
Marcadores y efecto antitumoral, anti-VIH de las hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* C, "Lagarto caspi, Santa María, Barí" de las zonas de Satipo y Pucallpa. PERÚ SUDAMÉRICA

MARKERS, ANTI TUMORAL, AND ANTI-HIV EFFECT OF LEAVES AND BARK OF CALOPHYLLUM BRASILIENSI. C
"LAGARTO CASPI SANTA MARIA, BARI" OF SATIPO AND PUCALLPA REGIONS (PERU-SOUTH AMERICA)

Lucy Ibáñez Vásquez

RESUMEN

Se evaluó la actividad antitumoral y antiviral de los extractos al 10% p/v de hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* Cambess de Satipo y Pucallpa. Se utilizaron técnicas del CYTED, Skehan y Simmons. En *Artemia salina* la CL50 fue 70.5 ppm, con un límite superior e inferior al 95% de 136.50ppm y de 36.4ppm por Probits, asimismo se observó una inhibición sobre líneas celulares tumorales: U251(Cáncer del SNC), PC-3(Cáncer de Próstata), HCT15 (Cáncer de Colon), MCF7(Cáncer de Mama) y K562 (Cáncer de Tejido Linfoide) de 109.42%, 95.67%, 96.16%, 102.68% y 95.69% respectivamente, con una $p < 0,01$. En la evaluación antimitótica en cebolla, al cabo de 6 horas el IM de las células meristemáticas decreció de 13 a 1.0 a la concentración de 0.5% a 25°C. La actividad antiviral sobre la Transcriptasa Reversa (RT) del HIV-1, realizada con el Kit Lenti RT, presentó una CL50 de 70.2905 ug/ml (límites al 95%:138.89ug/ml-35.5707ug/ml). Se detectó: alcaloides, cumarinas, lactonas, triterpenos pentacíclicos, habiéndose aislado tres compuestos CBHS5, CbHS16, CbHS525354, realizándose la elucidación estructural de los dos componentes mayoritarios por RMNH1, RMNC13 y Espectrometría de Masas que fueron caracterizados como **Betulina**, que posee un efecto antiinflamatorio y el **Ácido betulínico**, que posee efectos: antitumoral y anti-VIH.

La Betulina y el Acido betulínico podrían estar implicados en la acción farmacológica del extracto de hojas de Satipo, que presentó un buen efecto antitumoral y antiviral de 72.05% sobre la RT, frente a Nevirapine utilizado en la terapia de pacientes con SIDA, que presentó 71.59%.

PALABRAS CLAVE

Marcadores, antitumoral, antiviral, SIDA, HIV-1, *Calophyllum brasiliense*, Lagarto, Bari, Santa María, Cáncer, Espectro de Masas, RMN de ¹H, RMN de ¹³C.

ABSTRACT

We evaluated the antitumoral and antiviral activity of extracts at 10% (w/v) of leaves and bark of *Calophyllum brasiliense* Cambess of Satipo and Pucallpa .

METHODS: CYTED, Skehan and Simmons techniques were used.

RESULTS: In *Artemia salina* the LC50 was at 70, 5 ppm, with 95% superior and inferior limits of 136.50ppm and 36.4ppm with Probits. An inhibition on tumoral cell lines: U251(CNS Cancer), PC-3(Prostate Cancer), HCT15 (Colon cancer), MCF7(Breast cancer) and K562 (Lymphoid tissue cancer) of 109,42%, 95,67%, 96,16%, 102,68% and 95,69% respectively, with $p < 0,01$ was observed. In the antimitotic evaluation using *Allium cepa*, after 6 hours the MI of meristematic cells decreased from 13 to 1,0 at a concentration of 0,5% at 25°C. The antiviral activity on Reverse Transcriptase (RT) of the HIV-1, performed with the Lenti RT Kit, presented a LC50 of 70,2905 ug/ml (limit of 95%:138.89ug/ml-35.5707ug/ml). We detected: alkaloids, coumarins, lactones, pentacyclic compounds, triterpens, and three compounds were isolated CBHS5, CbHS16, CbHS525354. Structural elucidation of the major components were characterized by RMNH1, RMNC13 and Mass Spectrometry and were Betulin, that has an antiinflammatory effect and betulinic acid, that has antitumoral and anti-HIV effects.

DISCUSSION: Betulin and betulinic acid could be implied in the pharmacologic action of the leaves extracts of Satipo, that presented a good antitumoral and antiviral activity of 72,05% on RT, as opposed to Nevirapine used in the therapy of patients with AIDS, that presented 71.59% activity.

