

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.



Casa abierta al tiempo

**ANÁLISIS DE COMPUESTOS ACTIVOS EN EXTRACTOS
DE HOJA Y DE CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN
DE *Calophyllum brasiliense* CAMBESS Y EVALUACIÓN
DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A :

IBQ. DANIEL CISNEROS TORRES.

DIRECTOR:
DR. FRANCISCO CRUZ SOSA.

ASESORES:
DRA. MA. DEL PILAR NICASIO TORRES.
DR. ANTONIO BERNABÉ ANTONIO.

México, D.F. noviembre de 2015

México D.F. a 27 de noviembre de 2015.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

**Análisis de compuestos activos en extractos de hoja y de cultivo de células en
suspensión de *Calophyllum brasiliense* Cambess y evaluación de la actividad
antiinflamatoria.**

que presentó

I.B.Q. Daniel Cisneros Torres.

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesor: Dr. Antonio Bernabé Antonio

Asesor: Dra. María del Pilar Nicasio Torres

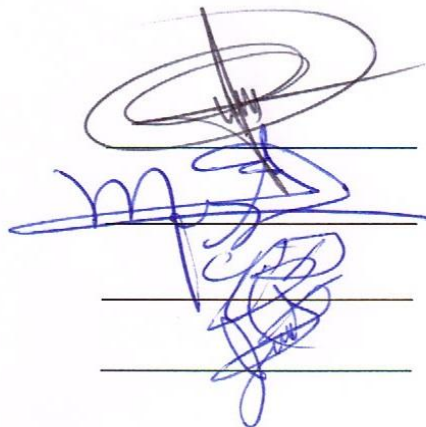
Jurado:

Presidente: Dr. Fernando Rivera Cabrera

Secretario: Dr. Manasés González Cortázar

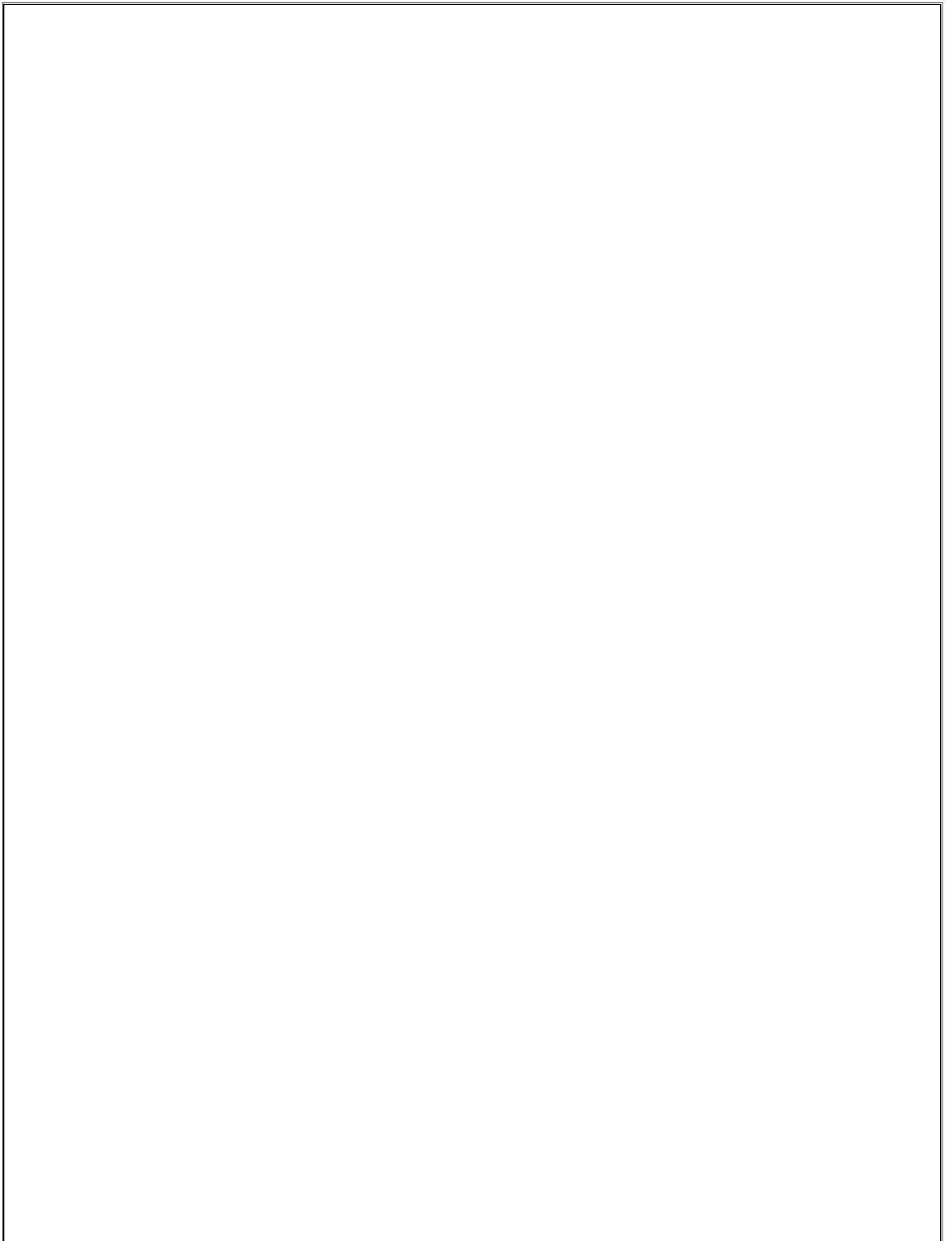
Vocal: Dr. Antonio Bernabé Antonio

Vocal: Dra. Juanita Pérez Hernández



La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia 001465.

Para la realización de los estudios de maestría el sustentante contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca 302000



CONTENIDO

	Página.
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Género <i>Calophyllum</i>	6
2.2 Descripción botánica de <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess	6
2.2.1 Clasificación taxonómica.	8
2.2.2 Sinonimias botánicas	8
2.2.3 Nombres populares	9
2.2.4 Distribución	9
2.2.5 Usos medicinales	9
2.2.6 Estudios farmacológicos y químicos	9
2.2.6.1 Actividad antiviral.	9
2.2.6.2 Actividad antimicrobiana y antituberculosa	12
2.2.6.3 Actividad anticancerígena	14
2.2.6.4 Actividad analgésica	16
2.2.6.5 Actividad antiulcerogénica y anti <i>Helicobacter pylori</i>	17
2.2.6.6 Actividad cicatrizante	18
2.2.6.7 Actividad moluscicida	19
2.2.6.8 Capacidad antioxidante	20
2.3 Estudios biotecnológicos de especies del género <i>Calophyllum</i> .	21
2.3.1 Estudios biotecnológicos de <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivos generales	29
5.2 Objetivos particulares	29
6. METODOLOGÍA.	30
6.1 Cultivos <i>in vitro</i> de <i>C. brasiliense</i>	30
6.1.1 Establecimiento de cultivos de callos	30
6.1.2 Establecimiento del cultivo de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i>	31
6.1.2.1 Cinéticas de crecimiento	31
6.1.2.2 Determinación de azúcares totales en el medio de cultivo de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> por el método del fenol-sulfúrico.	32
6.2 Análisis químico.	32
6.2.1 Obtención de extractos metanólicos de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i>	32
6.2.2 Obtención de extractos metanólicos de hojas de plántulas silvestres y aclimatadas de <i>C. brasiliense</i>	32
6.2.3 Determinación del contenido total de fenoles	33
6.2.4 Determinación del contenido de flavonoides	33

6.2.5 Determinación de la Capacidad antioxidante por el Método del DPPH.	34
6.2.6 Determinación de la Capacidad antioxidante por el Método del ABTS.	34
6.2.7 Aislamiento y purificación de ácido apetalico, canofilol y calanólidos de partes aéreas de <i>C. brasiliense</i> .	35
6.2.8 Extracción de biomasa de suspensiones celulares de <i>C. brasiliense</i> .	35
6.2.9 Identificación por HPLC de ácido apetalico, canofilol y (-)-calanólido B en el extracto diclorometánico de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> .	36
6.3 Evaluación de la actividad anti-inflamatoria.	37
6.3.1 Animales.	37
6.3.2 Modelo agudo de Edema auricular en ratones inducido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato).	38
6.4 Estadística.	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	39
7.1 Material vegetal.	39
7.2 Cultivo de callos.	40
7.3 Cultivo de células en suspensión.	40
7.3.1 Cinéticas de crecimiento.	42
7.3.2 Consumo de azúcares totales por los cultivos de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> .	45
7.4 Determinación de compuestos fenólicos en extractos metanólicos de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> .	45
7.5 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> con el radical DPPH.	47
7.6 Determinación de flavonoides totales en extractos metanólicos de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> .	48
7.7 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> con el radical ABTS.	49
7.8 Relación entre la producción de compuestos fenólicos y flavonoides con sus capacidades antioxidantes.	50
7.9 Aislamiento y purificación de ácido apetalico, canofilol y calanólidos del extracto acetónico de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	53
7.10 Cuantificación de ácido apetalico y calanólido B en el extracto diclorometánico de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> .	66
7.11 Actividad antiinflamatoria: Modelo de edema auricular inducido con TPA	71
8. CONCLUSIONES	76
9. PERSPECTIVAS.	78
10. BIBLIOGRAFÍA.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura 1. Árbol de <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.	7
Figura 2. Estructuras químicas del a) (+)-calanólido A, b) (-)-calanólido B, c) (+)-calanólido C, d) soulatrólido, e) ácido apetalico e f) isómero del ácido apetalico (ácido isoapetalico) aislados de las hojas de <i>C. brasiliense</i> .	10
Figura 3. Estructura química de la cumarina GUT-70 aislada de la corteza de <i>C. brasiliense</i> .	12
Figura 4. Estructuras químicas de dipirancumarinas aisladas de <i>C. brasiliense</i> con actividad antituberculosis. a) (-)-calanólido A; b) (-)-7,8-dihidrocalanólido B; c) 7,8-dihidrosoulatrólido.	13
Figura 5. a) Calofilólido y b) mammea B/BB aislados de las hojas de <i>C. brasiliense</i> .	15
Figura 6. Cumarinas con actividad citotóxica a) mammea A/BA; b) mammea A/BB; c) mammea B/BA; d) mammea B/BB; e) mammea R1: C/OA, R2: C/OB aisladas de las hojas de <i>C. brasiliense</i> .	16
Figura 7. a) Friedelina y b) 1,5-dihidroxixantona con actividad antinociceptiva aislados de la raíz de <i>C. brasiliense</i> .	17
Figura 8. Xantonas con actividad inhibitoria de la enzima H ⁺ K ⁺ ATPasa del duramen del tronco de <i>C. brasiliense</i> . a) 6-desoxijacareubina b) jacareubina c) 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona d) 1-hidroxi-3,5,6-tri-o-acetil-2(3,3-dimetilalil)-xantona.	18
Figura 9. Estructura química de la 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3,-dimetilalil)-xantona con capacidad antioxidante.	20
Figura 10. Planta de <i>C. brasiliense</i> (2 años) aclimatada a la Ciudad de México.	39
Figura 11. Frasco con explantes de hoja de planta aclimatada de <i>C. brasiliense</i> desarrollando callos al final de las 4 primeras semanas de cultivo n = 26. Medio MS con 3% sacarosa, 0.5% fructosa, 24.84 µM PIC, 8.88 µM BAP.	40
Figura 12. Frasco con explantes de hoja de planta aclimatada de <i>C. brasiliense</i> desarrollando callos al final de las 8 semanas de cultivo. n = 40. Medio MS con 3% sacarosa, 0.5% fructosa, 24.84 µM PIC, 8.88 µM BAP.	40
Figura 13. Matraz erlenmeyer con células de <i>C. brasiliense</i> obtenidas de callos de explantes de hoja de planta climatada. n = 10. Medio MS 3% sacarosa, 0.5 % fructosa, 24.84 µM PIC, 8.88 µM BAP.	41
Figura 14. Cinéticas de crecimiento del cultivo de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> a partir de inóculos del 6% (p/v).	43
Figura 15. Cinéticas de crecimiento celular y consumo de azúcares totales por los cultivos en suspensión de <i>C. brasiliense</i> .	45
Figura 16. Cinéticas de crecimiento celular y acumulación de compuestos	46

fenólicos en los cultivos en suspensión de *C. brasiliense*.

Figura 17. Cinéticas de producción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante expresada como TEAC en los cultivos en suspensión de <i>C. brasiliense</i> . Ensayo del DPPH.	47
Figura 18. Cinéticas de crecimiento celular y acumulación de flavonoides en los cultivos en suspensión de <i>C. brasiliense</i> .	48
Figura 19. Cinéticas de producción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante expresada como TEAC en los cultivos en suspensión de <i>C. brasiliense</i> . Ensayo del ABTS.	49
Figura 20. Capacidades antioxidantes en función de la producción de compuestos fenólicos en los cultivos en suspensión de <i>C. brasiliense</i> .	50
Figura 21. Capacidades antioxidantes en función de la producción de compuestos de tipo flavonoide en los cultivos en suspensión de <i>C. brasiliense</i> .	51
Figura 22. CCF de los extractos de hojas de <i>C. brasiliense</i> corrida en el sistema Hex-MeOH (7:3). A: acetónico; M: metanólico, H ₂ O: acuoso. β: estándar de β-sitosterol a) placa revelada con solución de sulfato cérico b) placa observada bajo luz UV de onda corta (254 nm) c) placa observada bajo luz UV de onda larga (365 nm).	53
Figura 23. CCF de los extractos de hojas de <i>C. brasiliense</i> . Sistema: diclorometano-MeOH (9:1). A: acetónico; M: metanólico, H ₂ O: acuoso. Q: estándar de quercetina; O: estándar de ácido oleanólico.	54
Figura 24. CCF de fase normal. Corrida hexano-acetato de etilo (7:3). R: extracto acetónico de referencia. SN: fracción 2 (hexano –AcOEt 8:2) solución madre. βs: β-sitosterol. 10: precipitado de la fracción 2 (hexano–AcOEt 80:20). Revelador: 4-hidroxibenzaldehído.	54
Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H, del compuesto 1 aislado de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	55
Figura 26. Espectro de RMN de ¹³ C, del compuesto 1 aislado de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	55
Figura 26A. Expansión del espectro de RMN de ¹³ C, del compuesto 1 aislado de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	56
Figura 27. Estructura química del canofilol (1) aislado de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	57
Figura 28. CCF de fase normal. Sistema: hexano-AcOEt (7:3). R: Referencia, unión de las fracciones 21-25 de C1; 11 a 15: fracciones eluidas con Hex-AcOEt 85:15. Revelador: 4-hidroxibenzaldehído.	58
Figura 29. CCF de reversa. Sistema: acetonitrilo-agua (95:5) a) placa revelada con 4-hidroxibenzaldehído. B) placa observada bajo luz UVλ=254 nm. R: referencia reunión de fracciones 31-32 C2; fracciones 1-3 eluidas con acetonitrilo-agua 95:5; fracciones 4-8 eluidas con acetonitrilo 100%.	58
Figura 30. Espectro de RMN de ¹ H, del compuesto (2) aislado de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	59

Figura 30A. Expansión del espectro de RMN de ^1H , del compuesto (2) aislado de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	60
Figura 31. Estructura química del ácido apetalico (2) aislado de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	61
Figura 32. CCF de fase reversa. Sistema acetonitrilo-agua 9:1. Fracción 7: acetonitrilo-agua 5:5; fracciones 8 a 13: acetonitrilo-agua 4:6; R: referencia F2C5. Revelador: 4-hidroxibenzaldehído.	62
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H , del compuesto aislado (3) aislado de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	62
Figura 34. Espectro de RMN de ^{13}C , del compuesto (3) aislado de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	63
Figura 34A. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C , del compuesto (3) aislado de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	63
Figura 34B. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C , del compuesto (3) aislado de hojas de <i>C. brasiliense</i> .	64
Figura 35. Cromatograma del extracto diclorometánico de la biomasa de <i>C. brasiliense</i> .	66
Figura 36. Cromatogramas y espectros de absorción del ácido apetalico (2) y del (-)-calanólido B (3) con trazas del (+)-calanólido A.	67
Figura 37. Cromatogramas comparativos del contenido de ácido apetalico (Tr = 19.52 min) y (-)-calanólido B (Tr = 22.13 min) en: a) extracto de diclorometano íntegro; b) fracción 1 (100%, CH_2Cl_2) y c) fracción 2 (CH_2Cl_2 -MeOH 9:1).	67
Figura 38. Cromatograma y espectro de absorción del (-)-calanólido B (3) obtenidos con el método 2.	68
Figura 39. Cromatogramas y espectros de absorción de los extractos diclorometánicos de la biomasa de <i>C. brasiliense</i> tratados con diclorometano y diclorometano-metanol 9:1. Método 2.	69
Figura 40. Cromatograma y espectro de absorción del canofilol (Tr = 16.16 min).	70
Figura 41. CCF de fase reversa. Sistema metanol-acetonitrilo 5:5. A: revelador 4-hidroxi-benzaldehído. B: placa observada a longitud UV de onda corta. D100: fracción 100% diclorometano; 9:1: fracción dicloro-metanol 9:1; U: referencia de ácido ursólico; β : referencia de β sitosterol; L: lavado 100% MeOH; A: ácido apetalico; C: canofilol.	70
Figura 42. Efecto de los extractos metanólico y acetónico de hojas de plantas silvestres de <i>C. brasiliense</i> sobre la formación del edema auricular inducido con TPA.	71
Figura 43. Inhibición del edema auricular inducido con TPA por efecto del extracto metanólico y acetónico de hojas de plantas silvestres de <i>C. brasiliense</i> .	72
Figura 44. Efecto del extracto diclorometánico de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> y de las fracciones de diclorometano (fracción 1) y diclorometano-metanol (9:1) (fracción 2), sobre la formación del edema	74

auricular inducido con TPA.

