, vegetación y coinciden con varios grupos étnicos.
2. En los Estados de Guerrero y Veracruz, *C. brasiliense* crece de manera silvestre y abundante en la localidad de San Andrés Tuxtla y menos en Atoyac de Álvarez, Guerrero; lo conocen como “palo maría, cedrillo, ocú”, en Atoyac de Álvarez, los curanderos lo utilizan para curar el reumatismo, como ungüento, y cataplasma, para la bronquitis, cicatrización del ombligo de los recién nacido, también de heridas y desinflamación de golpes.
3. En la anatomía de los frutos se compararon las dos localidades siendo similares en la estructura del pericarpio, la epidermis y el mesocarpo.
4. Los extractos de hojas colectadas en Guerrero fueron comparados con el quimiotipo 1 y 2; de acuerdo con los análisis de los espectros de infrarrojo, se concluye que los espectros son similares. Por otra parte, también se apreció que las diferencias se encuentran en la zona de los grupos hidroxilo (OH). El quimiotipo 1 tiene un mayor grado de hidroxilación que el quimiotipo 2 y del material de Guerrero se obtuvo puro un triterpeno, se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas siendo un 3 β -Hidroxi-7-oxofriedelina.
5. Los extractos hexánicos de frutos (semilla y pericarpio) Veracruz tuvieron una actividad de 100% en la inhibición en la Transcriptasa Reversa del Virus de Inmunodeficiencia tipo 1. Con el extracto hexánico de hojas Guerrero se observó una inhibición del 76.8%.

11. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

- Colectar material vegetal suficiente de los frutos de Guerrero y Veracruz para caracterizar los metabolitos presentes de *C. brasiliense*.
- Ampliar la exploración etnobotánica a otros Estados de la República Mexicana donde se distribuye *C. brasiliense* para conocer nombres y usos populares.
- Realizar un análisis físico-químico de suelo de los demás Estados donde se distribuye *C. brasiliense*, con la finalidad de comparar con el suelo patrón de Veracruz en San Andrés Tuxtla.
- Se recomienda introducir el cultivo de *C. brasiliense*, propiciando un desarrollo en Veracruz y Guerrero por que puede representar una alternativa rentable como planta medicinal.

12. PERSPECTIVAS

Con los resultados de la evaluación biológica se puede planear un siguiente estudio que sería la Fase II, con pacientes voluntarios que tengan el Virus tipo 1.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Abe F. Nagafuji S., Okabe H., Akahane H., Estrada-Muñiz E., Huerta-Reyes M., Reyes Chilpa R. 2004. Trypanocidal constituents in plants. 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 147-143.
- Al-Jeboury F. S. y Locksley H. D. 1971. Xanthones in the heartwood of *Calophyllum inophyllum*: a geographical survey. *Phytochemistry*. 10:603-606.
- Ampofo S. A. and Waterman R.G. 1986. Xanthones and neofla-vanoids from two. Asian species of *Calophyllum*. *Phytochemistry*. 25(11): 2611-2620.
- Arnold E., Jacobo- Molina A., Nanni R.G., Williams R.L., Lu X., Ding J., Clark A. D. Jr. Zhang A., Ferris A. L., Clark P., Hizi A., Hughes S. H. 1992. Structure of HIV-1 reverse/transcriptase/ DNA complex at 7 Å resolution showing active site locations. *Nature* 357, 85-89.
- Bárcenas-Pazos G., Rejón R. R., Echenique-Manrique R. 1980. *La Madera y su uso en la construcción*. Xalapa Veracruz. Inst. Nac. De Invest. Sobre Recursos. Bioticos. Pp 20.
- Bennett G. y Lee H. H. 1989. Xanthones from Guttiferae. *Phytochemistry*. 28(4):967-998.
- Coffin, J. M. 1995. HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267, 483-489.
- Corner, E. J. H., 1976, Clusiaceae, pp. 97-103 (1st vol.), pp. 92-111 (2nd vol.). In: E. J. H. Corner, *The seeds of dicotyledons*. University Press, Cambridge.
- Cos P., Maes L., Berghe D.V., Hermans N., Pieters L. Vlietinck A. 2004. Plant substances as anti- HIV agents selected according to their putative mechanism of action. *J. Nat. Prod.* 67, 284-293.

- Cottiglia F., Dhanapal B., Sticher O., Heilmann J. 2004. New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. *J. N. Prod.* 67, 537-541.
- Creagh T., Ruckle J. L., Tolbert D.T., Giltner J., Eiznhamer D. A., Dutta B., Flavin M.T., Xu Z. Q. 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.
- _____, Xu Z. Q. Ray L. Giltner J., Nayer T. and Ruckle J. 1998. 5th Conf Retrovir Oppor Infect. p.202 (abstract no 652) Feb 1-5.
- daSilva K. I., dos Santos A. R., Mantos P. E., Yunes R. A., Delle-Monache F., Cechinel-Filho V. 2001. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Therapie* 56, 431-434.
- De Clercq E., 1993. Anti- HIV agents interfering with the inicial stages of HIV replicate cycle. En: Morrow W. J. W. Y Haigwood N. L. (Eds). HIV. Molecular Organization, Pathogenecity and Treatment. Elsevier. The Netherlands. 386 pp.
- Echenique-Manrique R. 1970. *Descripción, características y usos de 25 maderas tropicales mexicanas*. México. Camara Nacional de la Industria de la Construcción.
- Estrada, L. E. 1985. Jardín botánico de plantas medicinales “Maximino Martínez”. Universidad Autónoma Chapingo. México. 41 p.
- _____ 1999. Medicina Chamanica. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 14-19 pp.
- _____ 2001. Control de calidad de las plantas medicinales como materias primas para la elaboración de medicamentos herbolarios estandarizados. Memorias IV Congreso Iberoamericano de Medicina Natural. Sociedad Latinoamericana de Medicina Natural y Tradicional. México. 255-259 pp.

- Estrada-Muñiz E. 2001. Cumarinas y xantonas de *Calophyllum brasiliense*. Evaluación de su actividad antiviral, citotóxica y antibacteriana. Tesis de Maestría en Ciencias biológicas (Biología Experimental). Facultad de Ciencias, UNAM. México DF., 8-20 pp.
- Evans L. A., Levy J. A. 1993. The heterogeneity and pathogenicity of HIV. En: Morrow W.J.W. y Haigwood N. L. (Eds). HIV. Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment. 1993. Elsevier. The Netherlands. 386 pp.
- Flint S. J., Enquist L.W., Krug R. M., Racaniello V. R., Skalka A. M. 2000. ASM Press. Washigton, U. S. A. 804 pp.
- Freed E. O., Martin M. A. Bis and Their Replication. En: Knipe D. M., Howley P. M. Fields Virology. 2001. Vol 2. 4ta Ed. Lippincott Wiliams & Wilkins Philadelphia, PA, U.S.A, 1971-2041.
- Fawcett, M. D. 1995. Histología, 12ed. Ed. Mc. Graw-Hill Interamericana.
- Fuller R.W., Westergaard C. K., Collins J. M., Cardellina J. H. II, Boyd M. R. Guttiferone F, the firts prenylated benzophenone from Allanblekia sthulmanii. J. Nat. Prod. 62, 130-132 (1999).
- García B. H. 1992. Flora Medicinal de colombia. Botánica Médica. Tomo II Bogota, Colombia. Tercer Mundo Editores.
- Gros E. G. Pomilio, A. B., Seldes A. M. y Burton, G. 1985. *Introducción al estudio de los productos naturales*. Washington. D. C. OEA.
- Goff S. P. 2001. Retroviridae: the Retroviruses and their replication. En: Knipe D. M., Howley P. M. Fields Virology. Vol. 2. 4ta. Ed. Lippincott Wiliams & Wilkins. Philadelphia, PA, U.S.A. 1987-1939.
- González-Paredes, M. 1999. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de los frutos de *Calophyllum brasiliense*. Tesis de licenciatura en Biología Experimental. UAM-I México.DF. 3-24pp.