KEY WORDS

Markers, antitumoral, antiviral, AIDS, HIV-1, *Calophyllum*, Lizard, Bari, Santa Maria, Cancer, Mass Spectrometry, RMNH1, RMNC13.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos sintéticos y de origen natural para combatir una serie de enfermedades como Cáncer y SIDA se ha convertido en una preocupación que deriva en un esfuerzo emprendido por instituciones universitarias, compañías farmacéuticas a nivel mundial, etc. Las plantas son una fuente importante en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de una serie de enfermedades. Por ello es necesario desarrollar ventajas competitivas en la industrialización de productos naturales a través de alianzas entre las universidades, empresas, gobiernos e instituciones nacionales y extranjeras y emprender esfuerzos para lograr avances en la Investigación + Desarrollo a fin de detectar posibilidades de aplicarse con éxito a nivel comercial y cubrir nuevas demandas del mercado local, nacional e internacional con especies promisorias que atiendan las diferentes patologías, generando conocimiento del más alto nivel y dando lugar a una producción interna eficiente y competitiva, así como solución técnica a los problemas que pudieran suscitarse, en cualquier campo de la salud, de la alimentación y de la educación tecnológica, generando invenciones que pueden dar lugar a un producto o un procedimiento que cumplan con los requisitos de : a) Novedad, b) Nivel inventivo y c) aplicabilidad industrial.

Los métodos de cultivos de células y tejidos in Vitro, se emplean cada vez con mayor frecuencia en el estudio de compuestos, teniendo en cuenta el código de ética animal y con la finalidad de evaluar mecanismos de acción, aunque su valor es limitado.

Desde que se identificó el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) como el agente causal del SIDA (1,2), la búsqueda de tratamientos efectivos en la prevención y desarrollo de esta enfermedad han sido el principal objeto de estudio. Los productos naturales también han contribuido al descubrimiento de agentes anti-VIH-1 (3), mediante sondeos o screenings masivos biodirigidos. Como resultado

de dichos estudios, a la fecha se han logrado identificar más de 60 productos naturales anti-VIH (4) que no sólo proporcionan entidades químicas potencialmente útiles en el tratamiento del SIDA, sino que además constituyen moldes para el diseño de nuevos fármacos. A principios de 1997 y según datos del programa HIV/AIDS de Naciones Unidas, la cifra de personas afectadas en el Mundo por el Virus de Inmunodeficiencia humana o VIH era de 21.8 millones (de las cuales, 21 millones eran adultos y 830 000 eran niños). El VIH pertenece al grupo de los lentivirus o retrovirus citopáticos no transformantes y hasta el momento se han aislado dos subtipos capaces de provocar la enfermedad: VIH-1 y VIH-2. El VIH-2 está limitado fundamentalmente a Africa occidental y causa una mínima proporción de los casos de SIDA, por el contrario, el VIH-1 se encuentra diseminado mundialmente y es el agente causal de la mayoría de casos de SIDA, por lo que habitualmente se nombra como agente etiológico de la infección por VIH.

Los antirretrovíricos no son curativos, pues no erradican la infección, pero pueden disminuir la viremia y retrasar la depresión inmunitaria, para convertir la infección por VIH en una enfermedad crónica controlada para lo cual el tratamiento debería ser potente e iniciarse de forma precoz. La transcriptasa inversa o retrotranscriptasa es una enzima exclusiva de los retrovirus, por lo que su inhibición afecta solo el ciclo evolutivo del VIH y no al de la célula hospedera. Básicamente pueden diferenciarse dos grupos de medicamentos antirretrovíricos según el mecanismo de acción sobre el ciclo evolutivo del VIH, a) inhibidores de la transcriptasa inversa y b) inhibidores de la proteasa vírica.

Las estrategias científicas para la evaluación in vitro de productos naturales con actividad biológica han cambiado con el paso de los años, un desarrollo reciente es la investigación altamente automatizada de las pruebas biológicas basadas en métodos colorimétricos que cuantifican la proliferación de los cultivos celulares (5, 6).