Figura 45. Inhibición del edema auricular inducido con TPA por efecto de las fracciones de diclorometano (fracción 1) y diclorometano-metanol (9:1) (fracción 2) del extracto diclorometánico de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> .	75
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

	Página.
Tabla 1. Constantes cinéticas del cultivo de células en suspensión de <i>C. brasiliense</i> determinados con base al peso seco de la biomasa celular.	44
Tabla 2. Comparación del contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidades antioxidantes de los extractos de hojas de plantas silvestre, aclimatada y de la suspensión celular de <i>C. brasiliense</i> .	52
Tabla 3. Valores de desplazamiento químico de ^{13}C para el canofilol (1). Comparativo con los datos experimentales obtenidos.	56
Tabla 4. Valores de desplazamiento químico de ^{13}C para el ácido apetalico (2). Comparativo con los datos experimentales obtenidos.	60
Tabla 5. Valores de desplazamiento químico de ^1H para los calanólidos A, B y C. Comparativo con los valores experimentales obtenidos.	64
Tabla 6. Valores de desplazamiento químico de ^{13}C para los calanólidos A, B y C. Comparativo con los valores experimentales obtenidos.	65

RESUMEN

Calophyllum brasiliense Cambess es una especie que se distribuye ampliamente en el continente americano desde México hasta Brasil. Es un árbol que crece en los bosques lluviosos tropicales, puede medir de 20 a 30 m de alto, cuya madera es utilizada para la elaboración de muebles principalmente. Los usos etnobotánicos que se le atribuyen son diversos, debido a que es una especie que produce gran cantidad de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas como son la anti-microbiana, enfermedades gastrointestinales, dolor, diabetes, curar llagas y para tratamiento de inflamaciones, reumatismo, varices, hemorroides y úlceras, entre otras. Dependiendo la región donde crece en forma natural se le conoce por diversos nombres como bari, leche María, Santa María, etcétera. Dos de las actividades más reconocidas en la especie son la antiviral (anti VIH-1) y la antitumoral, debidas principalmente a las dipiranocumarinas calanólidos y mammeas, respectivamente. Un reto al cual se enfrentan los investigadores es la obtención de estos metabolitos secundarios de manera sustentable para su aplicación como fitofármacos. Las estrategias van desde procedimientos silvícolas para lograr la cosecha sustentable de hojas hasta el cultivo *in vitro* de la especie.

En este trabajo, se planteó la producción de compuestos activos de *Calophyllum brasiliense* (ácido apétálico, canofilol y calanólidos) en cultivos de células en suspensión.

El establecimiento del cultivo de células en suspensión se realizó a partir de callos friables derivados de explantes de hoja de planta aclimatada a la Ciudad de México en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) complementado con 3% sacarosa, 0.5 % fructosa más 24.84 μM de picloram (PIC) y 8.88 μM de 6-bencilaminopurina (BAP), obteniendo una suspensión homogénea con agregados celulares café claro pequeños con presencia de células libres. Para este cultivo *in vitro* se determinó una cinética de crecimiento de 16 días con base al peso seco de la biomasa determinando una biomasa máxima de 15.17 g/L al 12° día de cultivo. Los parámetros cinéticos determinados fueron Índice de crecimiento (2.4), la velocidad específica de crecimiento ($\mu = 0.116 \text{ h}^{-1}$), el tiempo de duplicación (T_D

= 5.95 días) y el rendimiento de crecimiento de la biomasa con relación a la fuente de carbono ($Y_{x/s} = 0.433$ g biomasa/g fuente de carbono). Se realizaron también cinéticas de producción de compuestos fenólicos totales (FT) y de flavonoides totales (FVT), para ello, se obtuvieron los extractos metanólicos por sonicación de la biomasa muestreada en cada punto de la cinética las biomásas secas. Se determinó una producción máxima de FT de 57.26 mg AG/ g BS y de FVT de 271.75 mg Quer/ g BS a los 16 y 12 días de cultivo, respectivamente; la producción de ambos grupos de compuestos está parcialmente asociados al crecimiento. Conjuntamente, se realizó la determinación de las capacidades antioxidantes (CAO) de los extractos metanólicos. Las CAO ensayadas con los radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) aumentaron en correlación con la producción de compuestos fenólicos con una máxima actividad de 130.54 M Trolox/ g BS y 534.5323 mM Trolox/ g BS para el DPPH y ABTS, respectivamente. La correlación entre la producción de compuestos fenólicos con sus CAO fue del 95% en comparación con un 75% mostrada con los flavonoides, por lo que esta CAO se debe principalmente a la presencia de flavonoides pero también a otros compuestos fenólicos. Se realizó la comparación entre la producción de FT, FVT y sus respectivas CAO entre las tres fuentes de material vegetal usadas en este trabajo: hojas de planta silvestre, hojas de la planta aclimatada y de la suspensión celular. La suspensión produjo 1.76 veces más compuestos FT respecto a la planta silvestre y 5.85 veces más que la planta aclimatada; el mismo comportamiento se observó para la producción de FVT (1.72 y 4.64 veces respectivamente). Conjuntamente, la CAO de la suspensión celular fue 1.35 y 3.36 veces superior que la determinada para las plantas silvestre y aclimatada en el ensayo del DPPH; así como 3 veces mayor respecto a la planta silvestre y ≈ 9 respecto a la planta aclimatada en el ensayo del ABTS).

Con la finalidad de conocer qué compuestos activos de *C. brasiliense* son producidos en el cultivo de células en suspensión, se procedió a la purificación de canofilol, ácido apetalico y calanólidos B y A a partir de las hojas de plantas silvestres de *C. brasiliense*. La estructura de los compuestos se confirmó por

análisis espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C , cuyos valores de desplazamiento se compararon con los datos reportados en la literatura para dichos compuestos. Se identificó la presencia de ácido apetalico y canofilol en el extracto de diclorometano de los cultivos en suspensión pero no del (-)-calanólido B. El contenido de ácido apetalico en la biomasa (0.024 mg /g BS) de la suspensión celular fue menor al determinado en el extracto acetónico de hojas de planta silvestre de *C. brasiliense* (6.96 mg/g). El canofilol no pudo ser analizado debido a su baja solubilidad por lo que es necesario emplear otro método de HPLC para su análisis.

1. INTRODUCCIÓN

Cultivo de tejidos vegetales.

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CVT) es un conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas. El uso de estos sistemas biotecnológicos ofrece varias ventajas con respecto al método tradicional de obtención de metabolitos a partir de plantas cultivadas en el campo. Entre ellos se pueden citar los siguientes: independencia de las condiciones climáticas adversas y de los problemas de plagas y enfermedades, la posibilidad de mantener consistencia en la calidad de los productos deseados y amplias perspectivas para incrementar la productividad (Taticek *et al.*, 1991; Alferman y Paterson, 1995). El CVT tiene diversas aplicaciones en la biotecnología vegetal como la micropropagación, la generación de plantas libres de enfermedades y la conservación de germoplasma *in vitro*. (Pérez *et al.*, 1999).

Principios básicos del CVT.

El CVT se basa en tres principios básicos, de cuya comprensión y manipulación depende el éxito o fracaso de cualquier trabajo en este campo (Pérez *et al.*, 1999)

Los principios básicos son los siguientes:

1) Elección del explante. Se llama explante al órgano, tejido o segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo. Entre más joven y menos diferenciado sea un tejido, más fácil será su adaptación y respuesta al cultivo *in vitro*. El cultivo de un fragmento de tejido vegetal en condiciones artificiales significa el cese de sus relaciones con otros órganos, tejidos y células de la planta completa; las cuales deben de ser compensadas por el medio y las condiciones de cultivo.

2) Elección del medio y condiciones de cultivo. El medio de cultivo junto con el tipo de explante determina la respuesta que se obtendrá del mismo, por lo que su elección y adecuada formulación son fundamentales para el éxito del CTV. El medio de cultivo consiste en dos grupos de componentes. Los primeros son los esenciales, aquellos que satisfacen los requerimientos nutricionales básicos del tejido cultivado: incluye a los nutrientes minerales, la fuente de carbono y algunas vitaminas. El segundo grupo de compuestos son los llamados opcionales, los cuales determinan el tipo de respuesta que se obtendrá del tejido, y por tanto influyen en el establecimiento y respuesta de los cultivos *in vitro*. A este grupo pertenecen las fitohormonas o reguladores de crecimiento vegetal.

Reguladores del crecimiento vegetal:

- Promotores del crecimiento: auxinas (p.e. ácido 2,4 diclorofenoxiacético: 2,4-D), citocininas (p.e. 6-bencilaminopurina: BAP) y giberelinas (p.e. ácido giberélico).

- Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.

- Promotor de la maduración de los frutos y senescencia de las hojas: etileno.

Además es importante considerar las condiciones físicas como luz, fotoperiodo, temperatura y humedad; ya que contribuyen a la respuesta del explante.

3) Condiciones asépticas. Para que un cultivo de cualquier tejido vegetal prospere de la manera deseada, debe excluirse del mismo a cualquier tipo de organismo contaminante (Pérez *et al.*, 1999).

*Callo.

Es un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular,

presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido (Hurtado y Merino, 2001).

*Cultivo de células en suspensión.

Se le denomina cultivo de células en suspensión al cultivo *in vitro* de células vegetales aisladas o en pequeños agregados, distribuidas en un medio nutritivo líquido y en constante movimiento, las cuales presentan una alta tasa de división celular y una homogeneidad relativamente alta. El cultivo de células en suspensión puede iniciarse a partir de cualquier explante inoculado en medio líquido con agitación; sin embargo, hay una mayor probabilidad de éxito y rapidez en la obtención del cultivo si se parte de tejido calloso; por lo tanto, los cultivos de células en suspensión generalmente se inician transfiriendo fragmentos de tejido calloso a medio nutritivo líquido, y agitándolos para facilitar la dispersión celular y la oxigenación del medio. Los cultivos celulares se han utilizado como sistemas modelo para estudiar distintos procesos en la ciencia vegetal básica y aplicada. Además ofrecen sistemas adecuados para diferentes procesos, ya que nos permiten disponer de grandes poblaciones de células relativamente homogéneas creciendo en condiciones perfectamente controladas. Por otra parte, estas células son susceptibles de recibir de manera rápida y uniforme cualquier tipo de estímulo externo que se aplique y cuyo efecto se desee estudiar; asimismo, la falta de clorofilas y carotenos en la mayoría de las células vegetales obtenidas de un cultivo celular, es de gran utilidad para el aislamiento y purificación de enzimas de origen vegetal. La velocidad de crecimiento de un cultivo de células en suspensión depende de la densidad inicial del inóculo, de la cual dependerá la fase lag, y de la tasa de multiplicación del cultivo. Los dos últimos factores dependen del genotipo de las líneas celulares, del medio nutritivo y de las condiciones de incubación (Pérez *et al.*, 1999; Hurtado y Merino, 2001).

Inflamación

La inflamación se define como la respuesta local de los tejidos de mamíferos vivos al daño debido a cualquier agente, tales como bacterias, virus, hongos, parásitos o reacciones inmunes, traumas mecánicos, venenos orgánicos e inorgánicos, o cuerpos extraños. Es una reacción del cuerpo para prevenir el esparcimiento del agente dañino y remover las células y tejidos necrosados. La inflamación involucra dos procesos básicos: el primero es la respuesta inflamatoria temprana y el segundo la sanación. Los signos de inflamación incluyen enrojecimiento, calor, dolor, pérdida de función.

Existen dos tipos de inflamación: aguda y crónica. La primera es de corta duración y representa la respuesta temprana del cuerpo, se resuelve rápidamente y usualmente es seguida de sanación. La inflamación crónica se define como el proceso prolongado en el cual la destrucción del tejido y la inflamación ocurren al mismo tiempo (Harsh M. 2005, citado por Mitul Patel *et al.*, 2012).

Modelo agudo de edema auricular en ratones inducido con TPA

Fue descrito por De Young *et al.*, 1989 y modificado por Payá *et al.*, 1993. El TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) tiene propiedades irritantes, pro-inflamatorias y promotoras de tumores. Su aplicación desencadena todos los eventos propios del proceso inflamatorio: vasodilatación, eritema, extravasación y edema (Gómez *et al.* 2011, citado por Murakawa *et al.*, 2006). El edema está asociado con un incremento de eicosanoides como prostaglandinas (PGE₂) y leucotrienos (LTB₄), además induce la expresión de otros mediadores inflamatorios como las citosinas (Murakawa *et al.*, 2006).

El éster de forbol TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) es un compuesto activo componente del aceite de crotón (*Croton tiglium* L.) que tiene propiedades irritantes que induce la inflamación de la piel y respuestas hiperproliferativas en animales, que en muchos aspectos recuerda los signos de enfermedades tales como la psoriasis. (Gábor, 2005).

Cuando el TPA (1 µg en acetona) se aplica con ayuda de una pipeta automática en la oreja de un ratón, ocurre la vasodilatación de la piel y el eritema en 1-2 horas hasta 3-4 horas, la oreja comienza a adelgazarse como resultado de la trasvasación de líquidos y el edema alcanza un máximo a las 6 horas, menguando después cerca de los niveles del control a las 24 horas (Young *et al.*, 1983; Yound y De Young, 1989).

Se ha demostrado que la aplicación de una sola o de múltiples aplicaciones de TPA en la oreja de un ratón, induce respuestas inflamatorias prolongadas, caracterizadas por el incremento del peso de la oreja, hiperplasia epidérmica e infiltración de neutrófilos (Nakadate, 1989). Los esteroides aplicados tópicamente (dipropionato de betametasona, hidoxicortisona 17-valerato) reducen significativamente el peso del edema, el contenido de mieloperoxidasa y la delgadez epidérmica.

Según Stanley *et al.* (1991) este modelo crónico de inflamación de la piel puede ser más relevante para la evaluación de compuestos antiinflamatorios que el modelo agudo de TPA, debido a que los compuestos probados son aplicados después de que se produce la lesión inflamatoria, que reflejan el uso clínico de drogas antiinflamatorias. Además este modelo puede ser más selectivo que el modelo agudo de TPA para compuestos que afectan la producción de leucotrienos, ya que otros agentes farmacológicos que son activos en el modelo agudo no lo son en el modelo de aplicación múltiple (Stanley *et al.*, 1991).

El TPA es capaz de activar la proteína kinasa C (PKC), que activa otras enzimas en turno en cascada tales como mitógeno activado por PKC (MAPK) y fosfolipasa A2 (PLA2), que conduce a la liberación del factor de activación de plaquetas y AA. Esta cascada de eventos estimula la permeación vascular, la migración de leucocitos polimorfonucleares, liberación de histamina, serotonina, y síntesis moderada de eicosanoides por las enzimas ciclooxigenasa (COX) y 5-lipooxigenasa (5-LOX). Los inhibidores de COX y 5-LOX leucotrieno B4 (LTB4) antagonistas y corticoesteroides muestran actividad antiinflamatoria tópica en modelos animales con inflamación de la piel inducida con TPA o aceite de crotón. (Mitul Patel *et al.*, 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1 Género *Calophyllum*

El género *Calophyllum* comprende cerca de 180 especies, principalmente árboles, distribuidos en las zonas tropicales del planeta (Stevens, 1980). Estudios fitoquímicos previos han revelado que son una fuente rica en compuestos de interés farmacológico (Mesía-Vela *et al.*, 2001). Por ejemplo, *Calophyllum inophyllum* produce neoflavonoides inhibidores de la transcriptasa reversa del HIV-1 (Patil *et al.*, 1993; Spino *et al.*, 1998) y con actividad antitumoral (Itoigawa *et al.*, 2001); *C. moonii* y *C. teysmannii* var. *inophylloide* producen compuestos con actividad citotóxica contra ciertas líneas celulares (Bandara, 1986; Cao, 1998). *Calophyllum brasiliense* Cambess produce diversos tipos de metabolitos secundarios como xantonas, coumarinas, biflavonoides (como la amentoflavona), saponinas, triterpenos (friedelina, canofilol) y ácidos libres (ácido shiquímico) (Reyes-Chilpa *et al.*, 1997, 2004).

La presencia de dipiranocumarinas en el extracto hexánico son capaces de inhibir la actividad de la transcriptasa reversa (TR) tales como los calanólidos A y B aislados de *C. lanigerum* var. *austrocoriaceum* en 1992, los inophyllums B y P aislados de *C. inophyllum* y el soulatrólido aislado también de *C. inophyllum* y *C. teysmannii*, y (Huerta-Reyes *et al.*, 2004; Pawar *et al.*, 2007).