- Gottlieb M. S., Schroff R., Schanker H. M. Weisman J. D., Fan P. T., Wolf R. A., Saxon A. 1981. *Pneumocytis carinii* pneumonia an mucosal candidiasis in previosly healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305, 1425-1431.
- Gunasekera S. P., Jayatilake G. S., Selliah S. S. and Sultanbawa M.U.S. 1977. Chemical investigation of ceylanose plants. Part 27. Extractives of *Calophyllum cuneifolium*. Thw. *Calophyllum soulattri* Burm. F. (Guttiferae). *Journal of the Chemical Society. Perkin I.* 1505-1511.
- Huerta-Reyes, M. 2004. Evaluación de la actividad inhibitoria de metabolitos secundarios de Clusiaceae Mexicanas sobre el VIH-1. Tesis de Doctorado en Ciencias biomédicas. Instituto de Biomédicas, UNAM. México.DF., 33-98 pp.
- _____, Basualdo, M., Lozada, L., Jiménez E., Soler, C., Reyes-Chilpa, R. 2004. HIV-1 Inhibition by Extracts of Clusiaceae Species from Mexico, *Biol, Pharm Bull.* 27(6). 916-920.
- _____, Basualdo, M., Abe F., Jiménez E., Soler, C., Reyes-Chilpa, R. 2004. HIV-1 Inhibitory Compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves, *Biol, Pharm Bull.* 27(9). 1471-1475.
- Huang T. B., Fong W. P., Yeung H. W. 1997. Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sci.* 61, 933-949.
- Ito C., Itoigawa M., Mishina Y., Cechinel V., Enjo F., Tozuda H., Nishino H., Forukawa H. 2003. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. *J. Nat. Prod.* 66, 368-371.
- Jackson B., Locksley H. D. and Sheinmann F. 1966. Extractives from Guttiferae. ParT. I. Extractives of *Calophyllum selerophyllum* Vesq. *Journal of the Chemical Society (C)* 178-181.

- Jackson B., Locksley H. D. And Scheimann F. 1969. The isolation of 6-desoxyjacareubin. 2-(3,3-dimethylalil)-1,3,5,6-tetrahydroxy-xanthenes and Jacareubin from *Calophyllum inophyllum*.
- Jacobo-Molina A., Clark A.D. Jr., Williams R. L., 1991. Crystals of a ternary complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a monoclonal antibody Fab. Fragment and double-stranded DNA diffract x-rays to 3.5 Å resolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10895-10899
- Lozoya, L. X. 1992. Estado Actual del conocimiento en plantas medicinales mexicanas. IMEPLAM, A.C. México. pag. 225.
- Ortega-Escalona, F., Castillo –Morales I., and Carmona-Valdominos, T. 1991. Anatomía de la Madera de Veintiséis Especies de la Selva Lacandona, Chiapas. Angiospermas Arbores de México No.3. La Madera y su uso 26. Instituto de Ecología A.C. & Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Kashman Y., Gustafson K. R., Fuller R.W., Cardellina J. H. II, McMahon J. B., Currens M. J., Buckheit R.W. Jr., Hughes S. H., Cragg G. M., Boyd M. R. 1992. The Calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum laginerum*. *J. Med. Chem.* 35, 2735-2743.
- Kearns D. M., Berry P. E., Stevens P. F., Cuello N. L., Pipoly J. J. III, Robson N. K. B., Holst B. K. 1998. Flora of the Venezuela Guayana Vol.4 Caesalpinaceae- Ericaceae Missouri Botanical Garden Press. St. Louis. U.S.A. St. Louis Missouri, 799 pp.
- King F. E.; King T. J. and Manning L. C. 1953. The Chemistry of Extractives from Hardwoods. Part XIV. The Constitution of Jacareubin a Pyranoxanthone from *Calophyllum Brasiliense*. *The Chemistry of Organic*: 3932-1937.
- Kilby J. M., Hopkins S., Venetta T. M., DiMassimo B., Cloud G. A., Lee J. Y., Alldredge L., Hunter E., Lambert D., Bolognesi D., Matthews T., Johnson M., Nowak M.A., Shaw G. M., Saag M.S. 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41 mediated virus entry. *Nat. Med.* 4, 1302-1307.

- Kohlstaed L., A., Wang J., Friedman J. M., Rice P. A., Steitz T. A. 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256, 1783-1790.
- Kuklinski, C. 2003. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas y de origen natural; 1ed. Ed. Omega S.A, Barcelona, 101-113 pp.
- López V. E, Tapia T. E. 2005. "Economía de los productos forestales no maderables: aprovechamiento sustentable de un recurso fitoquímico en México", Tesis de Licenciatura en Economía. Facultad de Economía, UNAM. México.DF., 50 pp.
- Ma C., Nakamura N., Hattori M., Kakuda H., Qiao J., Yu H. 2000. Inhibitory effects on HIV-1 protease of constituents from the wood of *Xanthoceras sorbifolia*. *J. Nat. Product.* 63, 238-242.
- Mansky L. M., Temin H. M. 1996. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* 69, 5087-5094.
- Matthée G., Wroight A. D. y Köning G. M. 1999. HIV Reverse Transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta Med.* 65, 493-506.
- Matern U., Luer P., Kreusel D. 1999. Biosynthesis of Coumarin. Tomado de: *Comprehensive Natural Products Chemistry Vol.1*. Edit Elsevier. 623-637 pp.
- Mckee T. C., Cardellina J.H. II, Dreyer G. B., Boyd M. R. 1995. The pseudocalanolides: structure revision of calanolides C and D. *J. Nat. Product.* 58, 916-920.
- Mckee T. C., Covington C. D., Fuller R.W., Bockesch H. R., Young S., Cardellina J. H. II, Kadushin M. R., Soejarto D. D., Stevens P.F., Cragg G. M., Boyd M. R. 1998. Pyranocoumarins from tropical species of genus *Calophyllum*: a chemotaxonomic study of extracts in the National Cancer Institute Collection. *J. Nat. Product.* 61, 1252-1256.

- Min B. S., Jung H. J., Lee J. S., Kim Y H., Bok S. H., Ma C. M., Nakamura N., Hattori M., Bae K. 1999. Inhibitory effect of triterpene from *Crataegus pinnatifida* on HIV-1 protease. *Planta Med.* 65, 374-375.
- Patil., Freyer, A. J., Eggleston. Drake S., Haltiger Curtis. R., Bean, Mark F., Taylor, Caranfa, Breen, Ann L., and Westley. John. 1993. *Inophyllum* s. Novel Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from Malaysian tree. *Calophyllum inophyllum* Linn. *Medicinal Chemistry*. 36(26):4131-4138.
- Pennington. T., Sarukhan, José. 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México. México., Instituto Nacional de Investigadores Forestales. pag.413.
- Peres V. y Nagem T.J. 1997. Trioxxygenated naturally occurring xanthenes. *Phytochemistry*. 44(2):191-214.
- Pereira M. O., Gottlieb O. R., Magalhaes M.T. 1967. Novas xantonas do *Calophyllum brasiliense*. *An. Acad. Bras. Cien.* 38, 425-427.
- Plattner, R. D.; Spencer, G. F.; Weisleder D. and Kleiman, R. 1974. Chromannone acids in *Calophyllum Brasiliense* seed oil. *Phytochemistry* 13:2597-2602.
- Reyes Chilpa R., Jiménez Estrada M., Estrada Muñiz E. 1997. Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliense*. heartwood. *J. Chem. Ecol.* 23, 1901-1911.
- Reyes Chilpa R., Estrada Muñiz E., Ramírez-Apan T., Amekraz B., Aumelas A., Jankowsky C., Vázquez-Torres M. 2004. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sci.* 75, 1635-1647.
- Ruiz A. G. 1997. Fundamentos de Hematología, 1ed, (AMEH) Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, Ed. Media Panamericana.
- Sarawak MediChem Pharmaceuticals, Inc. 2004. Disponible <http://sarawak-medichem.com/cala/dev.htm>.

- Secretaria de Gobernación del estado de Veracruz, 1988. Colección: Enciclopedia de Municipios de México, 1ed. 362-365 pp.
- Secretaria de Gobernación del estado de Guerrero, 1988. Colección: Enciclopedia de Municipios de México, 1ed 81-85 pp.
- Secretaria de Salud, México. 2006. Disponible en: [http://www. Salud. gob.mx/conasida/medicos/guias/médica/guia 2006. pdf](http://www.Salud.gob.mx/conasida/medicos/guias/médica/guia 2006.pdf).
- Stevens P. F. 1980. A revision of the old world species of *Calophyllum*(Guttiferae). *J. Arnold Arbor*.61, 117-171.
- Stout, George H., Krahn. M. M. and G. G. Breck 1968. *Calophyllum* Products II. Brasiliensie and *Inophyllodie* acids. *Tetrahedron Letters* 29:3285-3290.
- Soto Núñez J. C. 1995. Las plantas medicinales y su uso tradicional en la cuenca del Río Balsas; Estado de Michoacán y Guerrero, México. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM, 231pp.
- Tarinas A., Tápanes R. D., Pérez L. J., 2000. Terapia antiviral para VIH-SIDA. *Rev. Cubana Farm.* 34, 207-220.
- Vazquez, A. 1997. Guia para interpretar el análisis químico del agua y suelo. 2ed. Chapingo, México. 8-20 pp.
- Vlietinck A. J., De Bruyne T., Apers S., Plieters L., A. 1998. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus(HIV) infection. *Planta Med.* 64:97-109.
- Wlodawer A., Erickson J.M.1993.Structure-based inhibitors of HIV-1 proteas. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 543-585.