Estas técnicas son consideradas rápidas y baratas para la evaluación antitumoral (7) y antiviral (8) de una gran cantidad de extractos de productos naturales, estos métodos permiten fácilmente dirigir el aislamiento y purificación de los principios activos (9). Diversos procesos moleculares en el ciclo viral han sido identificados como blanco de acción de posibles fármacos como: las enzimas transcriptasa reversa (TR), proteasa (PR) e integrasa (IN) (10), así como proteínas involucradas en la adhesión y fusión del virus (11). La TR es una enzima esencial en la replicación del VIH, ya que transcribe el material genético del virus constituido por una cadena sencilla de RNA en una cadena doble de DNA (12). El Nevirapine es conocido como Viramune, se presen-

ta en comprimidos de 200 mg, la dosis usual es 200 mg/día y es administrada por vía oral, es un inhibidor específico y no competitivo de la transcriptasa inversa del VIH-1. Se une directamente a la transcriptasa inversa vírica y bloquea la actividad ADN-polimerasa dependiente tanto del ARN como del ADN al alterar el sitio catalítico de la enzima. Después de su administración oral con o sin alimentos, se absorbe con rapidez (biodisponibilidad del 95%). Se une moderadamente a las proteínas plasmáticas (60%) y alcanza concentraciones plasmáticas máximas al cabo de 2-4 horas, con una semivida de 45h. Se metaboliza en el hígado a través del Citocromo P-450 y se elimina mayoritariamente por la orina (84%) en forma de metabolitos. Atraviesa la barrera hematoencefálica y la placenta y se excreta en la leche materna. Presenta erupción cutánea intensa como es el síndrome de Stevens-Johnson, siendo grave en algunos casos, presentando además estomatitis ulcerativa, cefalea, náuseas, vómitos, diarrea, somnolencia, fiebre, etc.

El cáncer es un conjunto de enfermedades en que las células dañadas genéticamente proliferan de forma autónoma. Estas células no pueden responder a los mecanismos reguladores normales para asegurar la cooperación intercelular que se requiere en los organismos multicelulares. Por consiguiente, continúan proliferando, y de esta forma robando a las células normales los nutrientes y finalmente invadiendo los tejidos sanos de los alrededores. Dependiendo del daño originado, las células anormales pueden formar tumores benignos o malignos. Los tumores benignos que son de crecimiento lento y limitado a una localización específica no se consideran cancerosos y en pocas ocasiones producen la muerte. Por el contrario los tumores malignos suelen ser fatales debido a que pueden experimentar metástasis (en la metástasis, las células cancerosas emigran a través de la sangre o vasos linfáticos a lugares distintos del cuerpo). Al surgir los nuevos tumores malignos, interfieren con las funciones normales. Cuando los procesos que mantienen la vida fallan los pacientes mueren.

El género *Calophyllum* es el más importante miembro de la familia Clusiaceae, (Guttiferae), está constituido por 187 especies, todas ellas árboles tropicales. La mayoría (179) se encuentran en el viejo mundo en especial en la zona Indo-Malasia con extensión hacia las islas Madagascar y Fiji. Se estima que solo 8 especies se distribuyen en el continente americano, desde México hasta las antillas y Centro América, Venezuela, Colombia, Perú, Bolivia, Brasil y las Guayanas. Este género se encuentra básicamente restringido a selvas húmedas, en tierras bajas, colinas y a veces en bosques de montaña, aunque algunas especies crecen en hábitats secos. De este género se han aislado otras moléculas, tales como las xantonas, las cuales han mostrado actividad cito-

tóxica, actividad antiviral VIH y antibacteriana por lo que estas moléculas también son candidatos potenciales para su evaluación como fármacos antineoplásicos y antibacterianos, además de constituir moldes para el diseño de nuevos fármacos, atribuyéndose dicha actividad citotóxica a que actúan como bloqueadores del ciclo celular en la fase G2/M. Los mecanismos de acción de las xantonas no se conocen sin embargo se sabe que inhiben la síntesis de DNA, RNA y proteínas y aumentan el índice mitótico en la metafase.