2.2 Descripción botánica de *Calophyllum brasiliense* (Cambess)

Es un árbol perennifolio, dioico, de 20 a 30 m de alto, pudiendo llegar hasta los 50 m y un diámetro de 40 a 60 cm. Su copa se caracteriza por ser redondeada, extendida y densa. Presenta un tronco cilíndrico y recto con una corteza fisurada color pardo del lado externo, y por el lado interno de color crema rosado; es laminada, fibrosa, amarga con exudado intensamente amarillo. Sus hojas son verde oscuras, brillantes en el haz, verde pálidas en el envés, decusadas, simples; láminas de 6 x 2.5 a 14 x 5.5 cm, elípticas u oblongas. Tienen nervadura central

prominente en el envés; nervios secundarios perpendiculares al central, numerosos y cercanos unos de otros. Sus flores son dioicas y pueden encontrarse flores masculinas y bisexuales en el mismo árbol, las flores femeninas presentan el perianto semejante a las masculinas. Las flores se encuentran en panículas auxiliares de 2 a 5 cm de largo, glabras; son blancas, ligeramente perfumadas, actinomorfas, con pétalos de color crema amarillentos, redondos y cóncavos; estambres numerosos, y ovario súpero hinchado, estilo corto, estigma grande y obtuso, florece de julio a diciembre. Sus frutos son drupas de 2.5 a 3 cm de largo, de forma ovoide o esférica, verde amarillentos en la madurez y olor fragante, con endocarpio duro y semilla grande por fruto, esféricas, de 1.5 x 1.3 cm de color blanco amarillentas sin endospermo. Las fibras del mesocarpio se contraen y arrugan cuando se secan (Niembro, 1986; Vozzo, 2003; CONABIO, 2005).



Figura 1. Árbol de *Calophyllum brasiliense* Cambess. Fuente: Antonio Bernabé-Antonio: bernabe_aa@hotmail.com.

2.2.1 Clasificación taxonómica.

Cronquist (1981) clasificó a *Calophyllum brasiliense* de la siguiente manera:

- ◆ Reino: *Plantae*
- ◆ Subreino: *Tracheobionta*
- ◆ División: *Magnoliophyta*
- ◆ Clase: *Magnoliopsida*
- ◆ Subclase: *Dilleniidae*
- ◆ Orden: *Theales*
- ◆ Familia: *Clusiaceae*
- ◆ Género: *Calophyllum*
- ◆ Especie: *Calophyllum brasiliense*.

Hoy en día el Missouri Botanical Garden (<http://www.tropicos.org>, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>) indica la clasificación taxonómica como sigue:

- ◆ Clase: *Equisetopsida* C. Agardh
- ◆ Subclase: *Magnoliidae* Novák ex Takht.
- ◆ Superorden: *Rosanae* Takht.
- ◆ Orden: *Malpighiales* Juss. ex Bercht. & J. Presl.
- ◆ Familia: *Calophyllaceae* J. Agardh
- ◆ Género: *Calophyllum* L.
- ◆ Especie: *Calophyllum brasiliense* Cambess.

2.2.2 Sinonimias botánicas

Las sinonimias descritas por la CONABIO (2005) son: *Calophyllum antillanum* Britton; *Calophyllum brasiliense* var. *antillanum* (Britton) Standl; *Calophyllum brasiliense* var. *rekoi* Standl.; *Calophyllum calaba* Jacq.; *Calophyllum jacquinii* Fawc. & Rendle.; *Calophyllum lucidum* Benth.; *Calophyllum piaroanum* Anibal Castillo & Celia Gil.; *Callophylum chiapense* Standl.

2.2.3 Nombres populares

En nuestro país, dependiendo de la región donde se encuentre se le conoce como Guaya, Barillo, Cedro cimarrón, Ocú, Palo María, Barí, Leche amarilla, Santa María, Sacbalamté, Leche María (CONABIO, 2005).

2.2.4 Distribución

Calophyllum brasiliense es la especie con mayor distribución e importancia medicinal en América, se localiza desde Brasil hasta México. En nuestro país es la única representante de su género, se encuentra en la vertiente del Golfo de México y en la vertiente del Pacífico (Stevens, 1980).

2.2.5 Usos en la medicina tradicional

Se tiene reporte del uso de las hojas y corteza de *C. brasiliense* en la medicina tradicional para tratar enfermedades como dolor, infecciones, el asma y como laxantes (Oliveira, 1994). También se han usado para tratar la bronquitis, disturbios gástricos y hepáticos (Sartori et al. 1999), reumatismo, varices, hemorroides, úlceras crónicas (Correa, 1978), diarrea y herpes (Rutter, 1990), así como diabetes e hipertensión (Duke y Martínez 1994). En algunas comunidades rurales en México se extrae el aceite de las semillas y se usa para curar enfermedades cutáneas. La resina que mana del tronco se conoce como bálsamo de María y se le atribuyen propiedades medicinales para disminuir la comezón en la piel, cicatrizar úlceras, diuréticas, inflamación de ojos e insolación (Niembro, 1986; Dweck y Meadowsy, 2002).

2.2.6 Estudios fitoquímicos y farmacológicos

2.2.6.1 Actividad antiviral.

Algunos trabajos han reportado la actividad antiviral en *Calophyllum brasiliense*. Huerta-Reyes *et al.* (2004) demostraron que los extractos orgánicos de las hojas de la planta silvestre de Los Tuxtlas, Veracruz tienen actividad contra la

transcriptasa reversa (TR) del virus del VIH-1. Los extractos hexánico, acetónico y metanólico obtenidos se probaron primeramente en un ensayo *in vitro* inmunocolorimétrico no radioactivo de inhibición de la TR del VIH-1, logrando inhibir la actividad de la enzima en un 77.9%, 81.3% y 83.3%, respectivamente. También se evaluó la citotoxicidad de estos extractos en líneas celulares de linfocitos sanos MT2, observándose que sólo los extractos hexánico y metanólico no presentaron citotoxicidad; dichos extractos se probaron en el ensayo de inhibición de la replicación del VIH-1 en la línea celular IIIb/LAV, donde sólo el extracto hexánico logró inhibir la replicación del virus en un 74.5%, mientras que el metanólico en un 52%. Mediante un estudio biodirigido y siguiendo el mismo esquema de evaluación, del extracto hexánico se aislaron e identificaron los calanólidos A y B, los cuales presentaron el mayor porcentaje de inhibición de la TR del VIH-1 (81.5 y 76.2 %, respectivamente), seguidos del soulatrólido (77.7%). El (+)-calanólido C sólo tuvo 50.7% de actividad y los ácidos apetalico e isoapetalico puros no fueron activos (Figura 2). Los valores de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) reportados fueron de 0.34 µM para el (+)-calanólido A, 0.5 µM (-)-calanólido B y 0.66 µM para el soulatrólido.

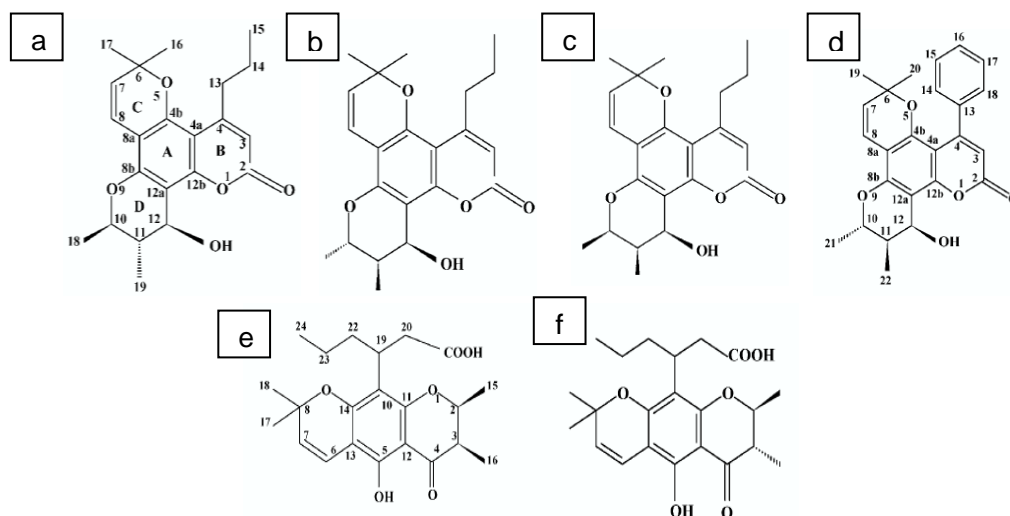


Figura 2. Estructuras químicas de compuestos aislados de las hojas de *C. brasiliense*. a) (+)-calanólido A, b) (-)-calanólido B (aislado en este trabajo), c) (+)-

calanólido C, d) soulatrólido, e) ácido apetalico e f) isómero del ácido apetalico (ácido isoapetalico) aislados. Fuente: Huerta-Reyes *et al.* (2004).

En otra colecta de *C. brasiliense* realizada en la región del Soconusco, Chiapas, también se encontraron el ácido apetalico y los calanólidos B y C en los extractos de hojas, indicando que a pesar de ser la misma especie existen diferencias en su composición químicas (García-Zebadúa *et al.*, 2011). Los extractos hexánicos de las hojas fueron probadas en el ensayo *in vitro* de inhibición de la TR del VIH-1 y la citotoxicidad en líneas celulares de linfocitos humanos MT2 sanos y su toxicidad (DL₅₀) en pruebas *ex vitro* usando ratones. El extracto hexánico demostró la inhibición de la TR *in vitro* (IC₅₀= 20.2 µg/mL) y no resultó tóxico para los ratones (DL₅₀= 1.99 g/ Kg). Además, el estudio histológico de los ratones tratados con la mayor dosis no reveló alteración de los hepatocitos e incluso hubo un aumento en el número de los megacariocitos del bazo (García-Zebadúa *et al.*, 2011).

Estudios más recientes de Matsuda *et al.* (2015) demostraron que la cumarina tricíclica 5-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metil-1-oxo-2-butenil)-10-propil-2H, 8H-benzo [2-b;3,4-b]-dipiran-8-ona (C₂₃H₂₆O₅), también conocida como GUT-70 (Figura 4), aislada de la corteza de *C. brasiliense* estabiliza la fluidez de la membrana plasmática de las células T hospederas. Este mecanismo es de suma importancia ya que la unión de las células T al virus del VIH-1 es el paso inicial para que comience la infección y la fluidez de la membrana plasmática y promueve la infectividad. Se demostró también que la GUT-70 regula la expresión por una cascada de regulación de los genes CD4, CCR5 y CXCR4. La GUT-70 también muestra efecto inhibitorio de la replicación del virus mediante la inhibición de NK-kB. (Matsuda *et al.*, 2015).

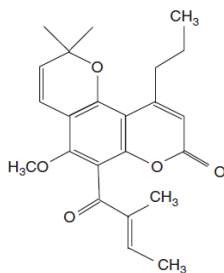


Figura 3. Estructura química de la cumarina GUT-70 aislada de la corteza de *C. brasiliense*. Fuente: Matsuda *et al.* 2015.

2.2.6.2 Actividad antimicrobiana y antituberculosa.

Otros metabolitos secundarios aislados de *C. brasiliense* como las cumarinas, xantonas y triterpenos se han evaluado para determinar su actividad antimicrobiana. Por ejemplo, la mammea A/BA (Figura 6a) y la friedelina (Figura 7a) purificadas del extracto hexánico de las hojas, las xantonas como la jacareubina (Figura 8b), la 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3,-dimetilalil)-xantona (Figura 10) y la 6-desoxijacareubina (Figura 8a) obtenidas del extracto acetónico del duramen de la corteza de *C. brasiliense* inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* C600 y *Staphylococcus aureus* 209P. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) más altas contra *E. coli* C600 fueron de >512 µg/mL para la friedelina y la 6-desoxijacareubina, >256 µg/mL para la mammea A/BA y 128 µg/mL para la jacareubina y la 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3,-dimetilalil)-xantona. Para *S. aureus* 209P, la CMI fue de 1 µg/mL para la mammea A/BA y la 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3,-dimetilalil)-xantona, 8 µg/mL para la jacareubina y >256 µg/mL y >512 µg/mL para la 6-desoxijacareubina y la friedelina, respectivamente (Yasunaka *et al.*, 2005).

De la misma manera, las mammeas A/BB y B/BB (Figuras 6b y 6d) aisladas de los extractos de diclorometano de hojas fueron evaluados para inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv junto con los extractos acuoso y de diclorometano, siendo las CMI de 76.85 y 83.87 µM respectivamente para las

mammeas, y 125 y 62.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, para los extractos acuoso y de diclorometano respectivamente. Además de la cepa H37Rv, se evaluó la actividad de los extractos y de los compuestos puros con cepas aisladas de hospitales, tanto sensibles como resistentes a antibióticos, encontrando que la mammeas tuvieron actividad con valores de CMI entre 76.85 μM y 153.94 μM (A/BB) y 83.87 μM y 168.01 μM (B/BB). En los ensayos de citotoxicidad con macrófagos, el extracto de diclorometano y las mammeas purificadas mostraron valores de índice de selectividad ente 0.59 -1.06 (Pires *et al.*, 2014).

Otro compuesto que ha demostrado actividad contra *M. tuberculosis* es el (+)-calanólido A (Figura 2a) que ha sido probado contra diversas cepas de *Mycobacterium* como la H37Rv demostrando un porcentaje de inhibición mayor al 96% a una concentración de 12.5 $\mu\text{g/mL}$, con una CMI 3.13 $\mu\text{g/mL}$ y una IC_{50} = 7.6 $\mu\text{g/mL}$. Otras dipiranocoumarinas como el (-)-calanólido B, el soulatrólido, (Figuras 2b y 2d), el (-)-calanólido A, (-)-7,8-dihidrocalanólido B y el 7,8-dihidrosoulatrólido (Figura 4) fueron activas contra *M. tuberculosis* con valores en el mismo nivel que el (+)-calanólido A (Xu *et al.*, 2004).

Al ser evaluado el (+)-calanólido A contra cepas de *M. tuberculosis* resistentes a antibióticos como la estreptomycin y el rifampin, tuvo actividad a una CMI de 8–16 $\mu\text{g/mL}$, siendo importante mencionar que no perdió actividad contra estas cepas tales como la H37Ra, CSU 19 y CSU 33, 36 y 38; H37 Rv-INH-R y H37 Rv-EMB-R (Xu *et al.*, 2004).

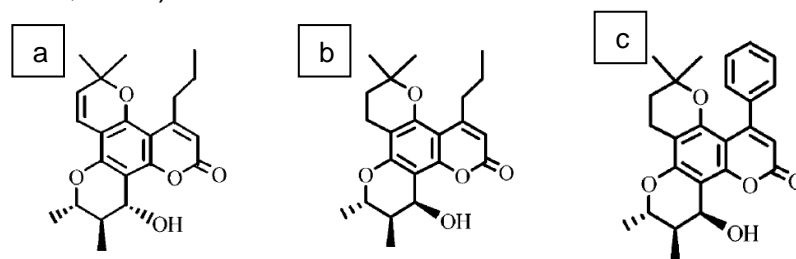


Figura 4. Estructuras químicas de dipiranocoumarinas aisladas de *C. brasiliense* con actividad antituberculosis. a) (-)-calanólido A; b) (-)-7,8-dihidrocalanólido B; c) 7,8-dihidrosoulatrólido. Fuente: Xu *et al.*, 2004.

2.2.6.3 Actividad anticancerígena.

Algunas pruebas anticancerígenas con extractos de *C. brasiliense* también han sido evaluadas. La cumarina tricíclica 5-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metil-1-oxo-2-butenil)-10-propil-2H,8H-benzo-[1,2-b;3,4-b']-dipiran-8-ona ($C_{23}H_{26}O_5$), también conocida como GUT-70 (Figura 3), aislada de la corteza de *C. brasiliense* inhibió significativamente el crecimiento de las líneas celulares de leucemia BV173, K562, NALM6, HL60 y SEM, y la línea celular de adenocarcinoma colonrectal HCT116 probadas por Kimura *et al.* (2005), en una concentración tiempo-dependiente con valores de IC_{50} de 2 a 5 μM . Además, ésta cumarina no inhibió la formación de colonias celulares de progenitores hematopoyéticos, ni la proliferación de hepatocitos humanos normales, ambos a concentraciones mayores de 30 μM . La GUT -70 activa las enzimas caspasas 2, 3, 8 y 9 e induce la apoptosis en las líneas celulares de leucemia, dicha apoptosis estaba inhibida debido a inhibidores de las caspasas. Además, la GUT-70 indujo efectos antileucémicos independientes de la vía de p53-p21WAF1/CIP1 y aumentó la expresión de p27KIP1 y p57KIP2, para detener el ciclo celular y la transición G1/S. Estudios más recientes han demostrado que la cumarina GUT-70 inhibe la proiliferación de células del linfoma del manto (MCL) mediante la inhibición de Hsp90, además de presentar actividad proapoptótica (Jin *et al.*, 2011).

De los extractos hexánicos de hojas de *C. brasiliense* colectadas en Los Tuxtlas también se aislaron cumarinas del tipo mammea A/BA y A/BB, las cuales han mostrado citotoxicidad contra la línea de leucemia K562. (Gómez-Verjan *et al.*, 2014). La citotoxicidad de la mezcla de coumarinas A/BA y A/BB (3:1) se evaluó mediante el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio y la muerte celular se evaluó con el ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), además de inmunofluorescencia de la caspasa activa 3 obteniendo una $IC_{50} = 43.5 \mu M$. Estas mammeas también han sido reportadas con actividad citotóxica significativa contra las líneas cancerígenas

PC3 (Adenocarcinoma de próstata humano) y U251 (glioblastoma neuronal humano) (Gómez-Verjan *et al.*, 2014).