14. ANEXOS

Anexo 1 BASE DE DATOS

1.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
LUGAR Y MUNICIPIO	Campeche Municipio: Calakmul 2.45 km al S. E
DESCRIPCIÓN	Vegetación Selva baja sub- caducifolia Árbol 15m fruto café 1452002
Coordenadas	Latitud: 17° 59' 0" N Longitud: 89° 21' 40" O Altitud: 212 m. s. n. m.
COLECTOR	Jorge Calónico Soto 23688 con Demetrio Álvarez

2.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
NOMBRE VULGAR	BARI
LOCALIDAD	CAMPO EXPERIMENTAL FORESTAL TROPICAL "EL TORMENTO" KM 5 CERRO ESCADEJA A CANDELARIA CAMPECHA
DESCRIPCIÓN	FORMA BIOLÓGICA: ÁRBOL ALTURA: 15 METROS SELVA ALTA PERENNIFOLIA DE MEHILKARA ZAPOTILLA ACECEN
DETERMINO	J. C. CHASELCO P. R. M. MONJAREZ 1984
COLECTOR	E. HERNÁNDEZ X
FECHA	29/DICIEMBRE/1965

3.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
NOMBRE VULGAR	BARI
LOCALIDAD	Campo experimental profesional tropical "el tormento" km 5 carretera escarrega a candelaria Campeche
DESCRIPCIÓN	FORMA BIOLÓGICA: ÁRBOL ALTURA: 15 METROS SELVA MEDIA SUBPERENNIFOLIA CON MANILKERA ZAPOTITLAN ACACIA
COLECTOR	E. HERNANDEZ X. J CHAVELAS P. X MADRIGAL J CHAVELAS P
FECHA	8/NOVIEMBRE/1975

4.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
NOMBRE VULGAR	BARI
LUGAR Y MUNICIPIO	CHIAPAS MUNICIPIO OCOSINGO A 2km al N de estación Chapul
Coordenadas	Latitud: 17° 1' 4'' N Longitud: 91° 19' 0'' O Altitud: 176 m. s. n. m
DESCRIPCIÓN	Árbol de 10 metros con fruto. Vegetación: Sabona
COLECTOR	E. Martínez. S. C. H. Ramos y R. Lomera 25248
OBSERVACIONES	Altura: 150 m. s. n. m.
FECHA	8/SEPTIEMBRE/1992

5.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
LUGAR Y MUNICIPIO	ESTADO DE CHIAPAS No 7253
LOCALIDAD	La chamorra (80 Km N, O, Cintalapa
COLECTOR	FAUSTINO MIRANDA
FECHA	10/agosto/1951

6.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess bet. C. H Ramos 2002
FAMILIA	Guttiferae
LUGAR Y MUNICIPIO	Ocosingo 0.5 Km. al S de Nuevo San Francisco León (Restaurante) el paraíso
DESCRIPCIÓN	Vegetación restos de selva alta perennifolia. Árbol de 15 metros fruto verde
DETERMINO	Jorge Calónico Soto 234373 Álvarez (MEXU) (CONABIC)
COLECTOR	E. Martínez C. Aguilar
Coordenadas	Latitud: 17° 1' 25'' N Longitud: 92° 9' 19'' O Altitud: 177 m.s.n.m

7.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess var, reko Standl
FAMILIA	Guttiferae
NOMBRE VULGAR	Leche Maria, cacuy en zoque se usa para muebles
LUGAR Y MUNICIPIO	Sta Maria Chimalapa cafetales cerca de Santa Maria Chiapas
DESCRIPCIÓN	Cafetales con Vochysia. Andira geleottiana Terminalia. Enterolobium schomburgkii, Cassia moschata, Hymenaea, Apeiba, Guazuma, Aidimopanax, Inga, suelos p'rofundos pendientes ligeras o fuentes. Árbol de 18 metros d.a.p 50 cm brecha de corteza de color rosado con látex amarillo pegajoso fruto verde, carne amarillenta, con semillas, amarillas color laurel común

DETERMINO	T. Wendt 1986
COLECTOR	H. HERNÁNDEZ G. 462
OBSERVACIONES	Latitud: 16° 55'N Longitud: 94° 40'O Altura: 300 metros
FECHA	29/septiembre/1984

8.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
LUGAR Y MUNICIPIO	MUNICIPIO DE OCOSINGO 4 km AL SE DEL POBLADO DEL EJIDO NUEVO FRANCISCO LEON. EN EL RIO LA FLORIDA, ZONA NORTE DE CHIAPAS
DESCRIPCIÓN	ACAHUAL ARBOREO MUY PERTURBADO, TOPOGRAFÍA PLANO INUNDADO. ÁRBOL DE 26 METROS DE ALTURA, CORTEZA EXTERNA FISURADO BLANQUESINA CON MANCHAS OSCURAS Y AMARILLAS CON INTERNA CON EXUDADO AMARILLO AMARGO HOJAS SIMPLES COORACEAS, GLABRAS, DRUPAS VERDES, AMARGAS O AGRIDULCES
DETERMINO	J. LUIS, LOPEZ GARCIA (AGOSTO 97)
COLECTOR	J. LUIS LOPEZ GARCIA
Coordenadas	Latitud: 17° 01'36'' N Longitud: 91° 15'45'' W ALT:195M
FECHA	18 Y 25/ENERO/1996

9.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
NOMBRE VULGAR	Bari
LUGAR Y MUNICIPIO	De Calak Mul. Loc Guerrero
DESCRIPCIÓN	Altura: 10 km al SE de dos Naciones camino a El civalito. Coordenadas: 17°54'50 N, 89° 18' 30 W. Eleva: 160 m. s. n. m Selva mediana subperennifolia Árbol de 25 m con látex amarillo
COLECTOR	E. Martínez S. 30463 D. Álvarez B. Sanders
FECHA	2/ABRIL/1998

10.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess
FAMILIA	CLUSIACEAE
LUGAR Y MUNICIPIO	ATOYACA DE ALVAREZ
LOCALIDAD	EL MOLOTE
DESCRIPCIÓN	TIPO DE VEGETACIÓN BOSQUE MESOFILO DE MONTAÑA. FORMA BIOLÓGICA: ÁRBOL TAMAÑO DE 7 A 9 METROS ABUNDANCIA REGULAR FRUTOS VERDES

COLECTOR	J. F. ROJAS Y D SANTIAGO
Coordenadas	Latitud: 17° 24'57'' Longitud:100° 90'46''Altitud: 160 m. s. n. m
FECHA	10/OCTUBRE/2004

11.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse Cambess</i>
LUGAR Y MUNICIPIO	Carretera Chamela –P. Vallarta, “El Tuito” unos 20 ó 25 kms ants de P. Vallarta. Coordenadas:
DESCRIPCIÓN	Suelo Profundo, pardo, ondulado
DETERMINO	R. Hernández M
COLECTOR	R. Hernández M 3022, A. Solís y E
ALTITUD	780 m. s. n. m
FECHA	24/Noviembre/1976

12.NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse Cambess</i>
FAMILIA	Guttiferae
LUGAR Y MUNICIPIO	Jalisco Coordenadas:
LOCALIDAD	Km 11 de la brecha, hacia la mina de Zimapan apartir de la carretera de Vallarta municipio Tuito
DESCRIPCIÓN	Árbol de 12-15m de alto; frutos esféricos de color café; escaso una cañada. Hab: bosque de Pinus oocarpa, P. Jaliscoza, P. maximinoi, Podocarpus reichei, Quercus magnolifoña, Q. aristata. Altura: 1130m
DETERMINO	S.Zamudio
COLECTOR	S. Zamudio Col S No: 4838
FECHA	12/Octubre/1986

13.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse Cambess</i> var, rekoi Standl
FAMILIA	Guttiferae
DESCRIPCIÓN	B. tropical subperennifolia sloanea, Ficus, Licaria Árbol 20-25 m flores blancas
DETERMINO	R. CUEVAS G
OBSERVACIONES	19° 36'43'' N 104° 25'16'' W 16-17 KM al NE de Casimiro castillo JAL 400-450 m. s. n. m. FRECUENTE 14VII1988
FECHA	MAYO/ 1989