MÉTODOS

Las muestras de hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* de la zona de Satipo fueron proporcionadas por el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas Illary y la de Pucallpa por Pebani-Inversiones S.A, identificándose taxonómicamente; posteriormente fueron estabilizadas y se sometieron a una maceración a temperatura ambiente con Metanol Q.P a una concentración al 10% p/v por una semana, luego se filtraron y los extractos fueron concentrados al vacío en un rotavapor hasta la total eliminación del solvente, obteniéndose un residuo seco. El screening fitoquímico preliminar se realizó de acuerdo al Método descrito por Ciulei. Del extracto metanólico que presentó mejor actividad biológica se procedió a la separación de los principios activos por métodos convencionales de cromatografía en columna obteniéndose: CbHS5, CbHS16 y CbHS525354. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMNH1) y los espectros de carbono (RMN13 C) se obtuvieron en el Instituto de Química de la UNAM (MEXICO) y en el Departamento de Farmacia de la USAL (España), utilizando un espectrofotómetro NICOLET Impact 410 en KBr al 1% ó en película, expresando los valores de omax cm^{-1} . Asimismo los espectros de RMN ^1H se registraron en un espectrómetro BRUKER AC-200 (200 MHz), utilizando TMS como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y los de las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Los espectros RMN ^{13}C , se registraron en un espectrómetro BRUKER AC-200 (50,3 MHz), utilizando TMS como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm. Los espectros de Masas se realizaron en un cromatógrafo de Gases acoplado con un Espectrómetro de Masas HEWLETT PACKARD 5890 series II, con potencial de ionización de 70 eV. Los resultados se expresan como relación m/z, se utilizó una columna SPB-1 de dimetilsilicona de 12 metros de longitud, 0,2 mm de diámetro interno, con un espesor de pared de 0,33 μm , siendo las condiciones de experimentación las siguientes: una vez inyectada la muestra, el detector se mantuvo a 100°C durante 5 minutos y después se programó un gradiente de 5°C/minuto hasta alcanzar la temperatura máxima de 300°C, temperatura a la cual se

mantuvo durante 10 minutos. Se utilizó la Librería : Base de datos Wiley 275.

Evaluación de la actividad citotóxica en Artemia salina según Anderson, Meyer, Thompson (13). Se siguió el procedimiento siguiente:

Día 1: Se preparó agua de mar (3.8 g de sal de mar comercial en 100ml de agua destilada). Se filtró. Se colocaron aproximadamente 50 mg de huevos de Artemia salina en un Erlenmeyer con 350 ml de agua de mar. Se les colocó en un lugar con luz artificial o natural y con una bomba de oxígeno con burbujeo lento. **Día 2:** Se transfirieron la mayor cantidad de nauplios vivos a un Erlenmeyer con agua fresca. Se pesaron 20 mg de Calophyllum brasiliense. **Día 3:** Se disolvieron 20 mg de la muestra en 2 ml de disolvente, 0.5 ml de DMSO y 1.5 ml de agua destilada (lo que hizo un total de 2 mL). A partir de esta solución, se prepararon diluciones de 1000, 100 y 10 ppm transfiriendo a cada vial 500, 50, y 5 ul respectivamente. Siendo 3 viales por cada concentración (9 en total). Se hizo un control por muestra. Como la muestra fue apolar se le agregó al control 50ul de DMSO. Los nauplios estuvieron listos para el ensayo. A cada vial se le agregaron 10 nauplios (30 nauplios por dilución) y la dilución del extracto requerido. Luego, se agregó agua de mar hasta completar 5 mL por vial. A cada vial se le agregó además, una gota de suspensión de levadura (3 mg de levadura seca se disuelven en 5 mL de agua de mar como alimento). **Día 4:** Después de 24 horas, se contó y anotó el número de sobrevivientes en cada dilución. Se analizaron los datos con el programa de computadora Finney (DOS) para determinar valores CL50.

Evaluación de la actividad citotóxica de sustancias sobre la proliferación de células cancerosas de humano según el Método de la Sulforodamina B(14).

Se utilizaron los extractos metanólicos de las hojas y corteza de Calophyllum brasiliense y se hicieron los ensayos en placas de 96 pozos para determinar la viabilidad celular el cual es un ensayo colorimétrico que se leyó en un lector de ELISA a 515 nm (Fig 2). Se utilizó como controles positivos 5-Fluororacilo y adriamicina. Todos los compuestos fueron disueltos en DMSO, a una concentración máxima del 0.5% v/v. las pruebas se realizaron en 5 líneas celulares: U-251(Carcinoma del Sistema Nervioso Central), PC-3 (Carcinoma de próstata), K562 (Leucemia megaloblástica, linfoma), HCT-15 (Cáncer de colon) y MCF-7 (Cáncer de mama).

Día 1: Se tomaron las placas de crecimiento celular en el cual se observaron una confluencia de 70-80%. Se contaron las células par obtener una solución de 5×10^4 células/ml.

Se inocularon dos placas con 100 ul de la solución anterior de células (5×10^4 células/ml). Se incubaron 37°C en 4.5% de CO_2 .