El calofilólido y la mammea B/BB (Figura 5) también aislados de *C. brasiliense* demostraron ser citotóxicas contra células leucémicas de la línea HL-60, observándose que la condensación de cromatina y la fragmentación del núcleo aumentaba conforme el tiempo en células apoptóticas. Además, estos dos compuestos indujeron dicha apoptosis mediante la activación de la ruta de la caspasa-9/caspasa-3 que se desencadena por la disfunción mitocondrial (Ito *et al.*, 2006).

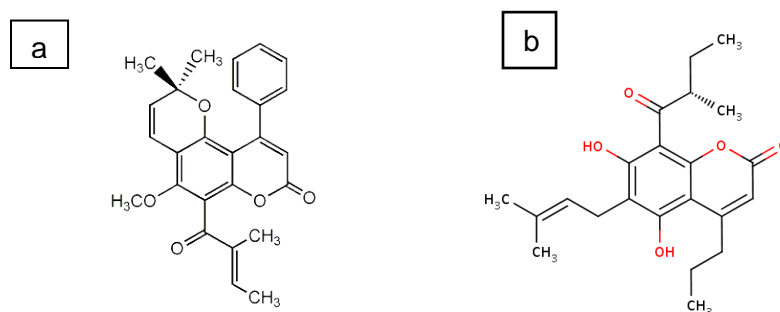


Figura 5. a) Calofilólido y b) mammea B/BB aislados de las hojas de *C. brasiliense*. Fuente: Ito *et al.*, 2006.

Como se ha mencionado, las coumarinas, principalmente del tipo mammea, han demostrado tener actividad anticancerígena. De acuerdo a Reyes-Chilpa *et al.* (2004) una serie de metabolitos secundarios aislados de las hojas de *C. brasiliense* recolectadas en la región de Santa Martha, Estado de Veracruz, México, poseen actividad significativa contra líneas de cáncer: K562 (linfoma), U251 (cáncer de la médula espinal) y PC3 (cáncer prostático). Los compuestos más activos fueron las mezclas de las mammea A/BB + mammea B/BA y mammea C/OA +mammea C/OB, aisladas del extracto hexánico de las hojas de la planta, con una actividad inhibitoria en un 88 a 100%; el triterpeno friedelina obtenido del mismo extracto, logró inhibir en un 61.9% la línea celular de PC3. La mezcla de mammeas mammea B/BA ciclo F y B/BB ciclo F, además de la isommameigina, aisladas del extracto acetónico de las hojas, sólo inhibieron el

crecimiento tumoral de 38 a 69%. Los valores de IC_{50} calculados para los compuestos puros y las mezclas más activas fueron de 0.04 a 0.59 μM para la mammea A/BA; $\leq 4.05 \mu M$ para las mezclas mammea A/BA + A/BB, mammeas B/BA + B/BB, mammeas C/OA + C/OB (Figura 6).

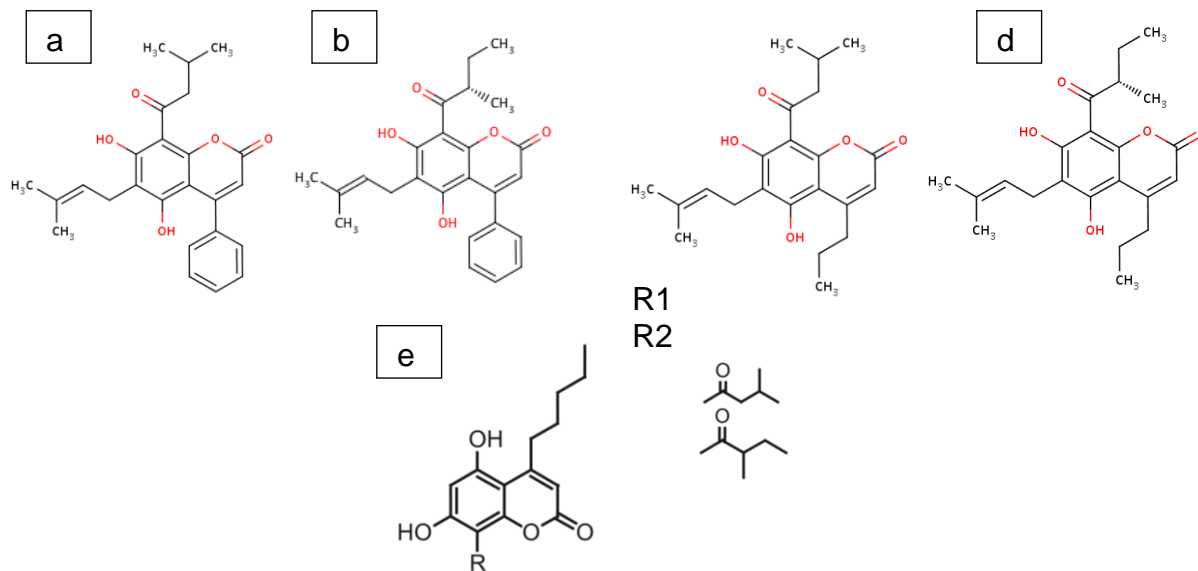


Figura 6. Cumarinas con actividad citotóxica a) mammea A/BA; b) mammea A/BB; c) mammea B/BA; d) mammea B/BB; e) mammea R1: C/OA, R2: C/OB aisladas de las hojas de *C. brasiliense*. Fuente: Reyes-Chilpa *et al.*, 2004.

2.2.6.4 Actividad analgésica.

Los extractos orgánicos de *C. brasiliense* han sido probados en modelos de dolor para determinar su actividad antinociceptiva (Isaías *et al.*, 2004). Éste mismo autor comparó el efecto del extracto metanólico de las raíces y la fracción diclorometánica en la prueba de dolor inducida con formalina, ambos extractos sólo presentaron actividad en $87.0 \pm 3.5 \%$ y $76.0 \pm 8.0\%$ respectivamente hasta la segunda fase, los cuales fueron superiores al ácido acetilsalicílico e la

indometacina. Cuando los compuestos puros de friedelina (Figura 7a) y el 1,5-dihidroxixantona (Figura 7b) se evaluaron por vía intraperitoneal en el modelo de constricción abdominal, mostrando una inhibición dosis-dependiente de las constricciones abdominales a valores de (Dosis Inhibitoria) DI_{50} de 12.0 (10-14.5) y 30 (27.0-32.0) mg/kg respectivamente, siendo la friedelina (de 9 a 13 veces más potente), y la 1,5-dihidroxixantona (de 4 a 5 veces más potente) que los compuestos referenciados.

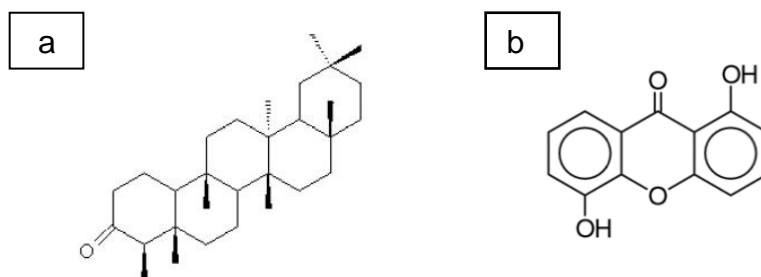


Figura 7. Friedelina a) y 1,5-dihidroxixantona b) con actividad antinociceptiva aislados de la raíz de *C. brasiliense*. Fuente: Isaías *et al.*, 2004

2.2.6.5 Actividad antiulcerogénica y anti-*Helicobacter pylori*

Los extractos hexánico y fracciones de hojas de *C. brasiliense* han sido reportadas también con actividad antiulcerogénica en modelos de ratones cuya úlcera gástrica se indujo por ingesta de etanol (75% v/v) o indometacina (50 mg/kg). Después de inducir la úlcera se evaluó la actividad de la catalasa, y contenido de malondialdehído y glutatión reducido en el tejido estomacal. La mezcla de ácidos derivados de cromanonas previno la ulceración gástrica causada por los tratamientos con etanol e indometacina, su efecto gastroprotector se debió parcialmente a la reducción de los niveles de malonaldehído y actividad de la catalasa en el tejido gástrico, sin embargo no modificó los niveles de glutatión reducido (Lemos *et al.*, 2012).

Para la prueba anti *Helicobacter pylori* la evaluación del extracto hexánico y de los ácidos orgánicos derivados de cromanonas fue positiva, observándose halos

de inhibición parcial de crecimiento en el rango de concentraciones de 25-400 $\mu\text{g/mL}$ (Lemos *et al.*, 2012).

Las xantonas 6-desoxijacareubina, jacareubina, 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona y la 1-hidroxi-3,5,6-tri-o-acetil-2(3,3-dimetilalil)-xantona (Figura 8) aisladas del duramen del tronco de *C. brasiliense*, inhibieron la actividad de la enzima H^+, K^+ ATPasa gástrica en concentraciones de $\text{CI}_{50} = 47 \mu\text{M}$ a 1.6 mM. Las cumarinas mammea A/BA y mammea C/OA (Figura 6a y 6e R1) aisladas de las partes aéreas también mostraron actividad inhibitoria de la ATPasa con una CI_{50} de 110 y 638 μM , respectivamente (Reyes-Chilpa *et al.*, 2006).

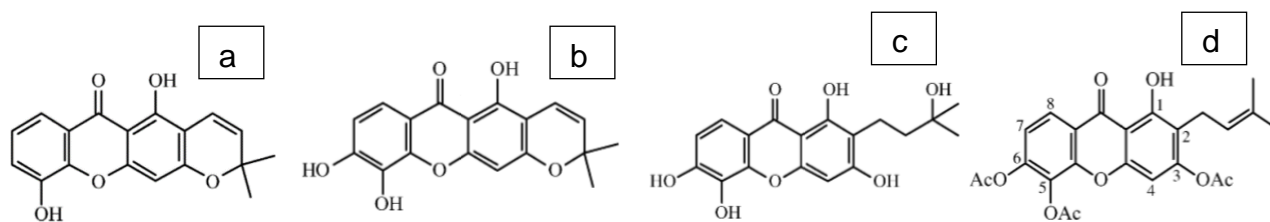


Figura 8. Xantonas con actividad inhibitoria de la enzima $\text{H}^+ \text{K}^+$ ATPasa del duramen del tronco de *C. brasiliense*. a) 6-desoxijacareubina b) jacareubina c) 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona d) 1-hidroxi-3,5,6-tri-o-acetil-2(3,3-dimetilalil)-xantona. Fuente: Reyes-Chilpa *et al.*, 2006.

2.2.6.6 Actividad cicatrizante

Se ha probado un extracto estandarizado de hojas de *C. brasiliense* en una emulsión aplicada por vía tópica en modelos de ratones con heridas cutáneas. La evaluación demostró que los ratones tratados con la emulsión cicatrizaron más rápidamente que con el medicamento Dersani® a los 7 y 14 días. Al día 14, la emulsión con extracto de *C. brasiliense* redujo el área afectada de las heridas en un 90.67%, la cual a los 21 días de tratamiento mostró un incremento en los

fibroblastos producidos en comparación con los demás grupos. El análisis por HPLC del extracto de hojas probado demostró la presencia de la cumarina (-) mammea A/BB (Tr = 21.8min), estandarizando el extracto antes de prepararse en la emulsión a una concentración de $28.04 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto (Lordani *et al.*, 2014).

La (-) mammea A/BB purificada del extracto metanol-agua (10:90) de hojas de *C. brasiliense*, ha sido probada en modelos de Leishmaniasis con ratones para evaluar su efecto cicatrizante en las heridas que causa *L. amazonensis*. Los ratones parasitados recibieron tratamiento por vía intramuscular y local con la cumarina por 30 días, a dosis de 18 mg/kg/d y 0.2% respectivamente, reduciendo significativamente las lesiones de la piel en las almohadillas de las patas de ratones parasitados en comparación con el control. Las dosis probadas por ambas vías de administración mostraron actividad similar a la del medicamento Glucantime® administrado por vía intramuscular (Tiuman *et al.*, 2012).

2.2.6.7 Actividad moluscicida.

La mammea A/BB (Figura 6b) aislada de los extractos hidroalcohólicos de hojas y ramas de *C. brasiliense* colectadas en Brasil presentó actividad contra el molusco *Biomphalaria glabrata*, vector del protozooario *Schistosoma* sp causante de la elefantiasis. Los extractos hidroalcohólicos en concentración de 25 ppm causaron 100% de mortalidad del molusco. La mammea A/BB presentó una dosis letal media (DL₅₀) de 0.67 ppm y DL₉₀ de 1.47 ppm después de 24 horas, la cual es comparable en potencia con el control niclosamida (DL₅₀= 0.77 ppm y DL₉₀= 1.75 ppm) por lo cual podría ser sustituto potencial de esta sustancia utilizada en el combate de los hospederos intermediarios de *Schistosoma* sp (Gasparotto *et al.*, 2005).

2.2.6.8 Capacidad antioxidante.

Las xantonas jacareubina (Figura 8b) y 2-(3,3-dimetilalil)-1,3,5,6-tetrahidroxixantona (Figura 9) fueron aisladas de *C. brasiliense* y se probó su capacidad antioxidante frente a especies reactivas de oxígeno (ERO's), como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido en la degradación del DNA murino y albúmina sérica bovina (BSA). La tetrahidroxixantona mostró mejor capacidad antioxidante que la jacareubina frente al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y los radicales peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) e hidroxilo (OH^{\cdot}), sin embargo ambas xantonas fueron incapaces de atrapar al compuesto peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Ambas xantonas también demostraron actividad protectora dependiente de la concentración, contra la degradación oxidativa de la BSA inducida por el radical hidroxilo de manera, comparando esta capacidad con la α -mangostina. De la misma manera, las xantonas demostraron un efecto protector contra la degradación de ADN murino inducido por el radical (OH^{\cdot}) sólo que no se observó un efecto dependiente de la dosis.

La jacareubina y la 2-(3,3-dimetilalil)-1,3,5,6-tetrahidroxixantona (ambas a 0.5, 1 y 2.5 μ M) mostraron la misma efectividad al reducir los niveles basales de ERO's, así como la peroxidación de lípidos producidas por acción del $FeSO_4$ en órganos como el prosencéfalo, hígado y riñón de manera dependiente de la concentración. Se observó también que estas xantonas lograron prevenir el decremento en actividad de la glutatión reductasa en tejidos de prosencéfalo (Blanco-Ayala *et al.*, 2013).

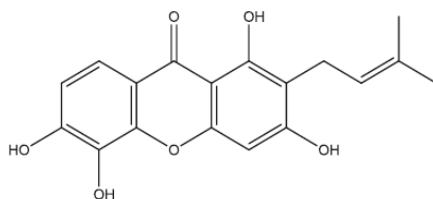


Figura 9. Estructura química de la 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3,-dimetilalil)-xantona con capacidad antioxidante. Fuente: Blanco-Ayala *et al.*, 2013.

La capacidad antioxidante de los extractos de distinta polaridad de hojas y/o tallo de *C. brasiliense*, *C. inophyllum* y *Calophyllum* sp. fue probada con diferentes metodologías: fenoles totales, ABTS, DPPH, ORAC (Oxigen Radical Absorbance Capacity), FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power). El material vegetal se extrajo por percolación con solventes (hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol), siendo los extractos polares y medianamente polares los que presentaron alta capacidad antioxidante. Los extractos metanólicos de tallos de *C. brasiliense* mostraron los mejores valores de inhibición de los radicales DPPH (2.65 mM trolox/g extracto), ABTS (8.49 mM trolox/g extracto), FRAP (47.2 g ácido ascórbico/100g muestra) y contenido de fenoles totales (249 mg ácido gálico/ g extracto). Resultados similares se obtuvieron con el extracto metanólico de hojas y tallos de *C. inophyllum*. Por otra parte, el extracto de acetato de etilo de hojas de *C. brasiliense* mostró los mejores valores de inhibición de los radicales DPPH (1.94 mM trolox/g extracto), ABTS (4.61 mM trolox/g extracto), FRAP (57.5 g ácido ascórbico/100g muestra) y contenido de fenoles totales (493 mg ácido gálico/ g extracto). Se obtuvieron resultados similares con el extracto de acetato de etilo de hojas y tallos de *Calophyllum* sp., con este extracto se obtuvo el mayor contenido de fenoles totales de los 16 extractos reportados (518 mg ácido gálico/ g extracto). Para el ensayo ORAC, el valor más alto de inhibición (11.64 mM trolox/g muestra) fue para el extracto metanólico de hojas de *C. brasiliense* y el más bajo (3.49 mM trolox/g muestra) para el extracto de acetato de etilo de hojas de *C. brasiliense* (Mesa-Vanegas *et al.*, 2009).

2.3 Estudios biotecnológicos de especies del género *Calophyllum*

Calophyllum apetalum es un árbol endémico del sureste de India, posee propiedades medicinales además de una madera apreciada para la construcción de botes y muebles, por lo que su número está declinando severamente. En un esfuerzo por su conservación, Nair y Seení (2003) establecieron un método de propagación *in vitro* a partir de explantes nodales de árboles de *C. apetalum* de 6 a 8 semanas de edad, los cuales generaron brotes que se subcultivaron dos veces

en medio MS con 8.8 μM BAP observando que 68% de los explantes respondían al subcultivo formando 3.2 brotes/ explante en 7 semanas de cultivo. Nair y Seeni (2003) observaron que al subcultivar los explantes derivados de brotes *in vitro* durante 5 semanas en medio MS con 4.4 μM BAP se obtenían mayor número y porcentaje de brotes en los nodos (5.3 por explante, 74% de los explantes). Los cultivos de brotes se transfirieron a medio MS basal al 50% de la concentración de sales durante 4 semanas para inducir la elongación de los mismos (~3 cm). El enraizamiento de los microbrotes (>2 cm) se logró al subcultivarlos en medio MS al 25% de la concentración de sales complementado con 9.8 μM de AIB durante 4 semanas, seguido de un subcultivo únicamente en medio MS al 25% de la concentración de sales durante 4 semanas más. Las plántulas enraizadas se transfirieron a macetas con tierra, arena y estiércol (1:1:1), mantenidas en una cámara de niebla con humedad relativa del 80 - 90%, aclimatadas en un rango de 56% después de 6 semanas. De las 345 plantas micropropagadas llevadas a su hábitat natural, 293 sobrevivieron sin mostrar defectos morfológicos.