14.NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse Cambess</i>
FAMILIA	Guttiferae
LUGAR Y MUNICIPIO	Municipio de aquila Michoacán México Coordenadas:
LOCALIDAD	Él temaste 4 Km. de aquila río arriba.
DESCRIPCIÓN	ECOL: Selva mediana (mojotal) primaria suelo pardo arenoso arcilloso, cálido, sub – húmedo. Árbol perenne 11 M; abundante, fruto verde Inmaduro, nom, vul, marial. Usos: Maderable. Látex amarillo

OBSERVACIONES	ALTURA: 250 m. s. n. m
COLECTOR	B. Guerrero. 757 No. REC. INF: 531, Herb: Xal
FECHA	01/Marzo/1980

15.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
LOCALIDAD	A 2 km al norte del camino 25 y a 5.2 km al W de la W O balancan Tabasco Méx.
DESCRIPCIÓN	ALTURA: 10m ECOL: SELVA MEDIANA LÁTEX AMARILLO
COLECTOR	A. NOVELO Et. AL 112
NOTA	No- REC- INF: 309 (MEXU) GUTTI 017001
FECHA	04/DICIEMBRE /1975

16.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess
NOMBRE VULGAR	Leche
LOCALIDAD	San Carlos Yautepec, Distrito Yautepec; Oaxaca México. San miguel Chongo 0.5 kilómetros
DESCRIPCIÓN	Selava mediana sub- perennifolia y vegetación secundaria Guomil orilla de arroyo. Árbol de 15 metros, árbol pequeño verde, hojas simples opuestas con glándulas en la base poco látex blanco abundante
Coordenadas	16° 0' 36'', 95° 57' 58'' W Altitud: 340 m. s. n. m
COLECTOR	Misael Elorsa C. 1796
FECHA	04/MARZO/1999

17.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
LUGAR Y MUNICIPIO	Municipio de San Carlos Yautepec Distrito de Yautepec Oaxaca México, San Miguel Chongo, paso del río a la entrada de la población Bosque de galería
Coordenadas	16° 0' 10'' N 95° 57' 54'' W Altitud: 1460 m. s. n. m

18.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess vas.rekoi
FAMILIA	Guttiferae
LUGAR Y MUNICIPIO	Santa Maria Chimalapa Distrito Juchiton, Oaxaca, México San Antonio Nuevo Paraíso a 2 metros en línea recta al W con cerro comedor
DESCRIPCIÓN	Selva alta perennifolia. Árbol de 8 metros, hojas opuestas tallos cuadrangulares tronco con olor a mamey regular

DETERMINO	J. RIVERA H. 1999. Silvia Salas M. 745 Ms con J, Rivera H, R. García S y Arellano C. y A. Sánchez A
Coordenas	17° 8' 40'' N 94° 21' 28'' W Altitud: 300 m. s. n. m
FECHA	18/mayo/1998

19.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
NOMBRE VULGAR	Triguillo abundante
LUGAR Y MUNICIPIO	OAXACA. MUNICIPIO PUTLA DISTRITO DE PUTLA
DESCRIPCIÓN	Ca: 2 km la SE del puente grande Altura: 810metros selva mediana subcaducifolia con ficus cococoloba. Homalium. Suelo arenoso. Árbol de 25 metros d. a. p. 88cm. Corteza fisurada brecha crema que cambia a café rojizo. Excreta látex amarillo. Las hojas al estrujarse con olor a limón. La madera se usa para la construcción de viviendas
DETERMINO	E. SOLANA C 1998
FECHA	8/JULIO/1988

20.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
LUGAR Y MUNICIPIO	Estado de Oaxaca
LOCALIDAD	Alrededores de Santa Maria Chimalapa
DESCRIPCIÓN	Hábitat Selva Tropical Altura: 150 metros
DETERMINO	J.Reedowski
COLECTOR	E. Castro G
FECHA	19 y 20/MAYO/ 1973

21.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
NOMBRE VULGAR	TRIGILLO
LUGAR Y MUNICIPIO	OAXACA MUNICIPIO DE PUTLA DISTRITO DE PUTLA AL SE DE PUENTE GRANDE
DESCRIPCIÓN	RESTO DE SELVA MEDIANA SUBCADUCIFOLIA,SUELO ARENOSO, ÁRBOL DE 25 METROS d. a. p. 88CM DE CORTEZA FISURADA BRECHA CREMA QUE CAMBIA A CAFÉ ROJIZO EXCRETA LÁTEX AMARILLO LAS HOJAS ALESTRUJARSE CON OLOR A LIMA. LA MADERA SE USA PARA LA CONSTRUCCIÓN DE VIVIENDAS.

COLECTOR	E. SOLANO C401
OBSERVACIONES:	ALTURA:810
FECHA	8/JULIO/1988

22.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess
FAMILIA	CLUSIACEAE
NOMBRE VULGAR	MARIA
LOCALIDAD	30 km al NE de Río Blanco Quintana Roo
DESCRIPCIÓN	Árbol 35m de alto frutos verdes tiene látex amarillo
DETERMINO	W. D Stevens 1964
COLECTOR	Pedro P. Moreno 24037
Coordenadas	13° 03' N 84° 58'' W Elevación. 80-100cm
FECHA	247MAYO/1984

23.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> <i>Cambess</i>
FAMILIA	Guttiferae
LUGAR Y MUNICIPIO	Montepío Municipio de Catemaco Ripario Veracruz
LOCALIDAD	Puente de la palma 25 km N. E de la carretera Cate macó
DESCRIPCIÓN	Arbol de 10 metros Flores blancas "Oco"
DETERMINO	R. CEDILLO T. 1984
COLECTOR	R. CEDILLO T. 2753
OBSERVACIONES	ALTURA. 200 m. s. n. m
FECHA	25/JULIO/1984

24.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum</i> . S. P No. REC. INF D 030550
FAMILIA	Guttiferae
LUGAR Y MUNICIPIO	México Estado de Veracruz
LOCALIDAD	Cuenca del río Tonalá cerca de los límites con Tabasco
DESCRIPCIÓN	Altura: 5 metros Vegetación: Primaria Popal (ACUATICA) Abund. Regular Árbol Perenne Estéril Tam: 1.10 metros
COLECTOR	A. LOT. No 1234
FECHA	28/ENERO/1971

25.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> <i>Cambess</i>
FAMILIA	Guttiferae
NOMBRE VULGAR	Bari
LOCALIDAD	Coatzacoalcos Veracruz
DESCRIPCIÓN	Hábitat: Asoc. C. b. Licania Aspidosperma derivado de una selva alta perennifolia Incl: 30%

COLECTOR	González L. Garza V; León Cazares
OBSERVACIONES	ALTITUD:50 m. s. n. m
FECHA	23/NOVIEMBRE/1961

26.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse Cambess</i>
FAMILIA	Clusiaceae
NOMBRE VULGAR	Ocu
LUGAR Y MUNICIPIO	Municipio San Andrés Tuxtla. Coordenas: Longitud Oeste: 95° 04' Y 95° 9' Estado de Veracruz Latitud Norte: 18° 34' Y 18* 36'
LOCALIDAD	Laguna Escondida. Cercanías de la Estación de Biología Tropical de los Tuxtlas
DESCRIPCIÓN	Árbol grande (20 metros metros aprox.) muy ramificado, con las ramas bajas, de manera que pueden tomarse las hojas fácilmente y situado en la orilla de la laguna. La colecta se realizó sobre una lancha. Sano, se colectaron ramas, hojas y frutos maduros. Árbol A. Selva alta perennifolia, vegetación secundaria.
IDENTIFICO	Lucio Lozada
COLECTOR	Eduardo Aguilar Bañuelos No 1 Con Estrella Tapia Tapia
GUIAS	Lázaro Montes y Darío Velasco
FECHA	Jueves 28 de Agosto del 2003 Altitud: 200 m. s. n. m

27.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse Cambess</i>
FAMILIA	Guttíferae
LOCALIDAD	SOBRE LA CARRETERA DE CATEMACO A MONTEPIÓ VERACRUZ
DESCRIPCIÓN	SUELOS DERIVADOS DE ROCA VOLCÁNICA SELVA MEDIANA-ALTA PERENNIFOLIA CON FICUS, BERNOULIA, BROSIMUM 200 m. s. n. m. ÁRBOL DE 14 METROS Y 40C D. A. P. BOSQUE TROPICAL PERENNIFOLIA
DETERMINO	TERRY D PENNIGTON
COLECTOR	T. D. PENNIGTON Y J SRUKHÓN K,
FECHA	2/OCTUBRE/67