Día 2: A las 24 horas se añadió 100 ul de medio a la placa denominada placa cero y después se fijaron con 50 ul de una solución de TCA (ácido tricloroacético) al 50% durante 1 hora a 4°C . Transcurrida la hora se lavaron con agua corriente de la llave 5 veces, se dejó secar a temperatura ambiente y se guardó en refrigeración. En la(s) placa experimental se añadió 100 ul de la(s) dilución(s) de la(s) substancia a probar y se incubó durante 48 horas.

Día 4: La placa experimental se fijó con 50 ul de una solución de TCA al 50% y se procedió igual que en la placa cero.

Día 5: Las placas cero y experimental se tiñeron con 100 ul de una solución de sulforrodamina B al 0.4% en ácido acético al 1% durante 30 min. Se lavaron con una solución al 1% de ácido acético 5 veces y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Día 6: Se adicionaron 100 ul de TRIS base (pH 10) y se agitó. Se midió la densidad óptica a 515 nm en un lector de placas. Y con los datos de densidad óptica se calcularon % de inhibición y/o IC50 con respecto al control. Para determinar el % de inhibición se aplicaron las siguientes fórmulas según fue el caso.

$$100 \times (T - T_0) / (C - T_0) \text{ cuando } T \text{ es igual o } > \text{ a } T_0 \\ \text{ó } 100 \times (T - T_0) / T_0 \text{ cuando } T \text{ es } < \text{ a } T_0$$

- C = Densidad óptica del control
- T = Densidad óptica del tratamiento
- T₀ = Densidad óptica de la placa cero

Evaluación de la actividad antimetabólica en el modelo de ciclo celular de Allium cepa según De la Torre (13)

Para ello se cogieron los bulbos seleccionados, con raíces de 2 a 3 cm de longitud, los cuales fueron mantenidos en agua aireada constantemente y en oscuridad a 20°C ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$); durante el lapso de 2, 4, 6 horas y fueron sumergidos en varias concentraciones de los extractos para evaluar el índice mitótico y el índice de fases (profase, metafase, anafase y telofase) de la población meristemática.

Evaluación de la actividad antiviral (15,16):

La actividad inhibitoria sobre la TR VIH-1 se realizó mediante el kit Lenti-RT (Cavidi-Tech), método propuesto por Shao et al. (1997). Dicho ensayo es inmunológico-

colorimétrico. Que consistió en determinar la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdUtp) a un molde de poliadenina (PolyA) cuya reacción fue catalizada por la adición de una transcriptasa reversa recombinante de VIH-1, así como una secuencia iniciadora o primer. La bromodesoxiuridina unida al molde fue reconocida por un anticuerpo monoclonal conjugado a fosfatasa alcalina. La adición del parantirofenilfosfato ocasionó que la fosfatasa hidrolizara el grupo fosfato a parantirofenil, provocando una reacción colorida que se leyó a 405 nm.

RESULTADOS

Se observó para el extracto metanólico de las hojas de Satipo un buen efecto citotóxico en el bioensayo en *Artemia salina* con una CL50 (Concentración Letal Media) = 70.5 ppm, con un límite superior e inferior al 95% de 136.50ppm y de 36.4ppm de acuerdo al método de Probits, observándose una inhibición sobre líneas celulares tumorales U251, PC-3, HCT15, MCF7 y K562 de 109.42%, 95.67%, 96.16%, 102.68% y 95.69% respectivamente con una $p < 0,01$. En la evaluación antimitótica en cebolla, al cabo de 6 horas de tratamiento el índice mitótico de las células meristemáticas decreció de un IM = 13 del control a un IM = 1.0 a la concentración de 0.5% a 25°C. La actividad antiviral sobre la Transcriptasa Reversa (RT) del HIV-1, realizada con el Kit Lenti RT (Cavidi Tech), presentó una CL50 de 70.2905 ug/ml con un límite superior e inferior al 95% de 138.89ug/ml y 35.5707ug/ml. Asimismo en el extracto se observó la presencia de: alcaloides, cumarinas, lactonas, triterpenos, entre otros, habiéndose aislado tres compuestos: de las fracciones 5 y 16 dos compuestos CBHS5, CbHS16 y de la fracción 52 se obtuvo el compuesto cristalino CbHS525354 de punto de fusión = 286°C; además de alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, entre otros. Los estudios de elucidación estructural por RMN¹H, RMN¹³C y Espectro de Masas de los componentes mayoritarios han demostrado la presencia de Betulina, agente antiinflamatorio y del Acido Betulínico, agente antitumoral y anti-VIH.