Por su parte, Thengane *et al.* (2006) establecieron un método de micropropagación de *Calophyllum inophyllum* a través de brotes múltiples obtenidos de explantes de semillas maduras. Las semillas germinadas *in vitro* en medio Woody Plant Medium (WPM) con o sin hormonas (2.22 μM BAP) dieron origen a plántulas que fueron utilizadas para obtener explantes de brotes y raíces que se cultivaron en medio WPM con 0.91 μM TDZ donde se obtuvo el mayor número de brotes múltiples después de 60 días de inoculación, observando 20.9 brotes por explante. Inclusive a esta concentración de hormona se obtuvo la mayor elongación de brotes de tamaño >4.0 cm (4.9-7.2 por explante). La elongación de brotes continuó por cerca de 30-40 días en medio WPM a la mitad de la concentración de sales sin adición de hormonas. El máximo enraizamiento de los brotes fue obtenido en medio WPM más 2.46 μM AIB (52%). Los brotes enraizados dieron origen a plántulas que fueron transferidas a una mezcla estéril de tierra, fibra de coco y arena (1:2:1) y aclimatadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 80% humedad relativa, observando un porcentaje de sobrevivencia del 77% de las plántulas a las

5 semanas, después, a las 8 semanas de cultivo se transfirieron a macetas con una mezcla de abono y tierra (1:1) para finalmente ser transferidas a campo (Thengane *et al.*, 2006).

El cultivo *in vitro* de callos de *C. inophyllum* fue establecido a partir de explantes de semillas maduras, nodales e internodales y de hojas (de plántulas de 2-3 meses de edad), cultivados en medio WPM complementado con distintas combinaciones y concentraciones de fitohormonas: 4 mg/L IBA +1 mg/L BAP (semillas), 4 mg/L IBA (nodos), 6 mg/L PIC +2 mg/L BAP (hojas). Los explantes de semillas originaron callos en 96.01% (callos blancos, friables e irregulares) después de 45 días de incubación, mientras que los nodales/internodales y de hojas en 87.5 y 86.66% respectivamente (callos café oscuro, nodulares y compactos) a los 30 días de incubación. La finalidad de manejar diversas fitohormonas en diversas formulaciones de medio fue observar su influencia en la inducción de callos y en el patrón de expresión de dipirano-cumarinas anti VIH-1 inophyllums B y P. El análisis cuantitativo por HPLC de los extractos de los callos reveló que el mayor contenido de inophyllum B (40.59 mg/100 g callo) se cuantificó en callos derivados de explantes de semillas crecidos con 2 mg/L AIB, mientras que la mayor cantidad de inophyllum P (141.35 mg/ 100g callo) se estimó en callos derivados de explantes de semillas crecidos con 2 mg/L AIB + 1 mg/L BAP (Pawar *et al.*, 2007).

El cultivo de células en suspensión de *C. inophyllum* fue reportado por Pawar y Thengane (2009) desarrollado a partir de callos derivados de explantes de semilla o nodales/internodales de plántulas *in vitro*. Para ambos tipos de cultivo iniciados con los dos tipos de callos, se desarrollaron cinéticas de crecimiento en medio WPM sin adición de reguladores de crecimiento vegetal. Ambas cinéticas duraron 60 días de cultivo, observándose una biomasa máxima a los 50 días (1.383 g/L y 0.932 g/L para las suspensiones de callos hojas y segmentos nodales respectivamente).

Para conocer la influencia de la manipulación del medio de cultivo se variaron las concentraciones de nitratos, sulfatos y vitaminas totales del medio WPM líquido. La biomasa más alta (6.2 veces) se logró en cultivos iniciados con callos derivados de explantes nodales/internodales complementados con tres veces la cantidad de sulfato total. Se observó que la variación de nitrato y sulfato en el medio de cultivo tuvo un efecto positivo en la expresión de inophyllums A y C, así como las vitaminas en la expresión de inophyllums A, C y B. Las fitohormonas Picloram y BAP a concentraciones de 8.28 μM y 8.88 μM respectivamente, incrementaron 295.05 veces la producción de inophyllum A en las suspensiones iniciadas con callos de hoja, mientras que el AIB 14.70 μM más BAP 4.44 μM incrementaron la producción de inophyllum B 1065 veces en los cultivos iniciados con callos de explantes de hoja. Por sí solo, el AIB a una concentración de 4.9 μM y 9.8 μM logró aumentar la producción de inophyllum C 616 veces e inophyllum P 23.22 veces en cultivos en suspensión obtenidos a partir de callos derivados de explantes de hoja (Pawar y Thengane 2009).

La elicitación abiótica para estimular la producción de las dipiranocumarinas inophyllums en cultivos en suspensión de *C. inophyllum* fue probada por Pawar y Thengane (2011) utilizando metales pesados. El cadmio (Cd) como CdCl_2 mostró ser el mejor elicitador en cultivos en suspensión de callos derivados de explantes de tallo elicitando la producción máxima de inophyllums A (981 veces, CdCl_2 0.1 mM), C (129 veces, CdCl_2 5 mM), y calofilólido (~ 1 mg/ 100 mg biomasa, CdCl_2 10 mM) mientras que este mismo metal en cultivos en suspensión de callos derivados de explantes de hoja elicitó la máxima producción de inophyllums B (300 veces, 1.0 mM) y P (340 veces, 0.5 mM). El inophyllum D fue la única dipiranocumarina cuya máxima producción (2230 veces) se alcanzó al utilizar 1.0 mM de cromo (Cr) como $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ como elicitador en cultivos en suspensión de callos derivados de explantes de tallo. Ninguno de los tres elicitadores abióticos empleados (Cu, Cr, Cd) resultó en buen crecimiento de la biomasa del cultivo de células en suspensión de *C. inophyllum*, por lo que fue la adición de CaCl_2 la que estimuló el crecimiento celular pero no la producción de dipiranocumarinas. La biomasa creció 35.26

veces más en la suspensión de callos derivados de explantes de tallo al adicionar al medio 2.0 mM de CaCl₂.

La elicitación de la producción de inophyllums por los cultivos en suspensión de *C. inophyllum* mediante el uso de hongos endófitos fue probada por Pawar *et al* (2011). Dos hongos, *Nigrospora sphaerica* y *Phoma* spp. ambos endófitos de *C. inophyllum* se aislaron de hojas y fueron identificados por técnicas moleculares (rRNA, subunidad 18s). La elicitación de los cultivos celulares en suspensión iniciados con callos de explantes de hoja o de tallo se hizo mediante filtrados de cultivo o polvo de células secas de ambos hongos adicionados al medio WPM después de 10 d de iniciado el cultivo. La mayor producción de inophyllums A, C y P fue observada en los cultivos en suspensión iniciados con callos derivados de explantes de hoja, mientras que los cultivos iniciados con callos derivados de explantes de tallo sólo produjeron inophyllum B al ser elicitados. Al elicitar los cultivos en suspensión de explantes de hoja con 40 mg de polvo de células secas de *Phoma* spp., se produjeron 751 veces más inophyllum A (6.84 mg/ 100 g biomasa elicitada) comparada con el control. Por otra parte, al elicitar con 20 mg de polvo de células secas de *N. sphaerica* los cultivos celulares derivados de explantes de tallo se produjeron 414 veces más inophyllum B (6.22 mg/ 100g biomasa elicitada) comparada con el control. La máxima producción de inophyllum C y P se logró utilizando 10% de filtrado de cultivo de *N. sphaerica* en los cultivos en suspensión derivados de explantes de hoja, observándose una producción de 928 veces más de inophyllum C (7.43 mg/ 100g biomasa elicitada) y 750 veces más (1.5 mg/ 100g biomasa elicitada) al comparar ambos cultivos con sus respectivos controles.

2.3.1 Estudios biotecnológicos de *Calophyllum brasiliense*

Debido a la colecta excesiva de *C. brasiliense* por sus propiedades medicinales y su atractiva madera, además de la baja viabilidad de sus semillas recalcitrantes, su población ha disminuido drásticamente (Afolayan y Adebola, 2004; Sorol *et al.*, 2015), ahí la importancia de establecer herramientas biotecnológicas para su propagación y la obtención de metabolitos de manera sustentable.

El establecimiento de los cultivos *in vitro* de *C. brasiliense* a partir de explantes de hoja y de semilla para la producción de calanólidos fue reportado por Bernabé-Antonio *et al.*, (2010). La inducción de callo se logró en explantes de semilla en medio WPM con 8.88 μM de BAP más 24.84 μM de PIC mientras que la mayor inducción de callos para los explantes de hoja se obtuvo con el medio WPM con 0.46 μM de KIN + 5.37 μM de ANA. Los análisis cuantitativos realizados a los extractos hexánicos de callos por medio de HPLC reveló que hubo una mayor producción de (-)-calanólido B y (+)-calanólido C en los callos provenientes de explantes de semillas que en aquellos desarrollados a partir de explantes de hoja, en cantidades de 309.25 mg kg^{-1} en comparación con 8.70 mg kg^{-1} de (-)-calanólido B; y de 117.7 mg kg^{-1} PS para el (+)-calanólido C producido únicamente en los callos derivados de explantes de semilla.

Se ha cuantificado la presencia de ácidos grasos producidos por el cultivo de callos de *C. brasiliense*, como una fuente sustentable para obtener aceites no comestibles que puedan ser usados como biocombustibles. El cultivo de callos derivados de explantes de hoja y de explantes de semilla de dos regiones del estado de Veracruz (San Andrés Tuxtla y Pajapan) se inició en medio MS complementado con 3% de sacarosa y 0.5% de fructosa, con 8.88 μM BAP más 24.84 μM PIC, medio que resultó más efectivo para el desarrollo de la biomasa en comparación con el WPM. Se determinó una cinética de crecimiento únicamente de los callos derivados de explantes de hoja en medio semisólido MS observándose que la fase de adaptación duró aproximadamente 10 días, después de los cuales se alcanzó una fase de crecimiento logarítmico que duró hasta aproximadamente 40 días, momento en el cual logró la biomasa máxima (18.72

g/L) por lo que se eligió este periodo de subcultivo para la extracción de la biomasa y la identificación de ácidos grasos.

Ambos tipos de callos produjeron principalmente ácidos grasos en cantidades entre 68.06 y 75.76%. En general, los callos derivados de explantes de hoja produjeron la mayor cantidad de ácidos grasos saturados y la mejor región fue San Andrés Tuxtla en todos los casos (72.41 y 75.76% respectivamente). El mayor contenido de ácidos grasos insaturados se produjo en los callos derivados de semillas (25,25 % región de Pajapan y 31.94% región de San Andrés Tuxtla). Los ácidos grasos saturados de los extractos de callos tanto de hojas como de semillas de ambas regiones estuvieron compuestos principalmente de ácido palmítico identificado en un 31.22-39.18%, seguido del ácido esteárico en un 19.52-21.18%; mientras que el predominante insaturado fue el oleico (23.14-31.63%). La concentración de los ácidos restantes saturados e insaturados (mirístico, pentadecanoico, palmitoleico, araquidónico, behénico y lignocérico) fue de 0.3 a 3.8% (Bernabé-Antonio *et al.*, 2015).

La micropropagación de *C. brasiliense* fue lograda a partir de segmentos nodales de plántulas *in vitro* de 6 meses de edad, germinadas a partir de semillas colectadas en la región de San Andrés Tuxtla, Veracruz, México. Las semillas fueron germinadas *in vitro* en medio MS mostrando un 48.6% de germinación. Los segmentos nodales mostraron un alto porcentaje de inducción de brotes (77.5%), brotes por segmento (6.9), nodos por brote (3.8), hojas por brote (8.0) y longitud del brote (45 cm) cuando se adicionó al medio de cultivo 0.5 mg/L de ácido 3-indolbutírico (AIB) más 0.1 mg/L thidiazuron (TDZ). Además, el máximo enraizamiento de los brotes (63.5%) y longitud de las raíces (2.2 cm) se lograron utilizando 1.0 mg/L de AIB. Más de tres cuartas partes de las plantas aclimatadas (77.5%) crecieron exitosamente en macetas (Maldonado *et al.*, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que las plantas medicinales constituyen una fuente invaluable de metabolitos secundarios, los cuales son potenciales fármacos para los seres humanos. En especial, *Calophyllum brasiliense* produce compuestos activos para padecimientos que afectan importantemente la salud del ser humano como el cáncer y el VIH-1. La obtención de los compuestos a partir del árbol limita la posibilidad de desarrollar medicamentos para ser utilizados en el tratamiento de dichos padecimientos. Los cultivos de células en suspensión de la especie son una alternativa viable para producir de manera constante y controlada los metabolitos secundarios de interés farmacológico. Asimismo, este sistema biotecnológico puede ser viable para valorar el uso etnobotánico reportado para *Calophyllum brasiliense* en el tratamiento de la inflamación.

4. HIPÓTESIS

Con base a la totipotencialidad de la células vegetales, se postula que los cultivos de células en suspensión de *C. brasiliense* tienen la capacidad de producir los compuestos bioactivos identificados en las hojas del árbol.

El uso etnomédico de *C. brasiliense* para tratar la artritis, postula que las hojas y las células en suspensión de esta especie contienen compuestos con actividad antiinflamatoria.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos generales

- Evaluar la presencia de calanólidos, ácido apetalico y canofilol en los cultivos de células en suspensión de *C. brasiliense*.
- Valorar la actividad antiinflamatoria de extractos orgánicos obtenidos de hojas de plantas silvestres y de células en suspensión de *C. brasiliense* a través del uso de la prueba aguda de edema auricular.

5.2 Objetivos particulares

- Desarrollar un sistema de cultivo de células en suspensión a partir de callos de *C. brasiliense* generados previamente.
- Establecer la cinética de crecimiento del cultivo de células en suspensión en lote.
- Establecer las cinéticas de la producción de compuestos fenólicos y flavonoides en los cultivo de células en suspensión.
- Valorar la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de los cultivos de células en suspensión.
- Aislar e identificar los compuestos calanólidos, ácido apetalico y canofilol a partir de hojas de planta silvestre.
- Analizar por HPLC el contenido de ácido apetalico en los extractos diclorometánicos del cultivo de células en suspensión.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos de hojas de plantas silvestres y del de células en suspensión.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivos *in vitro* de *C. brasiliense*

6.1.1 Establecimiento de los cultivos de callos

Para la generación del cultivo de callos se utilizaron explantes de hojas inmaduras de plántulas aclimatadas de *C. brasiliense* de aproximadamente 5 cm de longitud. Las hojas se desinfectaron de manera superficial con una solución jabonosa por 5 min, seguida por una inmersión en etanol al 70% (v/v) por 30 s. Posteriormente, las hojas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% (v/v) por 15 min, agregando tres gotas de Tween-20 por cada 100 mL de solución preparada y agitando constantemente a baja velocidad (Bernabé-Antonio *et al.*, 2010).

Una vez desinfectadas, las hojas se lavaron tres veces con agua destilada estéril en el interior de una campana de flujo laminar. Las hojas se cortaron en segmentos de 5 x 5 mm se cortaron dentro de cajas Petri con solución antioxidante (100 mg/L de ácido cítrico y 150 mg/L de ácido ascórbico). Los explantes se sumergieron en soluciones nuevas de antioxidante en vasos de precipitados, realizando 3 cambios periódicos de dicha solución durante 3 o 4 min para eliminar la mayor parte del látex exudado durante los cortes. Para inducir callogénesis, se colocaron 3 o 4 explantes en frascos tipo Gerber que contenían 25 mL de medio de cultivo semisólido previamente esterilizado a 121° C por 20 min a 18 psi. (Bernabé-Antonio *et al.*, 2010).

Se empleó el medio de cultivo de Murashige & Skoog (MS) suplementado con 3% de sacarosa (p/v), 0.5% fructosa (p/v), 100 mg/L de ácido cítrico, 150 mg/L de ácido ascórbico, 6 mg/L de picloram (24.84 µM) (PIC), 2 mg/L (8.88 µM) de 6-bencilaminopurina (BAP) y 2 g/L de phytigel (p/v) (Sigma, St. Louis, MO, USA) ajustado a pH de 5.8. Los cultivos se incubaron a 25 ± 2°C en oscuridad total, realizando subcultivos a medio fresco cada 4 semanas (Bernabé-Antonio *et al.*, 2010).

6.1.2 Establecimiento del cultivo de células en suspensión de *C. brasiliense*

Empleando un inóculo del 4 % (p/v), la biomasa de callos derivados de explantes de hojas (en peso fresco) se transfirió a matraces de 500 mL que contenían 100 mL del medio de cultivo MS suplementado con 3% de sacarosa (p/v), 0.5 % fructosa (p/v), 100 mg/L de ácido cítrico, 150 mg/L de ácido ascórbico, 6 mg/L (24.84 μM) de (PIC) y 2 mg/L (8.88 μM) de BAP a pH 5.8. Los cultivos se incubaron a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo un fotoperiodo de 16 h luz /8 h de oscuridad en un agitador orbital a 110 rpm.