28.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse Cambess</i>
FAMILIA	Guttíferae
LUGAR Y MUNICIPIO	Tropical los Tuxtla
LOCALIDAD	Estación de Biología

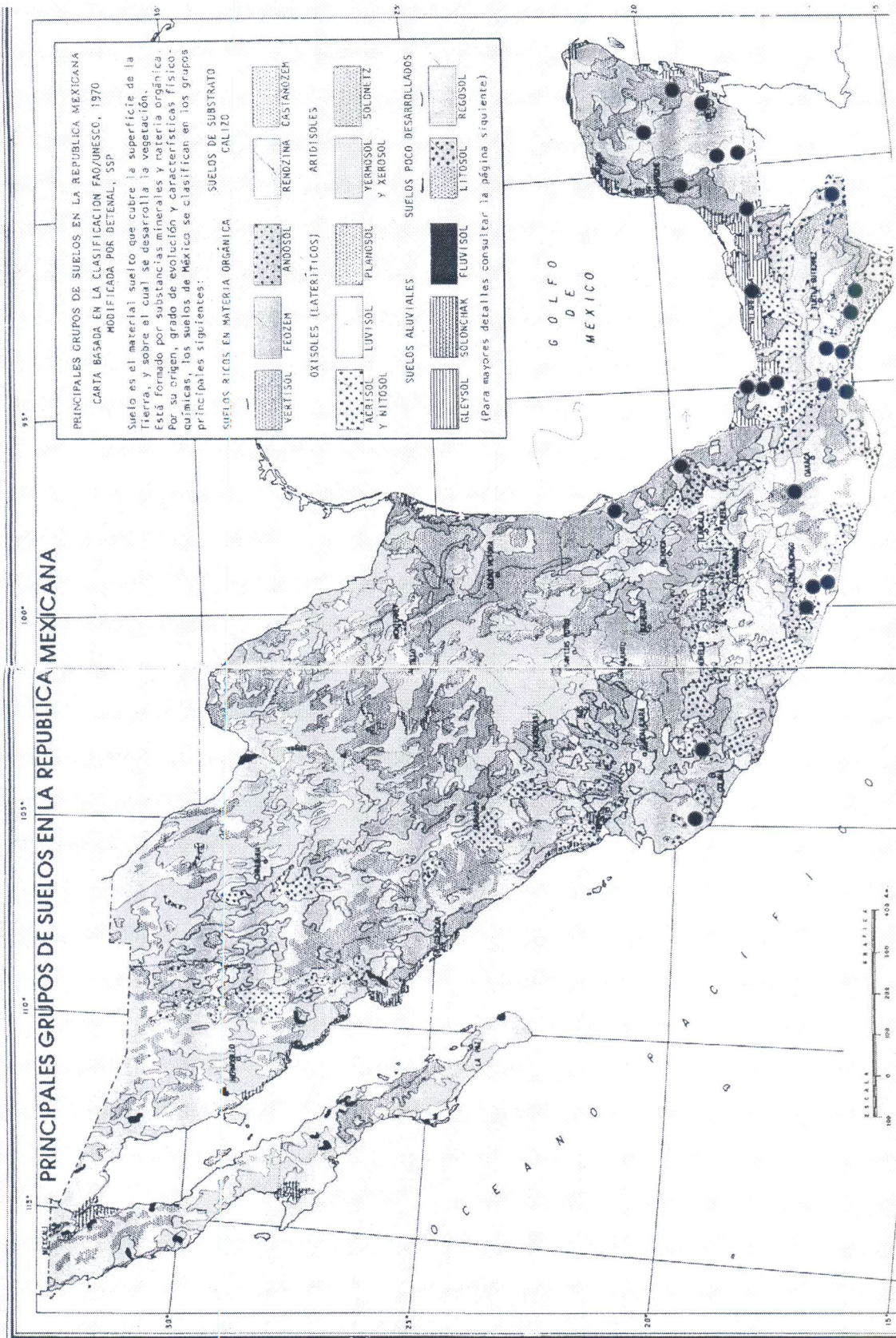
DESCRIPCIÓN	Vegetación selva alta perennifolia Alcahual: Árbol de 25 m y 45cm de d. a. p. Corteza: lisa aparentemente fisurada por las grandes lentécelas. Exudado amarillento "Ocu" Colecta d madera para Xiloteca
Coordenadas	Longitud Oeste: 95° 04' 09'' Latitud Norte: 18° 34' y 18° Altitud: 200 m. s. n. m.
DETERMINO	Guillermo Ibarra Manríquez 1984
COLECTOR	Guillermo Ibarra Manríquez 1345 G. Gómez V. y S. Sinaca C.
FECHA	24/FEBRERO/1984

29.-NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess var, rekoi Standl
FAMILIA	Guttiferae
NOMBRE VULGAR	BARI
LUGAR Y MUNICIPIO	Veracruz Municipio de Hidalgo Titlan lomititas al SE de Poblado 6 lomerío con suelos profundos área quemada
DESCRIPCIÓN	Lomerío con sucloc profundos área quemada hace 6-7 años pendientes y crestas con jimbal de 01 meca, cecropia, heliocarpus etc. Y árboles grandes esparcidos áreas abrigadas con manchones de selva de C. Symphonia, dialium, guarca, pithecellobium etc. Árbol de 18 metros d. a. p. 50cm Corteza parda mediana muy moleados con fisuras verticales cortadas regulares prominentes, estrechade corteza y color algo claro anaranjado rosada el exudado dedl látex es amarillo pegajoso, madera amarilla pálida, frutos verdes.
DETERMINO	B. Hammel 1986
COLECTOR	TOM WENRAT, A. VILLALOBOS No 3640
OBSERVACIONES	Latitud: 17° 15'45'' N Longitud: 94° 29'30'' O ELEVACIÓN: 150 METROS
FECHA	14/MAYO/1982

30.- NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Calophyllum brasilinse</i> Cambess
FAMILIA	Guttiferae
NOMBRE VULGAR	BARI
LOCALIDAD	Ciudad de Menda Yucatán, Municipio de Mérida. Ecol: Secundaria sobre la acerca. Árbol perenne de 4 metros, fruto verde. Osos ornamexl con látex blanco
DESCRIPCIÓN	Flora Yucatense
DETERMINO	V. Sosa Herb. Xd
COLECTOR	M. Norvadez 1134
Coordenadas	20-59 N 89-37 W Altitud: 8 m. s.n. m
FECHA	28/SEPTIEMBRE/1983

Map of China showing climate zones and vegetation types. The map includes a grid of latitude and longitude lines. A legend on the right side defines climate zones (CA, SA, TA, SEM, H, M, S) and vegetation types (CA, SA, TA, SEM, H, M, S). A scale bar at the bottom indicates distances in kilometers (0, 100, 200, 300, 400, 500).