Al análisis cromatográfico utilizando Sephadex LH-20 y eluyendo con mezclas de hexano/AcOEt, se separaron 200 fracciones. Las fracciones 52-54 se reunieron y se cromatografiaron de nuevo sobre una placa de capa fina preparativa (hexano/AcOEt 8:2) aislándose una mezcla de dos sustancias: una de ellas mayoritaria que se identificó como Betulina, y la otra minoritaria como Acido betulínico, de acuerdo con los análisis cromatográficos y espectroscópicos que se muestran a continuación:

Análisis CG-MS

En la cromatografía de gases (Figura 1), se detectó un componente principal que aparecía a 47,53 min y cuyo es-

Gráfico Nº 1: Actividad antitumoral de *Calophyllum brasiliense*

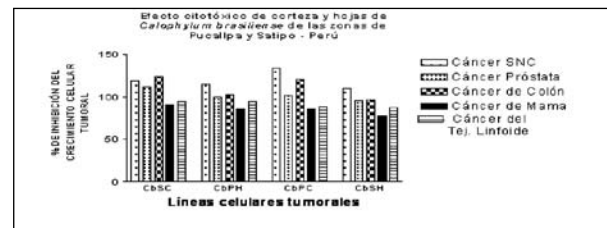
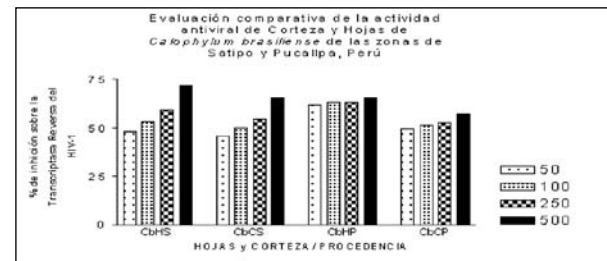
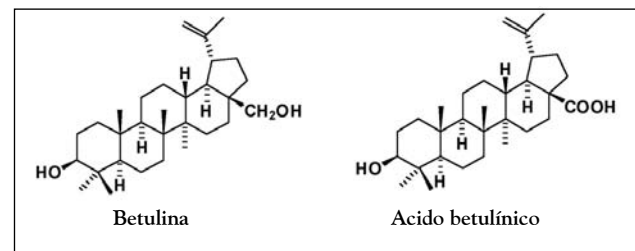


Gráfico Nº 2: Actividad anti-VIH de *Calophyllum brasiliense*



pectro de masas está registrado en la parte inferior de la figura 1. Aparecen otros compuestos muy minoritarios que no se investigaron.

La búsqueda automatizada en la librería de espectros de masas (Wiley 275) identificó el compuesto como **Betulina (betulol, betulinol)**, con una fiabilidad del 95% (se considera la identificación correcta), como puede apreciarse, salvando algunos cambios en las proporciones, son fundamentalmente iguales (Figura 2).



Espectro de Infrarrojo (IR)

En la Figura 3 se muestra el espectro de infrarrojo de la muestra que nos indica la presencia de absorciones correspondientes a grupo carboxilo (1687 cm^{-1}) o carbonilo, lo que hace pensar en la presencia de algún otro componente importante en la muestra que la betulina no lo tiene.

Espectros de RMN

RMN de ¹H (Figura 4)

Las dos parejas de señales agrupadas hacia 4,6 ppm, de grupos olefinicos ($=\text{CH}_2$), indicaron la existencia de dos compuestos similares en proporción 2:1 aproximadamente. Las señales de la ampliación, son debidas a la presencia de fun-

ciones alcohólicas: Los dobletes a 3,8 y 3,3 ppm son de un grupo CH₂OH. Las cuatro señales centradas hacia 3,2 ppm son de un grupo CHOH de la misma molécula.

El multiplete hacia 3,0 ppm también se asoció a un grupo CHOH, pero del otro componente minoritario. El modelo de señales en la región < 1 ppm y la que aparece hacia 1,6 ppm se asocian con el esqueleto de un triterpeno.

RMN de ¹³C (Figura 5)

El espectro de RMN de ¹³C no es bueno por la escasez de la muestra. Permitted distinguir las señales asociadas a la olefina (105 y 109 ppm), al hidroxilo (79 ppm) y los numerosos metilos y metilenos de los triterpenoides. Así mismo se observó la señal hacia 180 ppm, característica de grupo carboxilo.

Con todas estas informaciones y después de realizar una búsqueda bibliográfica-espectral orientada se determinó que la muestra contenía betulina y ácido betulínico.