Los subcultivos se realizaron cada 15 días agregando un inóculo del 6% (p/v) al medio de cultivo descrito anteriormente. La biomasa se filtró en condiciones de esterilidad, con ayuda de un disgregador celular para remover los agregados celulares más oxidados, y posteriormente una filtración al vacío con papel filtro Whatman No.1 en un matraz Kitasato con embudo Büchner.

6.1.2.1 Cinéticas de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento en lote se determinaron por 16 días registrando el peso fresco (PF) y el peso seco (PS) cada tercer día, al filtrar la biomasa de cada matraz (3 matraces por cada punto de la cinética) al vacío en un embudo Büchner (papel filtro Whatman No.1) en condiciones de esterilidad. La biomasa recuperada se lavó con agua destilada estéril para eliminar los residuos del medio; después de medir el PF, la biomasa se secó en estufa a 55°C y se determinó el PS (Nicasio-Torres *et al.*, 2010).

Los parámetros cinéticos de crecimiento determinados fueron: la velocidad específica de crecimiento (μ) calculada a través del logaritmo de los pesos secos de las biomasas secas determinadas durante la fase exponencial vs tiempo; tiempo de duplicación (t_d), que es el tiempo requerido para duplicar la biomasa y se determinó mediante la siguiente ecuación $t_d = \ln 2 / \mu$; el índice de crecimiento

se determinó calculando la biomasa máxima obtenida menos el inóculo entre el inóculo; el rendimiento de la fuente de carbono entendido como los gramos de biomasa seca producida por cada gramo de fuente de carbohidratos totales suplementados al medio de cultivo.

6.1.2.2 Determinación de azúcares totales en el medio de cultivo de células en suspensión de *C. brasiliense* por el método del fenol-sulfúrico

Para determinar el consumo de azúcares por los cultivos celulares se empleó el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) con ligeras modificaciones. A 0.2 mL del medio de cultivo filtrado y diluido (1:300) se mezcla vigorosamente con 0.2 mL de fenol al 5%, y se adiciona 1 mL ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 490 nm contra un blanco de reactivos.

6.2 Análisis químico

6.2.1 Obtención de los extractos metanólicos de las células en suspensión de *C. brasiliense*

Se pesaron 50 mg de las muestras de biomasa seca de cada intervalo de tiempo de la cinética de crecimiento en tubos falcon con tapa, adicionando 5 mL de metanol grado reactivo y se extrajeron por sonicación a 80% amplitud durante 10 min en un baño de hielo. Posteriormente los extractos se centrifugaron a 6000 rpm por 20 min. Los sobrenadantes se colectaron en frascos ámbar con tapa y se almacenaron a 4 °C. Para cada una de las muestras se manejó un total de tres repeticiones.

6.2.2 Obtención de los extractos metanólicos de hojas de plántulas silvestres y aclimatadas de *C. brasiliense*

Las partes aéreas (hojas) de *C. brasiliense* fueron colectadas en San Andrés de los Tuxtlas, municipio de Catemaco, Estado de Veracruz, México (No. espécimen

14425, Herbario del IMSS). Las hojas frescas de plantas de *C. brasiliense* silvestres y aclimatadas a la Ciudad de México, se secaron a 60°C en una estufa y posteriormente se pulverizaron en un mortero. Se pesaron 3 muestras de 350 mg de las hojas pulverizadas de cada planta en tubos Falcón con tapa, adicionando 5 mL de metanol grado reactivo y cada muestra se extrajo por sonicación durante 10 min en un baño de hielo. Posteriormente los extractos se centrifugaron a 6000 g por 20 min. Los sobrenadantes se colectaron en frascos ámbar con tapa y se almacenaron a 4 °C.

6.2.3 Determinación del contenido total de fenoles

Se determinó el contenido de fenoles totales en los extractos metanólicos de las hojas de las plantas silvestres, plantas aclimatadas y células en suspensión de *C. brasiliense*, utilizando como base el método de Yim *et al.* (2012). En tubos de ensaye se mezclaron 20 µL del extracto metanólico con 0.1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:1). Después de 3 minutos se adicionaron a la mezcla 0.3 mL de Na₂CO₃ al 20% y se ajustó el volumen a 2 mL con agua desionizada. La mezcla se dejó reaccionar en oscuridad por 90 min. La absorbancia se midió contra un blanco de reactivos a 725 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. Se utilizó un estándar de ácido gálico (GA) para la curva de calibración en un rango de concentraciones de 80-1000 mg/L y se analizó como se describió anteriormente. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por g de biomasa seca (mg EAG/g BS).

6.2.4 Determinación del contenido de flavonoides

Se tomaron 0.2 mL del extracto metanólico y se mezclaron con 1.25 mL de agua destilada, enseguida se adicionó 75 µL de NaNO₂ al 5% y se dejaron reaccionar durante 6 min. Después se agregó 0.15 mL de AlCl₃ al 10%, la mezcla se agitó vigorosamente y transcurridos 5 min de reacción se agregó 0.5 mL de NaOH 1 M y se completó el volumen a 2.5 mL con agua destilada. Se leyó la absorbancia contra un blanco de reactivos a 510 nm en un tiempo menor a 30 min después de adicionado el hidróxido. Se utilizó un estándar de quercetina para la curva de

calibración en un rango de concentraciones de 100-3200 $\mu\text{g/mL}$ y se analizó como se describió anteriormente (Liu *et al.*, 2002). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por g de biomasa seca (mg querc/g BS).

6.2.5 Determinación de la capacidad antioxidante por el método del DPPH

Las capacidades antioxidantes de los extractos metanólicos de las hojas y de células en suspensión se evaluaron por el método del DPPH reportado por Yim *et al.* (2012). Se preparó una solución stock de DPPH (0.075 mM) en metanol y 1.9 mL de la solución se mezclaron con 0.01 mL del extracto metanólico. La mezcla se agitó vigorosamente por 1 min y se dejó reaccionar durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia contra un blanco de reactivos a 517 nm. La capacidad antioxidante se determinó calculando la TEAC (capacidad antioxidante como equivalentes de TROLOX) utilizando una curva de calibración con TROLOX en un rango de concentraciones de 0-8 mM, y expresando por gramo de biomasa seca.

6.2.6 Determinación de la capacidad antioxidante por el método del ABTS

La capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las hojas y de células en suspensión se evaluaron con base al método del ABTS reportado por Gong *et al.* (2002). Se preparó una solución stock de ABTS (7 mM) mezclada con 2.45 mM de persulfato de potasio. La mezcla se dejó reposar en oscuridad a temperatura ambiente por 12-16 h. La solución de trabajo de ABTS se obtuvo por dilución de la solución stock de ABTS con metanol hasta lograr una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm. Una vez ajustada la solución, se tomaron 2 mL y se añadieron 20 μL de extracto metanólico, agitando vigorosamente y dejando reposar por 6 min. La capacidad antioxidante se determinó calculando la TEAC (capacidad antioxidante como equivalentes de TROLOX) utilizando una curva de calibración con TROLOX en un rango de concentraciones de 0-15 μM , expresando por gramo de material vegetal.

6.2.7 Aislamiento y purificación de ácido apetalico, canofilol y calanólidos de partes aéreas de *C. brasiliense*

Las partes aéreas (hojas) de *C. brasiliense* se secaron y el material vegetal (200 g) se trituró en un molino Pulvex a un tamaño de partícula de 4 mm; posteriormente se colocó en un matraz al cual se le agregó acetona, metanol y agua (extracciones en serie), en periodos de 24 h. Cada uno de los extractos se filtró con papel Whatman no. 4 y se concentró a presión reducida en rota vapor (Heidolph L3).

El fraccionamiento del extracto acetónico se llevó a cabo por cromatografía en columna (CC) utilizando sílica gel de fase normal (sílica gel 60 9858 Merck) y de fase reversa (sílica gel 60-50 c18 Macherey-Nagel). La identificación de compuestos presentes en las fracciones eluidas se realizó por cromatografía de capa fina (CCF) de fase normal (Sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) y fase reversa (Sílica gel 60 RP-18 F₂₅₄S, Merck) comparando con estándares comerciales (β -sitosterol, ácido ursólico, rutina, quercetina) y el revelado se hizo con los siguientes reactivos: sulfato cérico amoniacal (revelador general), 4-hidroxibenzaldehído (compuestos de tipo terpenoide) o 2-aminoetil difenilborinato (revelador de flavonoides).

El análisis de los espectros de RMN en una (¹H, ¹³C, DEPT) y dos dimensiones (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) nos permitió conocer la estructura química del ácido apetalico, el canofilol y el (-)-calanólido B.

6.2.8 Extracción de biomasa de suspensiones celulares de *C. brasiliense*

Para obtener el extracto de diclorometano de la biomasa, se pesaron 46.9 g de células en suspensión de *C. brasiliense* secadas previamente en estufa a 60°C por 24 horas, se extrajeron con diclorometano y se dejó reposar 24 h, después se filtró el extracto con papel whatman no. 4 y se concentró a presión reducida en evaporador rotatorio (Heidolph L3).

La identificación de compuestos presentes en el extracto se realizó por cromatografía de capa fina (CCF) de fase normal (Sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) y fase reversa (Sílica gel 60 RP-18 F₂₅₄S, Merck) comparando con los compuestos purificados de calanólidos, ácido apotánico, canofilol y los estándares de ácido ursólico y β-sitosterol. El revelado se hizo con los siguientes reactivos: sulfato cérico amoniacal (revelador general), 4-hidroxibenzaldehído (compuestos de tipo terpenoide) o 2-aminoetil difenilborinato (revelador de flavonoides).

6.2.9 Identificación por HPLC de ácido apotánico, canofilol y (-)-calanólido B en el extracto diclorometánico de células en suspensión de *Calophyllum brasiliense*

Se utilizó un equipo de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) para la detección y cuantificación de los compuestos presentes en el extracto diclorometánico de la biomasa de *C. brasiliense*. El equipo consta de un módulo de separación (Waters 2695) equipado con un detector de arreglo de diodos (Waters 2996) y operando con un software Empower 1. Se desarrollaron dos métodos de análisis: el Método 1 para la determinación del ácido apotánico, y el Método 2 para el (-)-calanólido B y el canofilol.

Método 1: Se empleó una columna de fase reversa GRACE Prevail C-18 (5 μm, 4.6 x 150 mm), utilizando como fase móvil ácido trifluoroacético (TFA) al 0.5% en agua como solvente A, y acetonitrilo como solvente B, con un flujo de 1 mL/min y utilizando un sistema de gradiente durante 24 min de corrida de muestra, de la siguiente manera: el solvente A durante los dos primeros minutos se mantuvo al 100%, al minuto 3 disminuyó hasta alcanzar el 90%, al minuto 6 se llevó al 85%, posteriormente en los minutos 11 y 12 bajó hasta al 80%, cambiando a 70% al minuto 13 y al minuto 15 hasta el 50%, al minuto 16 se realizó un cambio de gradiente de concentración que llegó a 100% del solvente B, el cual se mantuvo hasta el minuto 21, y regresó a las condiciones iniciales al minuto 22 en donde el solvente A es 100%.

La cuantificación del ácido apético en los extractos de diclorometano se realizó en HPLC con una curva de calibración con concentraciones de 7.81, 15.62, 31.26, 62.5 a 125 µg/mL preparada a partir de una concentración de 3.5 mg del compuesto (2) y diluida con diclorometano para llegar a una concentración de 1000 µg/mL. Se graficó el promedio de las áreas contra la concentración y la ecuación de la recta resultante fue $y = 45278x + 142163$ con un valor de $R^2 = 0.9996$.

Método 2: Se empleó una columna de fase reversa GRACE Prevail C-18 (5 µm, 4.6 x 150 mm), utilizando como fase móvil agua como solvente A y acetonitrilo como solvente B, con un flujo de 1 mL/min utilizando un sistema de gradiente durante 23 min de corrida de muestra, de la siguiente manera: el solvente A durante los dos primeros minutos se mantuvo al 100%, al minuto 3 disminuyó hasta alcanzar el 60%, al minuto 6 se llevó hasta el 20% manteniéndose así hasta el minuto 10, realizando un cambio de gradiente de concentración que llegó a 100% del solvente B al minuto 11 y manteniéndose así hasta el minuto 20, y regresó a las condiciones iniciales al minuto 21 en donde el solvente A es 100%.

Para ambos métodos las muestras se monitorearon con un detector de arreglo de diodos a 200-600 nm, los compuestos puros (ácido apético, canofilol y calanólidos) previamente identificados por RMN de ^1H y ^{13}C se prepararon e inyectaron a un volumen de inyección de 10 µL.

6.3 Evaluación de la actividad anti-inflamatoria

6.3.1 Animales

Los ratones ICR (28 g) utilizados para las pruebas farmacológicas fueron manipulados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción y uso de animales de laboratorio) y guías éticas internacionales para el uso experimental de animales. Los ratones

fueron mantenidos a temperatura de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, humedad de $70 \pm 5\%$ con ciclos de 12 h luz/oscuridad y acceso libre a comida y agua (*ad libitum*).

6.3.2 Modelo agudo de edema auricular en ratones inducido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato)

Los ratones se asignaron a grupos de siete individuos cada uno, y el TPA (2.5 μg , disuelto en 20 μL de acetona; Sigma-Aldrich) se aplicó en la oreja derecha en las superficies interna y externa para generar edema; la oreja izquierda no fue tratada. Después de 10 min, dosis de 1.0 y 2.0 mg por oreja de los extractos de las plantas silvestre y aclimatada (acetónico, metanólico y biomasa de la suspensión celular (diclorometano 100%, y diclorometano-metanol 9:1 de biomasa) y el control positivo indometacina (1 mg/oreja) disueltos en acetona, fueron aplicados tópicamente en ambas orejas. Cuatro horas después de la administración del agente antiinflamatorio, los animales se sacrificaron con éter y dislocación cervical, secciones circulares (6 mm de diámetro) fueron tomadas de ambas orejas, tratada y sin tratar, y se determinó el edema por diferencias de peso (Mitul Patel *et al.*, 2012; Pérez-Hernández *et al.*, 2014).

El porcentaje de inhibición se calculó como:

$\% \text{Inhibición} = [(\Delta \text{ peso del edema control negativo} - \Delta \text{ peso del edema tratamiento}) / \Delta \text{ del peso del edema del control}] * 100$.

6.4 Estadística

El tratamiento de los datos de las actividades antiinflamatorias de los extractos probados se llevó a cabo mediante un ANOVA simple con una *post*-prueba de comparación de medias de Dunnet y una prueba de Tukey realizados con el programa estadístico SAS®. El tratamiento estadístico realizado del contenido de fenoles totales y flavonoides, así como las actividades antioxidantes determinados en los extractos de la suspensión celular y de las plantas, se llevó a cabo mediante un ANOVA simple con una prueba de Tukey realizados con el programa

estadístico SAS®. El análisis de regresión lineal se realizó para determinar el coeficiente de correlación entre el contenido de fenoles totales y/o flavonoides con la actividad antioxidante con el programa Excel de Microsoft Office®.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Material vegetal

Se inició el cultivo de callos utilizando explantes de hojas inmaduras de un espécimen de *C. brasiliense* aclimatada a la Ciudad de México (2 años, Figura 10) proporcionada por el Dr. Antonio Bernabé. Las hojas (5 cm longitud) se lavaron y cortaron para iniciar los cultivos como se mencionó anteriormente, colocando 4 explantes por frasco de medio semisólido MS con 30 g/L sacarosa complementado con 0.5% fructosa y 24.84 μ M PIC + 8.88 μ M BAP. Al final de las primeras 4 semanas se realizó el primer cambio de los explantes a medio fresco, en los tejidos se observó un 100% de respuesta morfogénica con la presencia de pequeños agregados celulares (Figura 11).



Figura 10. Planta de *C. brasiliense* (2 años) aclimatada a la Ciudad de México.

7.2 Cultivo de callos



Figura 11. Frasco con explantes de hoja de planta aclimatada de *C. brasiliense* desarrollando callos al final de las 4 primeras semanas de cultivo n = 26. Medio MS con 3% sacarosa, 0.5% fructosa, 24.84 μ M PIC, 8.88 μ M BAP.

Los explantes empezaron a desarrollar callos a distintos tiempos, siendo aquellos que tuvieron parte de las nervaduras de la hoja seccionada los que respondieron primero (8 semanas en cultivo, Figura 12); se desarrollaron callos verde oscuro de consistencia dura, algunos de ellos con algunos agregados celulares blanco-grisáceos signo de una estado más avanzado de callogénesis (Bernabé-Antonio *et al.*, 2010). Los callos más grandes se separaron en frascos con sólo dos unidades, mientras que algunos otros quedaron con tres o cuatro explantes de tamaño pequeño.



Figura 12. Frasco con explantes de hoja de planta aclimatada de *C. brasiliense* desarrollando callos al final de las 8 semanas de cultivo. n = 40. Medio MS con 3% sacarosa, 0.5% fructosa, 24.84 μ M PIC, 8.88 μ M BAP.