Anexo 5 DISTRIBUCIÓN DE SUELOS DE *Calophyllum brasiliense*



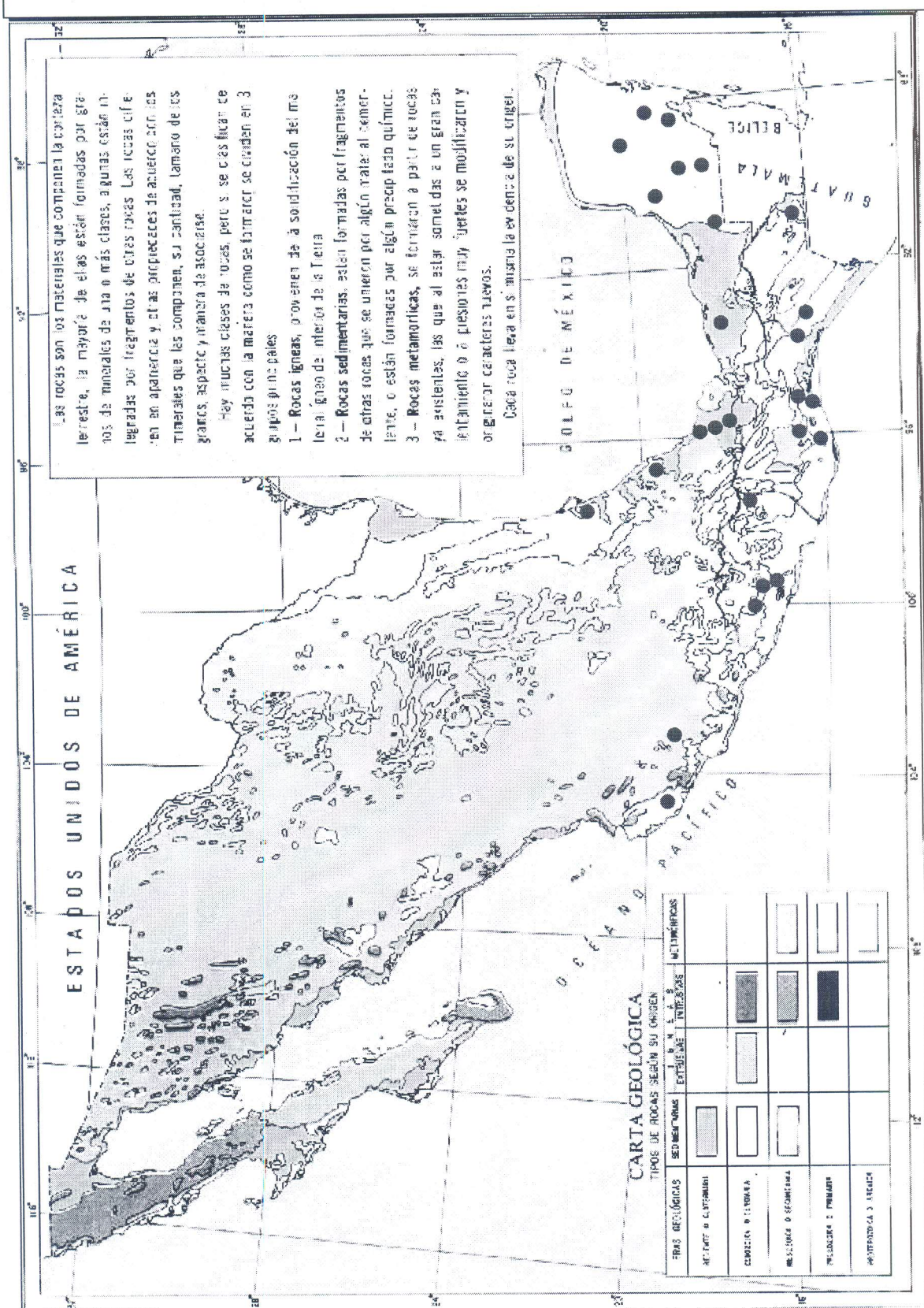
VEGETACIÓN

- MATORRAL DESÉRTICO
- MATORRAL ESPINOSO
- MATORRAL ESPINOSO CON PLANTAS CARNOsas Y PASTIZAL CHAPARRAL
- SELVA BAJA CACAHUATLA
- SELVA BAJA O MEDIANA Y SABANA
- SELVA ALTA
- BOSQUE MIXTO
- BOSQUE PINO ENCINO
- BOSQUE DE OTICMELES

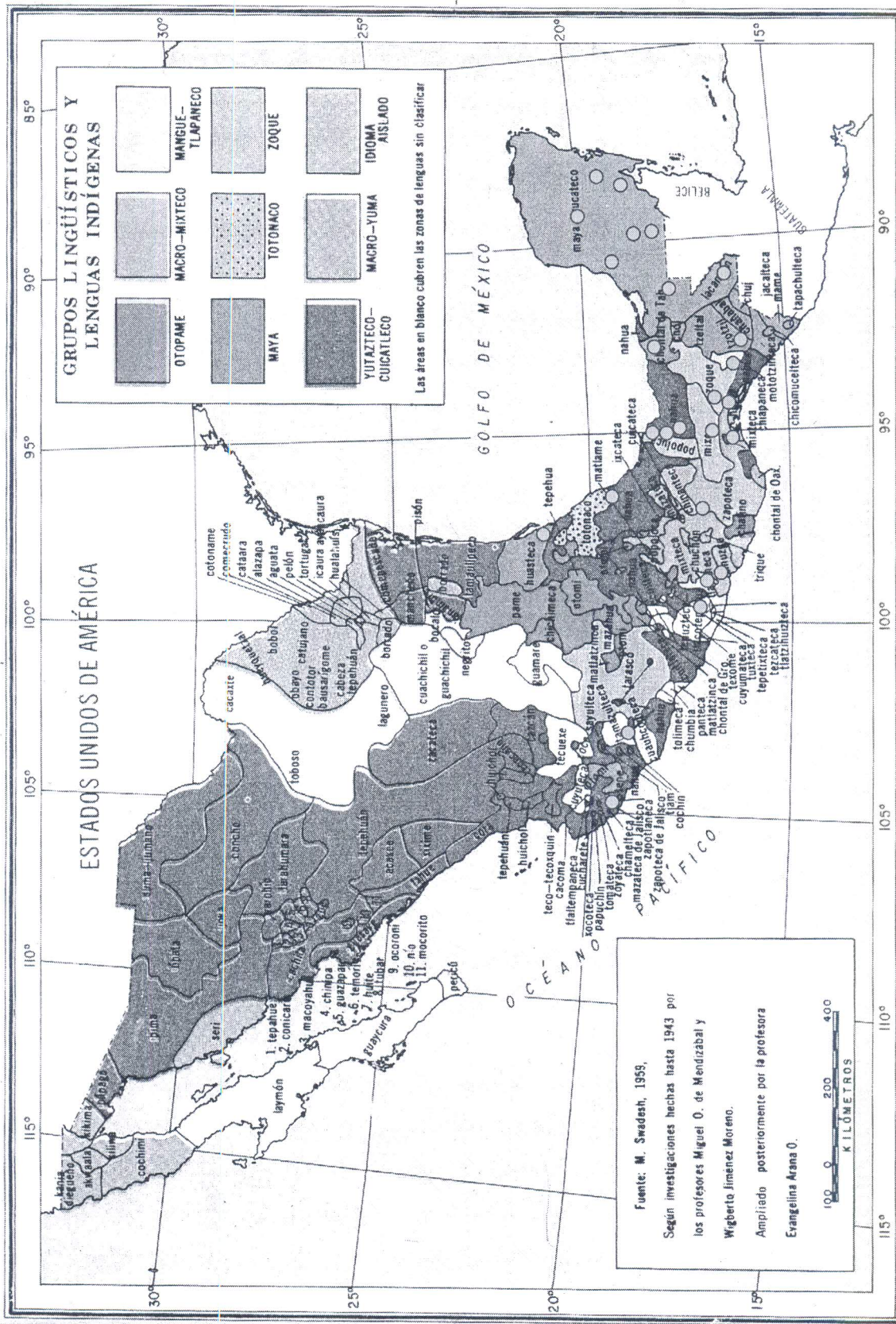
Scale: 0 200 400 600 km

Mapa de la Vegetación de México. Fuente: Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).

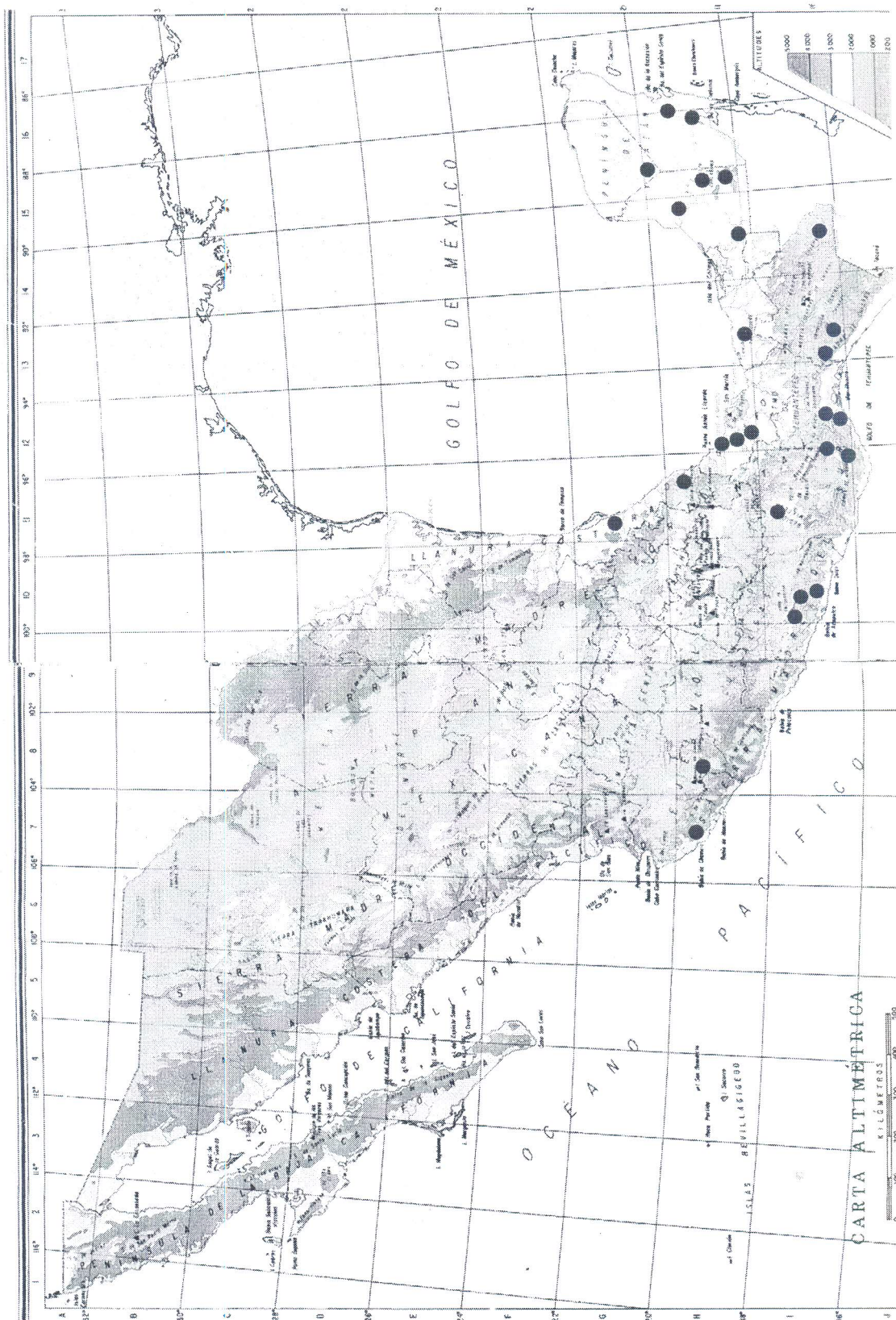
Anexo 2 DISTRIBUCIÓN DE ROCAS DE *Calophyllum brasiliense*