DISCUSIÓN

Según Tan, G. T y col (17), para considerar los extractos activos contra el VIH-1, estos deben presentar un porcentaje de inhibición > 70% y con base a este criterio, la especie analizada cumplió con este requisito, a diferencia de los resultados obtenidos para los extractos de hojas (65.45%) y corteza obtenida de la zona de Pucallpa los cuales presentaron ligeras variaciones tal y como se observa en los resultados, mencionándose que la existencia de diferencias químicas en poblaciones de la misma especie, es interesante desde el punto de vista farmacológico como se ha observado en la presente investigación y de acuerdo a lo mencionado por Kusumoto (18), la selección de los extractos crudos de la planta en investigación, tiene el potencial de ser

Figura 2
Librería Willey 275

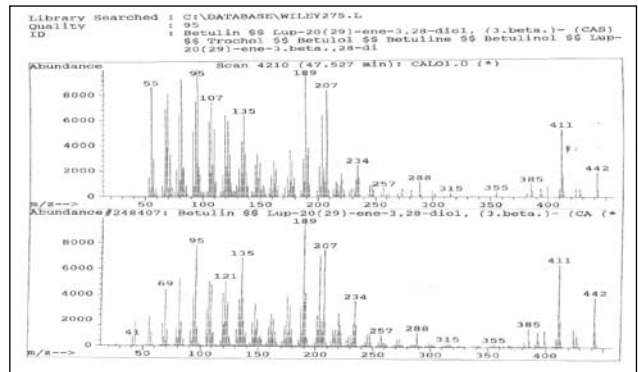


Figura 3
Espectro de IR (KBr)

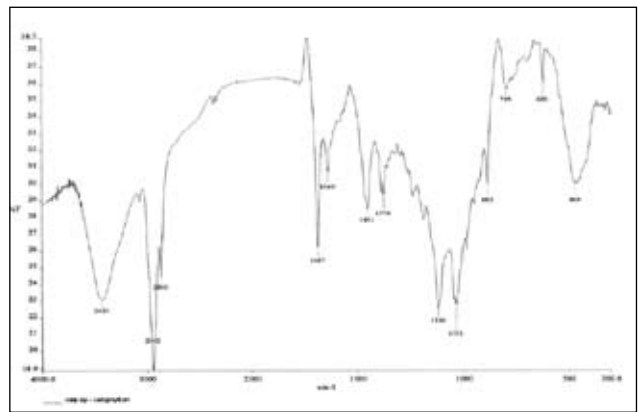


Figura 4
Espectro de ¹H RMN (CDCl₃)

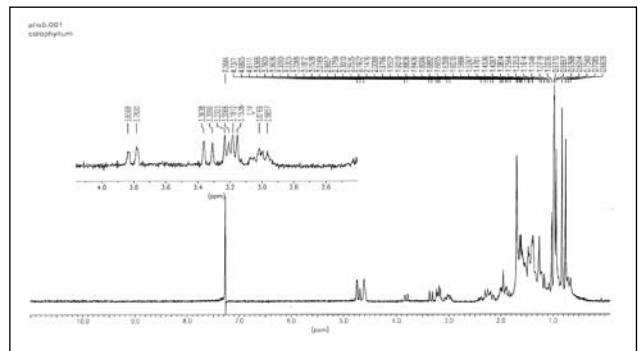


Figura 1
Espectro de CG/MS

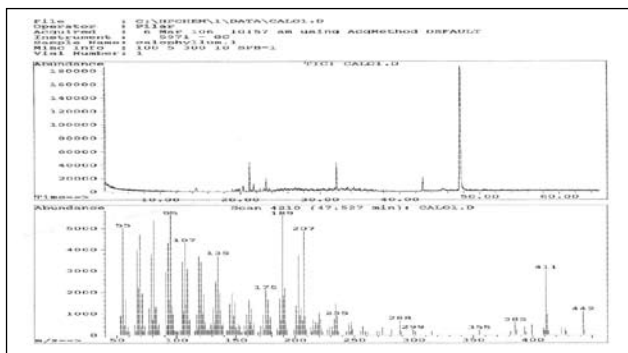
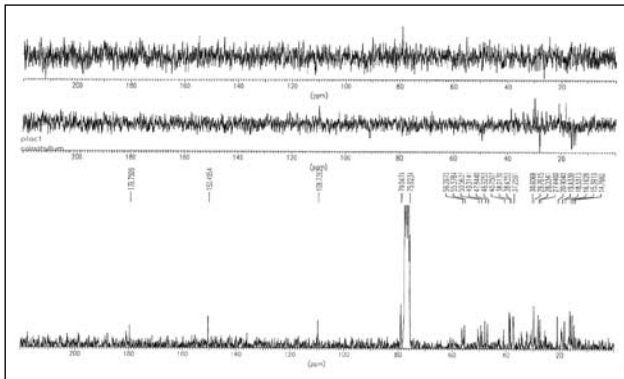