7.3 Cultivo de células en suspensión

Los cultivos de células en suspensión se iniciaron con un inóculo de 4 g de callos derivados de explantes de hoja, transferidos a medio MS líquido complementado

con 3% de sacarosa, 0.5 % fructosa, 24.84 μM de PIC y 8.88 μM BAP. El cultivo se desarrolló en las condiciones mencionadas en el apartado de metodología, y el subcultivo se realizó cada 3 semanas (Figura 13).



Figura 13. Matraz erlenmeyer con células de *C. brasiliense* obtenidas de callos de explantes de hoja de planta aclimatada. n = 10. Medio MS 3% sacarosa, 0.5 % fructosa, 24.84 μM PIC, 8.88 μM BAP.

Utilizando el disgregador celular, se filtraron los segmentos de callo más grandes y/u oxidados, para dejar solamente los agregados celulares más finos, de un color café claro, pesando 6 g de células desdiferenciadas como inóculo (en PF). Mediante la observación de la coloración del cultivo se determinó que la vejez se alcanzaba después de los 15 días debido a una biomasa más oxidada, eligiendo este periodo como tiempo de subcultivo, una vez que los cultivos lograron la estabilidad.

En un trabajo preliminar de Bernabé-Antonio *et al.* (2010) se reporta el establecimiento de cultivos de callos de *C. brasiliense* en medio WPM suplementado con 3% de sacarosa, más la adición de 24.84 μM PIC y 8.88 μM BAP como mejores fitohormonas para desarrollar callos. Sin embargo, en estas condiciones los cultivos fenolizaban rápidamente y la biomasa moría, por lo que se eligió cambiar por el medio nutritivo WPM por el de Murashige y Skoog (MS) debido a que contiene una mayor cantidad de sales, además de la adición de 0.5% de fructosa. Estos cambios permitieron el desarrollo óptimo de los cultivos de callos sirviendo estas condiciones para el establecimiento del cultivo en

suspensión, el cual una vez estable presentó se observó como una suspensión homogénea de células libres y pequeños agregados celulares de color café claro (Figura 13).

En las condiciones de cultivo en las cuales se desarrollaron las células en suspensión de *C. brasiliense* únicamente se observó la biosíntesis de ácido apetalico y canofilol, pero no la producción de calanólidos. Pawar y Thengane (2009) reportaron en una línea celular producida a partir de explantes de hoja de *C. inophyllum* utilizando 8.28 μM PIC más 8.88 μM BAP, un incremento en la producción de la dipiranocumarina inophyllum A. Otra estrategia utilizada por estos autores fue cambiar la auxina PIC por ácido indolbutírico (AIB) 14.7 μM con BAP 8.88 μM en cultivos iniciados con explantes de hojas donde se observó la producción de inophyllum B; esta misma auxina fue utilizada sola en la formulación del medio a concentraciones de 9.8 μM y 4.9 μM para estimular la producción del inophyllum P y C respectivamente. Esta estrategia bien podría ser una perspectiva para la producción de los compuestos calanólidos A, B y/o C en los cultivos en suspensión de *C. brasiliense* en trabajos posteriores.

7.3.1 Cinéticas de crecimiento

Se realizaron dos cinéticas de crecimiento tipo lote independientes a partir de un cultivo de células en suspensión estable de *C. brasiliense*. Se empleó el inóculo del 6 %. En cada cinética se tomaron 3 muestras cada tercer día en un total de 16 días. Las cinéticas presentaron un comportamiento similar, en la Figura 14 se presenta el promedio de los datos de peso fresco y seco de ambas con respecto al tiempo.

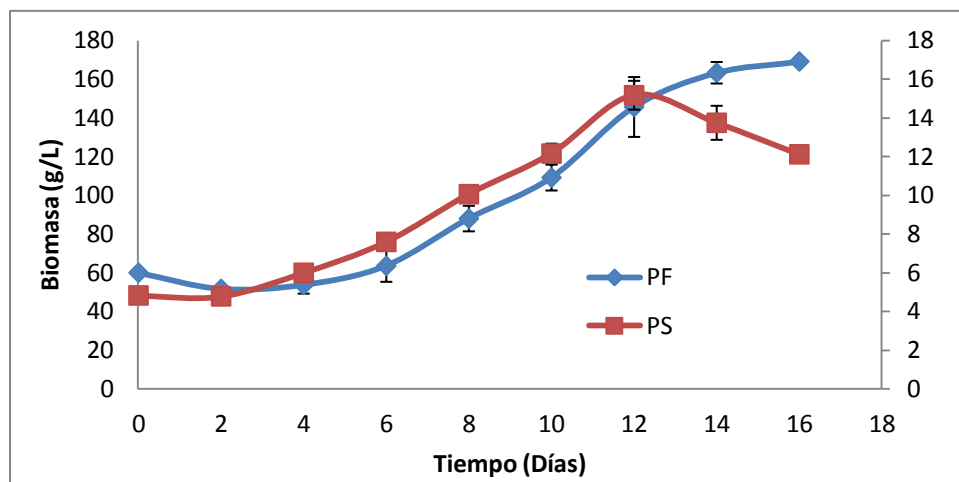


Figura 14. Cinéticas de crecimiento del cultivo de células en suspensión de *C. brasiliense* a partir de inóculos del 6% (p/v).

En la figura 14 se observa que la biomasa en PS presenta una fase de adaptación o fase lag de 4 días, después de la cual inicia la fase de crecimiento exponencial que termina a los 12 días y entra rápidamente a la fase estacionaria al final el crecimiento decae con rapidez después de los 14 días de iniciado el cultivo. Para los datos del peso fresco (PF) la biomasa logra mantenerse más tiempo en la fase estacionaria (16 días), lo cual puede deberse al contenido de agua retenido al momento de filtrar la suspensión celular.

En la literatura no existen reportes del cultivo de células en suspensión de *C. brasiliense*, el único trabajo reportado es el de Pawar y Thengane (2009) con *C. inophyllum*. En las condiciones de cultivo descritas por los autores, la cinética de crecimiento fue lenta (60 días de duración), se observó una fase lag que duró hasta los veinte días, después de los cuales comenzó a crecer lentamente alcanzando la fase de crecimiento exponencial que duró hasta los cincuenta días, tiempo al cual alcanzó la biomasa máxima (1.38 g/L), decayendo hasta el final de cultivo. El cálculo de los parámetros cinéticos en éste primer trabajo permite caracterizar los cultivos para posteriores estudios de producción de metabolitos con actividad biológica de interés.

Las constantes cinéticas calculadas para los cultivos en suspensión de *C. brasiliense* se resumen en la Tabla 1 (promedio de datos de ambas cinéticas

manejadas). Se puede observar que la biomasa máxima se alcanzó a los 12 días y fue de 15.17 g/L, en comparación con la biomasa obtenida en el cultivo de suspensión de *C. inophyllum* que fue de 1.38 g/L a los 50 días en las condiciones de cultivo descritas (Pawar y Thangane, 2009). En cuanto al índice de crecimiento para el cultivo de *C. brasiliense* fue de 2.14, una unidad mayor en comparación con el reportado para *C. inophyllum* (1.4).

Tabla 1. Constantes cinéticas del cultivo de células en suspensión de *C. brasiliense* determinados con base al peso seco de la biomasa celular.

Biomasa inicial (g/L)	Biomasa Máxima (g/L)	Tiempo* (días)	Índice de crecimiento	T _D (días)	Vel. Esp. De crecim. (μ, h ⁻¹)	Rendimiento (Y _{x/s} , g biomasa seca /g sacarosa)
4.82	15.17	12	2.14	5.95	0.1164	0.433

*: Tiempo al cual se alcanza la biomasa máxima.

En cuanto al tiempo de duplicación (T_D), la biomasa se duplicó en aproximadamente 6 días, a una velocidad específica de crecimiento de cerca de 0.12 h⁻¹. Estos datos de índice de crecimiento, T_D y μ se encuentran en concordancia con lo reportado para plantas mexicanas que producen metabolitos con actividad antiinflamatoria como *Tilia americana* variedad *mexicana* y *Spharalcea angustifolia* (Martínez-Almanza, 2015; Pérez-Hernández *et al.*, 2014) además de otras especies vegetales que producen diversos metabolitos como *Cecropia obtusifolia* que produce metabolitos con actividad antidiabética (Nicasio-Torres *et al.*, 2010), *Galphimia glauca* que produce metabolitos con actividad ansiolítica (Osuna *et al.*, 2013) o *Taxus globosa* cuyos metabolitos son

anticancerígenos (Tapia *et al.*, 2013). Por su parte, el rendimiento $Y_{x/s} = 0.433$ g biomasa /g fuente de carbono fue muy cercano al teórico reportado para plantas de 0.5 g biomasa/g sacarosa (Quintero, 1990).

7.3.2 Consumo de azúcares totales por los cultivos de células en suspensión de *C. brasiliense*

Se puede observar en la Figura 15 que existe una relación entre el consumo de azúcares con el incremento de la biomasa en la suspensión celular. Después del día 10 de cultivo, el consumo de azúcares totales se incrementó, utilizándose rápidamente como fuente de energía para satisfacer el metabolismo primario, y posteriormente el consumo es casi total, observándose un decremento de biomasa después del 12° día de cultivo.

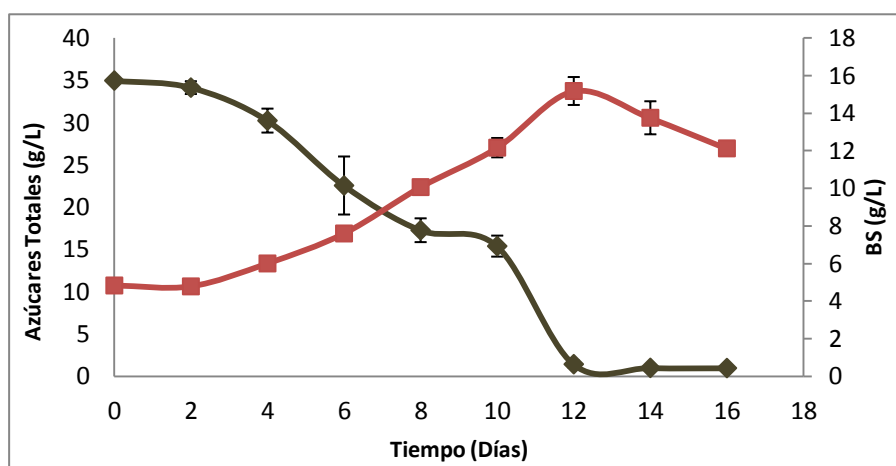


Figura 15. Cinéticas de crecimiento celular y consumo de azúcares totales por los cultivos en suspensión de *C. brasiliense*.

7.4 Determinación de compuestos fenólicos en extractos metanólicos de células en suspensión de *C. brasiliense*

Los extractos metanólicos se obtuvieron como se menciona en la metodología. De dichos extractos se realizó la determinación de compuestos fenólicos totales expresando los resultados como miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de peso seco, como se muestra en la Figura 18.

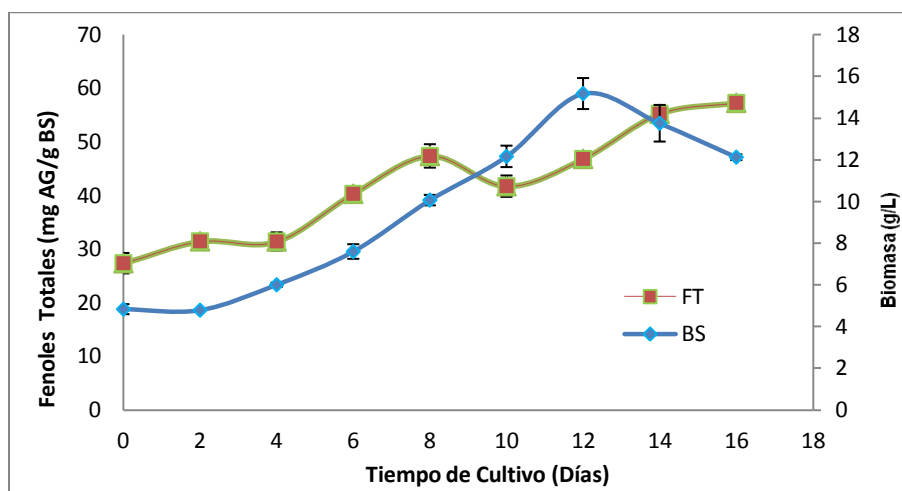


Figura 16. Cinéticas de crecimiento celular y acumulación de compuestos fenólicos en los cultivos en suspensión de *C. brasiliense*.

Se detectó la presencia de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de los cultivos de células en suspensión de *C. brasiliense*, cuya producción está parcialmente asociada al crecimiento. La máxima producción de fenoles se obtuvo a los 16 días de cultivo (57.26 mg AG/ g BS). La literatura reporta la presencia de distintos compuestos fenólicos aislados de diversos órganos de los árboles de *C. brasiliense* colectados en distintos países: triterpenos como el canofilol, la friedelina, aislados del duramen, ácido betulínico de las raíces; flavonoides como quercetina, hiperósido y amentoflavona de las hojas; brasixantona y jacareubina de la corteza del árbol, inclusive dipiranocumarinas como los canalólidos y mammeas de las hojas de *C. brasiliense* (Noldin *et al.*, 2006, García-Zebadúa *et al.*, 2014).

7.5 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de células en suspensión de *C. brasiliense* con el radical DPPH

Se probó la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las células del cultivo en suspensión de *C. brasiliense*. Las muestras presentaron una notable capacidad de inhibición del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), la cual aumentó en correlación a la producción de los compuestos fenólicos Figura 17. La mayor actividad antioxidante expresada como capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC por sus siglas en inglés) en M trolox/ g BS se presenta al final de los 16 días de cultivo, con un valor de 130.54 M trolox/ g BS, la cual parece estabilizarse al alcanzarse la fase de decaimiento.

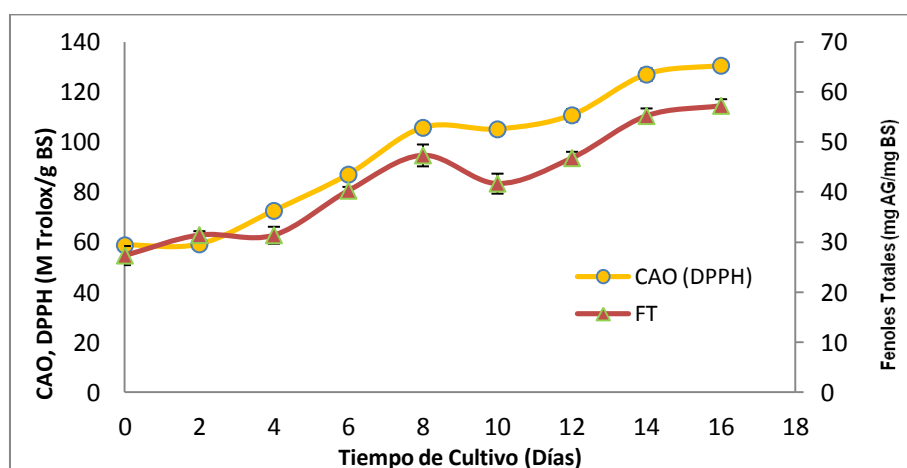


Figura 17. Cinéticas de producción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante expresada como TEAC en los cultivos en suspensión de *C. brasiliense*. Ensayo del DPPH.

La literatura reporta el ensayo de decoloración del DPPH para extractos metanólicos de hoja y tallo de *C. brasiliense*, siendo los extractos metanólicos los que presentaron mayor TEAC en comparación con los extractos metanólicos de hojas y tallos de *C. inophyllum* y *Calophyllum* sp., siendo sólo superados en TEAC por los extractos de acetato de etilo de hojas y tallos de *C. inophyllum* (Mesa-Vanegas *et al.*, 2010).

7.6 Determinación de flavonoides totales en extractos metanólicos de células en suspensión de *C. brasiliense*

El contenido total de flavonoides está asociado con el contenido de fenoles totales como se observa por comparación de las cinéticas de las Figuras 16 y 18. El contenido de compuestos fenólicos disminuye durante el décimo día de cultivo y posteriormente aumenta, observándose su estabilización al pasar la fase de crecimiento exponencial y entrar en la estacionaria y de decaimiento, el mismo comportamiento se observa para el contenido de flavonoides. El máximo contenido determinado fue de 271.75 mg quercetina/ g BS a los 12 días de cultivo (Figura 18).

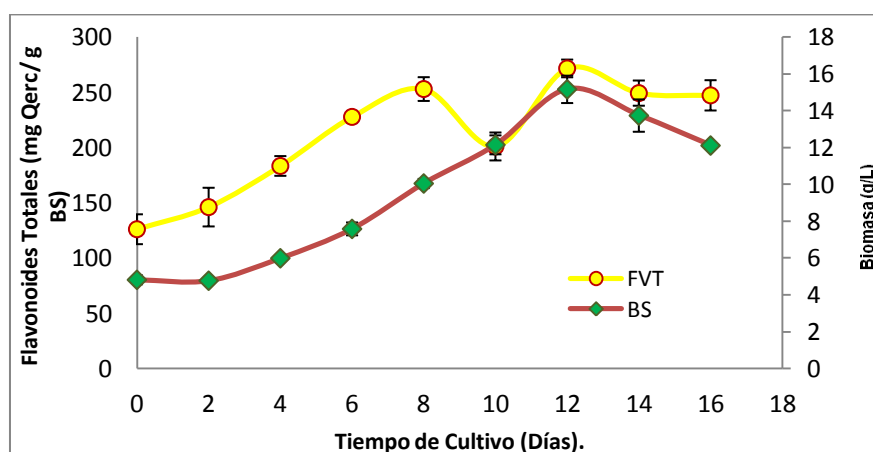


Figura 18. Cinéticas de crecimiento celular y acumulación de flavonoides en los cultivos en suspensión de *C. brasiliense*.