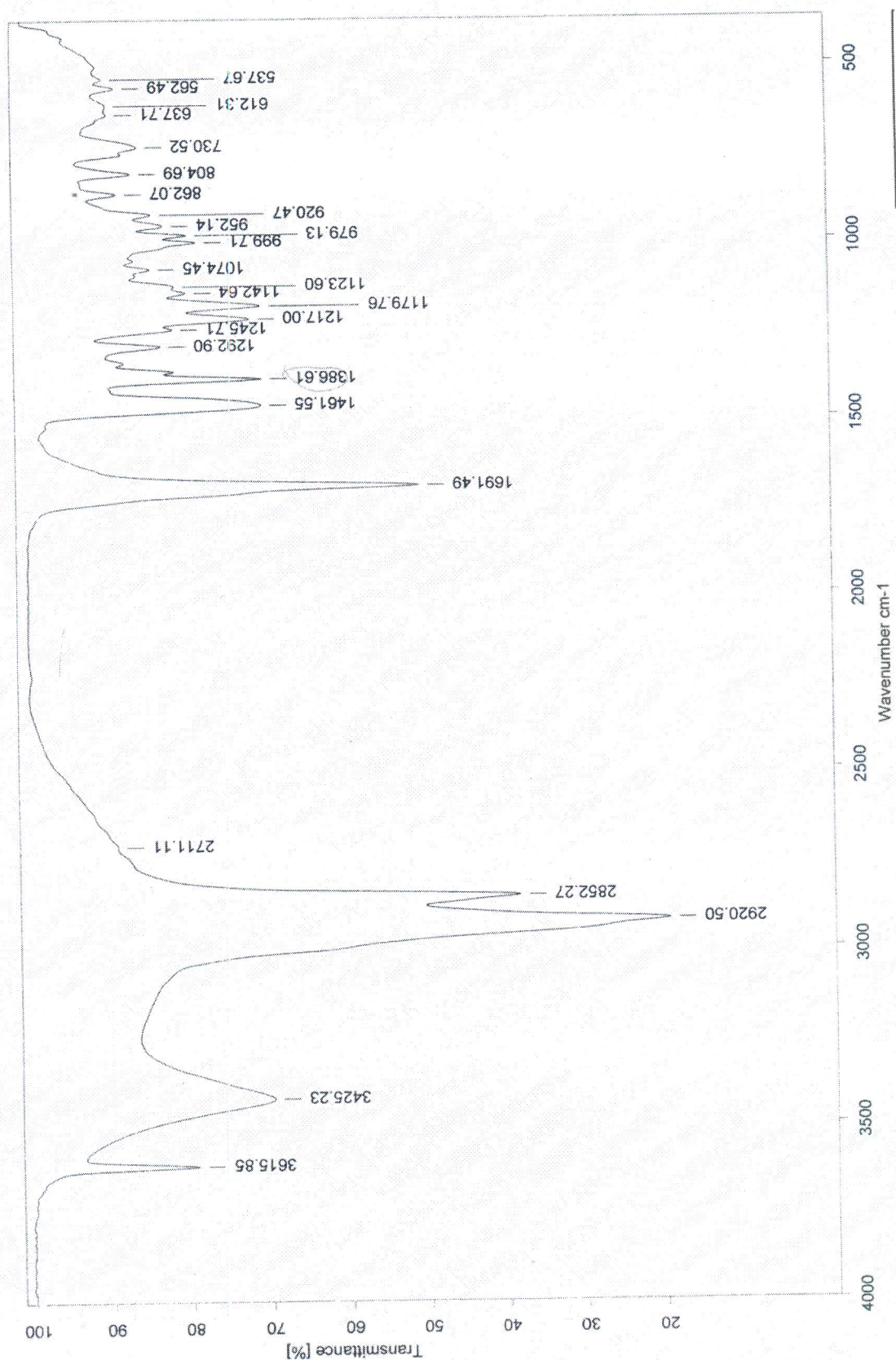
Anexo 7 DISTRIBUCIÓN DE LENGUAS INDÍGENAS DE *Calophyllum brasiliense*



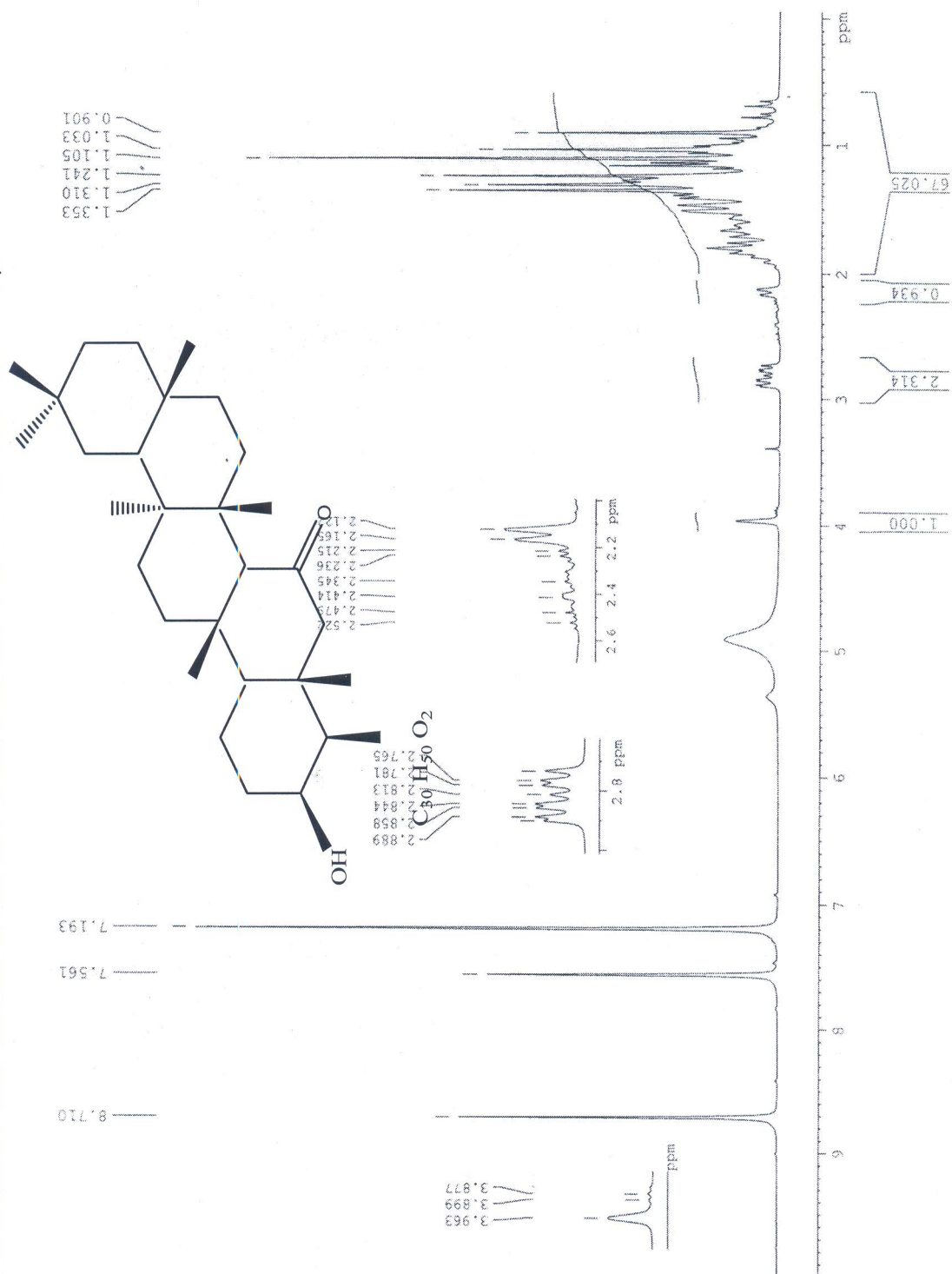
Anexo 3. DISTRIBUCIÓN DE ALTITUD DE *Calophyllum brasiliense*