Figura 5
Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3)



más acertada en sus pasos iniciales, que la investigación de los compuestos puros aislados de productos naturales; considerando que la actividad de una droga no va a ser exactamente igual que la de su principio activo aislado y que los efectos de ciertas drogas o extractos se deben a la coexistencia de varios de sus constituyentes químicos que en su conjunto son responsables de su actividad, sugiriéndose que los extractos: acuoso, alcohólico e hidroalcohólico de las plantas utilizadas en Medicina Tradicional son fuentes potenciales de agentes antivirales y antitumorales (19). Por ello creemos que los compuestos mayoritarios Betulina y Acido Betulínico podrían estar implicados en la acción farmacológica antitumoral, antiinflamatoria y antiviral. Por ello podemos concluir que el extracto de *Calophyllum brasiliense* de la zona de Satipo presenta un buen efecto citotóxico, antitumoral, antimetabólico y antiviral sobre el virus del SIDA siendo indispensable proseguir con las pruebas farmacológicas pertinentes para garantizar la eficacia farmacológica preclínica y clínica en el sentido de utilizarlo como criterio de calidad en la terapia clínica.

Dra. Lucy Ibáñez Vásquez
Facultad de Medicina Humana de la USMP

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa y Mag. María T. Ramírez (UNAM-MEXICO), al Dr. Arturo San Feliciano M. y Dra Pilar Puebla Ibáñez (USAL-ESPAÑA), a los Drs Manuel Palomino Yamamoto, Pablo Bonilla Rivera (UNMSM) y Benjamín Castañeda C (USMP) y a todos aquellos que hicieron posible la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al.* Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired im-

mune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983, 220 (4599):868-71.

2. Gallo, R. C. *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984, 224: 500- 503.
3. Colegate, S. M. & R. J. Molyneux. Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination. CRC Press. 2000.
4. Vlietnick, A. J, De Bruyne T, Apers S, Pieters L.A. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. *Planta Med.* 1998; 64:97-109.
5. Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 1983, 65:55-63.
6. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth.*1986, 89: 271-277.
7. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research.* 1987, 47, 4, 936-942.
8. Weislow OW, Kiser R, Fine D.L, Bader J, Shoemaker R. H. Boyd M.R. New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *Journal of the National Cancer Institute*,1989, 81, 8, 577-586.
9. Cordell GA. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* .1995, 40, 6, 1585-1612(28).
10. Huang T. B. Antihuman immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sciences* 1997. 61(10):933-949.
11. Blair, W. S., Lin P.-F.; Meanwell N.A.; Wallace O. B. HIV-1 entry-an expanding portal for drug discovery. *Drug Discovery Today*, Mayo 2000, 5, 5,183-194(12).
12. Turner, B. G. & M. F.Summers. Structural Biology of HIV. *J Mol Biol* .1999, 285: 1-32.

13. CYTED-Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 1995. Manual de Técnicas de Investigación. Pag 61.-62 y Pag. 214-225.
14. Skehan. New Colorimetric cytotoxicity Assay for Anticancer- Drug Screening. JNCI 1990, 82(13): 1107-1112.
15. Simmons G. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. Science 1997, 276 (5310):276-9.
16. Shao X. A non-radioactive microtitre plate reverse transcriptase (RT) assay based on immobilised template for screening of RT inhibitors and evaluation of their mode of action. *Antiv. Chem. Chemother.* 1997, 8: 149-159.
17. Tan, G. T., J. M. Pezzuto & A. D. Kinghorn. Evaluation of Natural products as inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1). Reverse Transcriptase. *J Nat Prod* 1991, 54(1): 143-154.
18. Kusumoto IT, Nakabayashi T. Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease. *Phytotherapy Reseach* 1995, 9: 180-184.
19. Chung TH, Kim JC. Investigation of korean plant extracts for potencial phyto therapeutic agents against B-virus Hepatitis. *Phytotherapy Research* 1995, 9:429- 434.