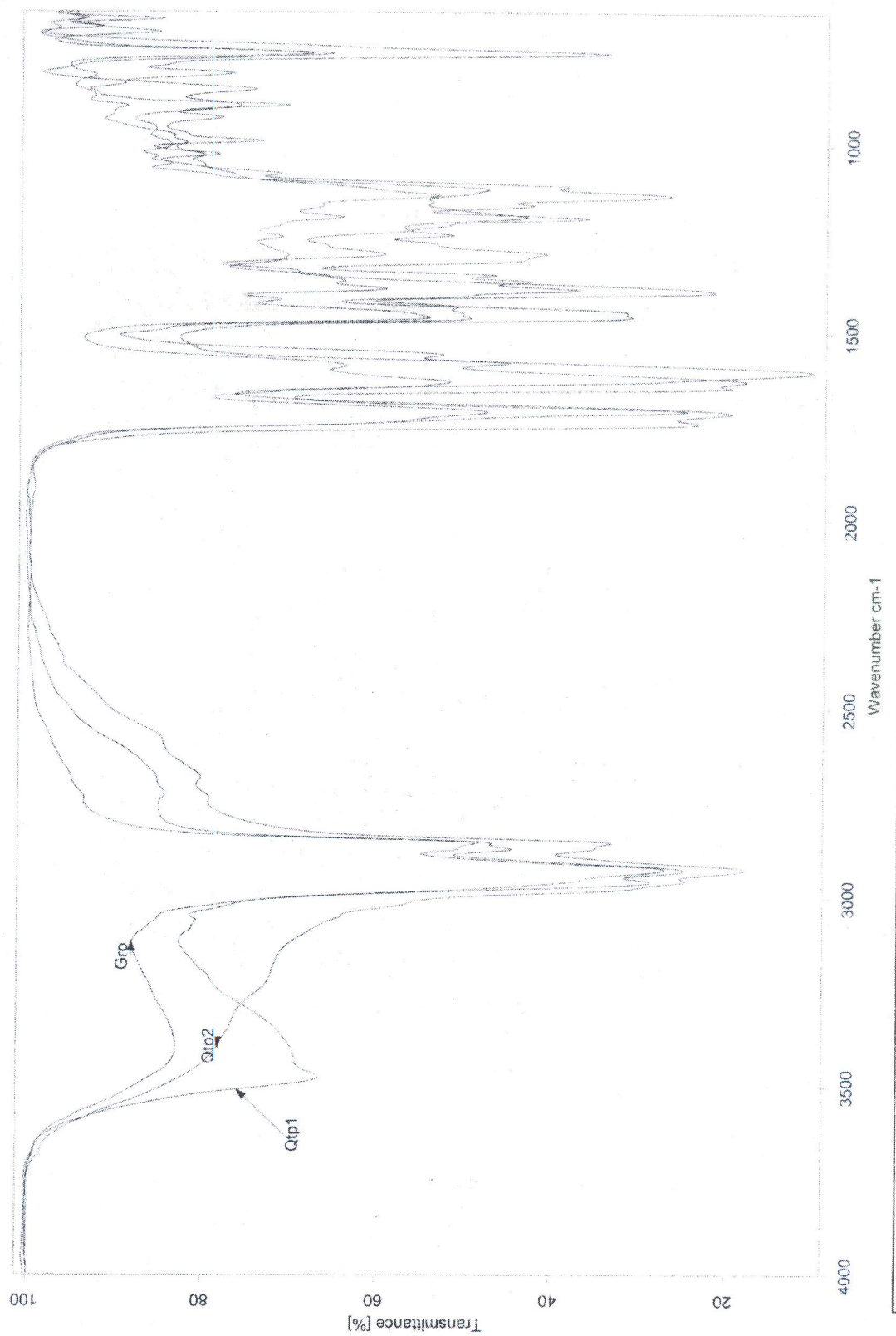
ANEXO 8. ESPECTRO DE INFRAROJO (IR) DE LA COLECTA DE HOJAS GUERRERO



Anexo 9. ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR TRITERPENO: 3 β Hidroxi-7-Oxofriedelina



Anexo 10. ESPECTRO DE INFRAROJO (IR) DE LA COLECTA DE HOJAS GUERRERO COMPARADO CON LOS QUIMIOTIPOS 1 Y 2



Anexo 11. PLACAS DE PRUEBAS BIOLÓGICAS

8 NOVIEMBRE DEL 2005

A) LOS EXTRACTOS SE PROBARON A 10 MG/500 µL

B) LOS COMPUESTOS SE PROBARON A 1 MM (PESO MOLECULAR/100 EN MG DISUELTO EN 250 µL)

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	ST1 500 µg/ml	CT2 500 µg/ml	HG3 500 µg/ml	HT4 500 ug/ml	ST5 500 ug/ml	CT6 500 ug/ml	HG7 500 ug/ml	HT8 500 µG/ML	ST9 500 µG/ML	CT10 500 µG/ML	HG11 500 µG/ML	HT12 500 µG/ML	Nevirapin
B	ST1 500 µG/ML	CT2 500 µg/ml	HG3 500 µG/ML	HT4 500 ug/ml	ST5 500 ug/ml	CT6 500 ug/ml	HG7 500 ug/ml	HT8 500 µG/ML	ST9 500 µG/ML	CT10 50 µg/ml	HG11 50 µg/ml	HT12 50 µg/ml	Nevirapin
C	ST1 500 µG/ML	CT2 500 µg/ml	HG3 500 µG/ML	HT4 500 ug/ml	ST5 500 ug/ml	CT6 500 ug/ml	HG7 500 ug/ml	HT8 500 µg/ml	ST9 500 µG/ML	CT10 50 µg/ml	HG11 5 µg/ml	HT12 5 µg/ml	Nevirapin
D	ST1 500 µG/ML	CT2 500 µg/ml	HG3 500 µG/ML	HT4 500 ug/ml	ST5 500 ug/ml	CT6 500 ug/ml	HG7 500 UG/ML	HT8 500 µG/ML	ST9 500 µG/ML	CT10 250 µg/ml	HG11 250 µg/ml	HT12 250 µg/ml	Nevirapin
E	ST1 50 µg/ml	CT2 500 µg/ml	HG3 500 µG/ML	HT4 500 ug/ml	ST5 500 ug/ml	CT6 500 ug/ml	HG7 500 UG/ML	HT8 500 µG/ML	ST9 500 µg/ml	CT10 25 µg/ml	HG11 25 µg/ml	HT12 25 µg/ml	Nevirapin
F	ST1 500 µG/ML	CT2 500 µg/ml	HG3 500 µG/ML	HT4 500 ug/ml	ST5 500 ug/ml	Hiporuro 500 ug/ml	HG7 500 UG/ML	HT8 500 µG/ML	ST9 500 µG/ML	CT10 2.5 µg/ml	HG11 2.5 µg/ml	HT12 2.5 µg/ml	Nevirapin
G	ST1 500 µG/ML	CT2 500 µg/ml	HG3 500 µG/ML	HT4 500 ug/ml	ST5 500 ug/ml	Hiporuro 500 ug/ml	HG7 500 UG/ML	HT8 500 µG/ML	ST9 500 µG/ML	CT10 125 µg/ml	HG11 125 µg/ml	HT12 125 µg/ml	Nevirapin
H	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	B	B	B	B	B	RT