La literatura reporta la presencia de flavonoides en los extractos de hoja y de corteza de tallo de especies del género *Calophyllum* tales como *C. brasiliense* de cuyos extractos de partes aéreas se ha aislado amentoflavona, quercetina e hiperósido (Reyes-Chilpa *et al.* 2004; García-Zebadúa *et al.*, 2014); quercetina y miricetina de extractos del androceo de hojas de *C. inophyllum* (Subramanian y Nair, 1971, citado por Su *et al.*, 2008).

7.7 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de células en suspensión de *C. brasiliense* con el radical ABTS

La capacidad antioxidante medida con el radical ABTS mostró un comportamiento similar al observado durante la producción de compuestos fenólicos y con la actividad medida con DPPH (Figuras 17,18 y 19). Sin embargo, la capacidad de los extractos para reducir el radical ABTS fue menor que con el radical DPPH. La diferencia entre ambos ensayos podría estar en que el ABTS puede disolverse tanto en medio orgánico como acuoso y en ambos puede medirse la actividad dependiendo de la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los compuestos en la muestra (Wojdylo *et al.*, 2007); en tanto que el DPPH sólo puede medirse en medio orgánico (Surveswaran *et al.*, 2007). Así, el contenido de compuestos de naturaleza lipofílica podría ser mayor en *C. brasiliense* respecto al contenido de compuestos de naturaleza hidrofílica. Además, cabe tener en cuenta la preparación de reactivos, ya que el DPPH es más estable en su formación al sólo disolverse en metanol, y el ABTS debe ser activado por mínimo 12 horas con ayuda del persulfato de potasio, por lo que lo hace menos estable.

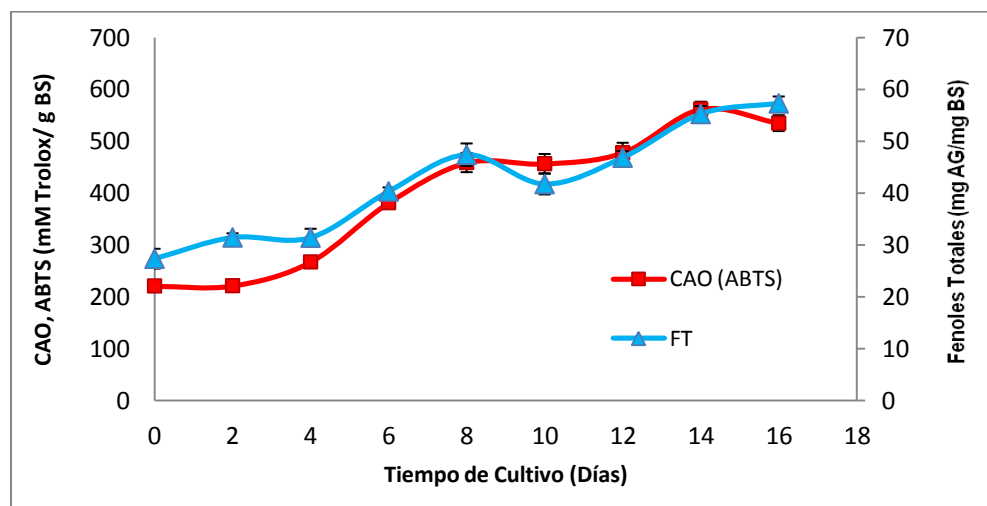


Figura 19. Cinéticas de producción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante expresada como TEAC en los cultivos en suspensión de *C. brasiliense*. Ensayo del ABTS.

7.8 Relación entre la producción de compuestos fenólicos y flavonoides con sus capacidades antioxidantes

La capacidad antioxidante de los extractos metanólicos tienen una correlación directamente proporcional con el contenido de compuestos fenólicos producidos por los cultivos en suspensión de *C. brasiliense*, tanto con el radical DPPH como el ABTS, tal como se observa en la Figura 20; los valores del coeficiente de correlación son cercanos a 1, lo cual indica que al menos en un 93-95% dichas actividades se deben a la producción de fenólicos.

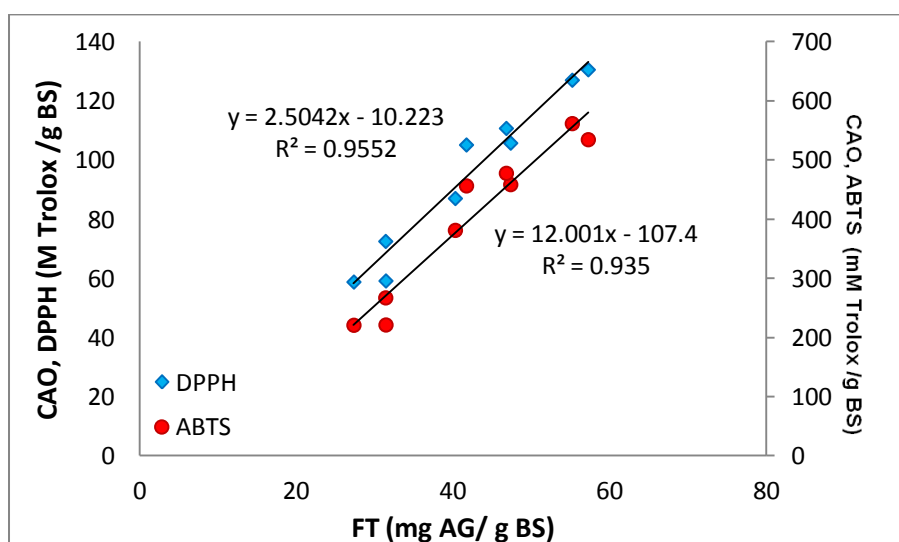


Figura 20. Capacidades antioxidantes en función de la producción de compuestos fenólicos en los cultivos en suspensión de *C. brasiliense*.

Por el contrario, al graficar la capacidad antioxidante en función de la producción de flavonoides, (Figura 21) se observa que los valores del coeficiente de correlación obtenidos para ambos radicales son menores en comparación con los determinados para FT), lo cual indica que las capacidades antioxidantes

observadas podrían deberse en aproximadamente un 70% a los flavonoides y el restante porcentaje a otros compuestos fenólicos.

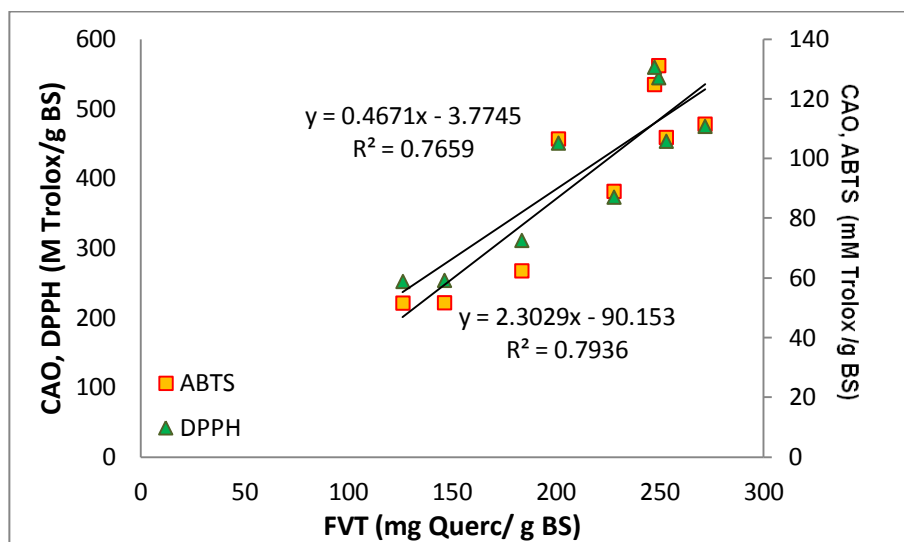


Figura 21. Capacidades antioxidantes en función de la producción de compuestos de tipo flavonoide en los cultivos en suspensión de *C. brasiliense*.

Las determinaciones realizadas a las hojas secas de *C. brasiliense* fueron las mismas que para el cultivo celular. Se puede apreciar en la Tabla 2 que la planta silvestre produjo una cantidad significativamente mayor de compuestos fenólicos (32.38 mg AG/ g BS) en comparación con la planta aclimatada (9.78 mg AG/ g BS). Sin embargo, el cultivo celular produjo 1.76 veces más compuestos fenólicos (57.26 mg AG/ g BS) respecto a la planta silvestre, y 5.85 veces más que la planta aclimatada ($F = 2395.29$, $p < 0.0001$; de acuerdo a la prueba de Tukey_{0.05} 2.1067).

El contenido de flavonoides totales detectado fue significativamente mayor en la planta silvestre (157.8 mg quercetina/ g BS) respecto a la planta aclimatada (58.53 mg quercetina/ g BS). La producción de flavonoides por el cultivo celular fue de 1.72 y 4.64 veces mayor respecto a lo producido por la planta silvestre y climatada ($F = 663.93$, $p < 0.0001$; de acuerdo a la prueba de Tukey_{0.05} 15.941).

Tabla 2. Comparación del contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidades antioxidantes de los extractos de hojas de plantas silvestre, aclimatada y de la suspensión celular de *C. brasiliense*.

Fuente Biológica	Fenoles Totales (mg AG/g BS)	Flavonoides totales (mg Querc/g BS)	CAO DPPH (M Trolox/g BS)	CAO ABTS (mM Trolox/g BS)
Planta Silvestre	32.38 ± 0.87	157.82 ± 7.42	96.25 ± 3.87	193.66 ± 3.41
Planta Aclimatada	9.78 ± 0.62	58.52 ± 7.44	38.79 ± 1.54	59.57 ± 9.2
Suspensión celular (16 días)	57.26 ± 1.32	271.75 ± 8.0*	130.54 ± 1.98	534.53 ± 15.30

*Máxima producción a los 12 días de cultivo, según la cinética de producción.

Las capacidades antioxidantes determinadas tanto con DPPH como con ABTS fueron significativamente mayores en los extractos metanólicos de hojas de planta silvestre respecto a los extractos de hoja de planta aclimatada. La capacidad con el radical DPPH de los extractos celulares fue de 130.542M Trolox/ g BS, que representa 1.35 veces y 3.36 veces más respecto a las CAO's de la planta silvestre y la aclimatada ($F = 997.63$, $p < 0.0001$; de acuerdo a la prueba de Tukey_{0.05} 6.3683). De la misma forma, se observa una relación entre la producción de fenólicos y sus CAO's medidas con ABTS, donde la mayor actividad (534.532 mM Trolox/g BS) se asoció con la mayor producción de fenólicos en el cultivo celular *in vitro* (57.262 mg AG/ gBS). La CAO con ABTS de la suspensión celular fue casi tres veces mayor respecto a la planta silvestre y casi nueve respecto a la planta aclimatada, lo cual concuerda con lo descrito anteriormente con el radical DPPH ($F = 1624.74$, $p < 0.0001$; de acuerdo a la prueba de Tukey_{0.05} 26.359).

7.9 Aislamiento y purificación de ácido apetalico, canofilol y calanólidos del extracto acetónico de hojas de *C. brasiliense*

De acuerdo a lo reportado por Huerta-Reyes *et al.*, 2004 y Bernabé-Antonio *et al.*, 2010, en el extracto de n-hexano de hojas de *C. brasiliense* se aislaron a los calanólidos, compuestos activos contra VIH-1. Para la búsqueda de estos compuestos en las células en suspensión se decidió cuantificarlos y para ello fue necesaria la purificación. En un primer paso las fracciones eluidas con acetona, metanol y agua fueron plaquedas en CCF y eluidas en una mezcla de disolventes de media polaridad a alta polaridad, para conocer el contenido químico. La presencia de algunos metabolitos comunes en plantas fue identificada por comparación directa con estándares como los terpenos β -sitosterol y ácido oleanólico, así como el flavonoide quercetina. Debido a que los calanólidos tienen absorciones de 300-365 nm se buscaron compuestos que absorbieran la luz UV a esta longitud de onda, el trabajo se enfocó en su separación. La identificación preliminar por CCF no mostró presencia de β -sitosterol ni de quercetina en los diferentes extractos, pero sí la presencia de ácido oleanólico principalmente en el extracto acetónico de hojas (Figuras 22 y 23).

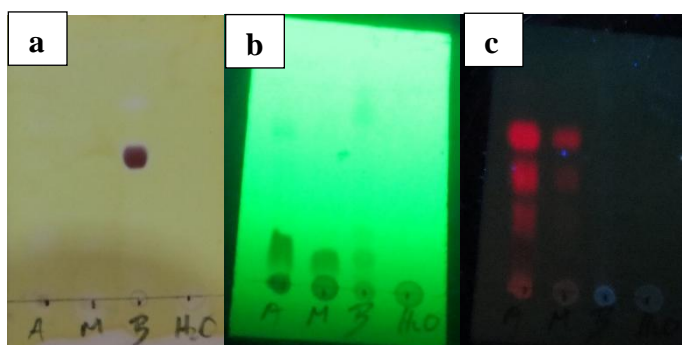


Figura 22. CCF de los extractos de hojas de *C. brasiliense* corrida en el sistema Hex-MeOH (7:3). A: acetónico; M: metanólico, H₂O: acuoso. β : estándar de β -sitosterol, (a) placa revelada con solución de Sulfato cérico, (b) placa observada bajo luz UV de onda corta (254 nm), (c) placa observada bajo luz UV de onda larga (365 nm).



Figura 23. CCF de los extractos de hojas de *C. brasiliense*. Sistema: diclorometano-MeOH (9:1). A: acetónico; M: metanólico, H₂O: acuoso. Q: estándar de quercetina; O: estándar de ácido oleanólico.

Con base a la CCF se decidió trabajar en la separación química con el extracto acetónico debido a que se observan por lo menos cuatro compuestos que absorben la luz UV (Figura 22c). Este extracto se adsorbió en sílica gel (105 g) de fase normal (Columna 1, C1) y se eluyó con un sistema hexano-acetato de etilo en un gradiente de polaridad creciente de 1:0 hasta 5:5; se obtuvieron 40 fracciones de un volumen de 50 mL cada una. Las fracciones fueron reagrupadas de acuerdo a la similitud de los compuestos observados en CCF en 8 sub-fracciones. En la fracción 20 (CbC1F20, Compuesto **1**) se observó un precipitado blanco que fue lavado con metanol y disuelto en diclorometano. La CCF muestra la presencia de un terpeno diferente al β -sitosterol (Figura 24). Este compuesto se sometió a análisis de RMN de ¹H y ¹³C.

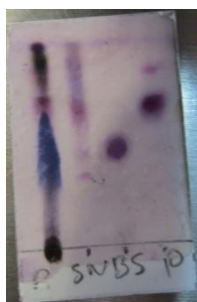


Figura 24. CCF de fase normal. Corrida hexano-acetato de etilo (7:3). R: extracto acetónico de referencia. SN: fracción 20 (Hexano –AcOEt 8:2) solución madre. β s: β -sitosterol. 10: precipitado de la fracción 20 (Hexano –AcOEt 80:20). Revelador: 4-hidroxibenzaldehído.

Análisis espectroscópico del compuesto 1.

El análisis de la RMN de ^1H , nos indicó la presencia de 7 metilos a campo alto y un grupo de metileno (CH_2) de un alcohol (Figura 25).

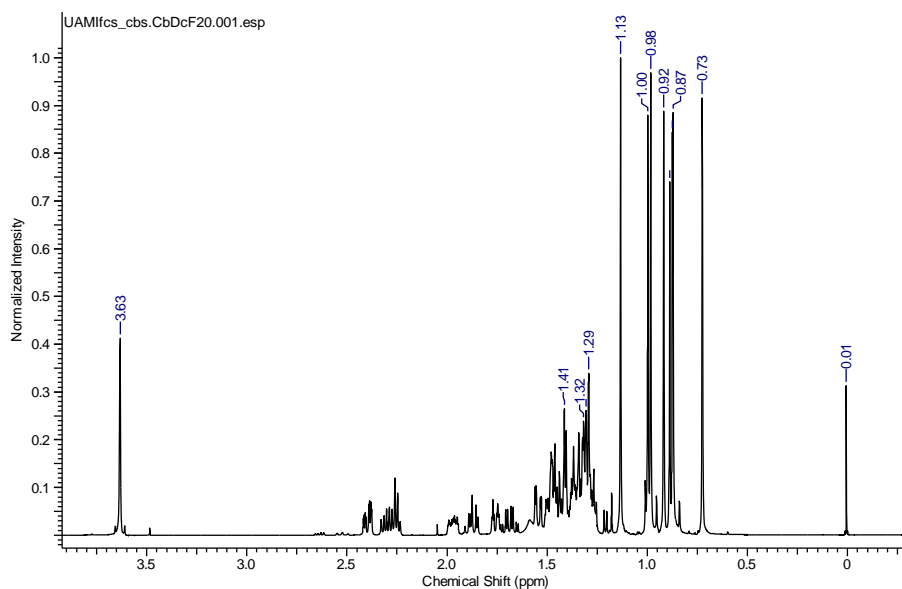


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H , del compuesto **1** aislado de hojas de *C. brasiliense*.

El espectro de RMN de ^{13}C , corroboró la presencia de 7 metilos, el carbono de un alcohol y un carbonilo.

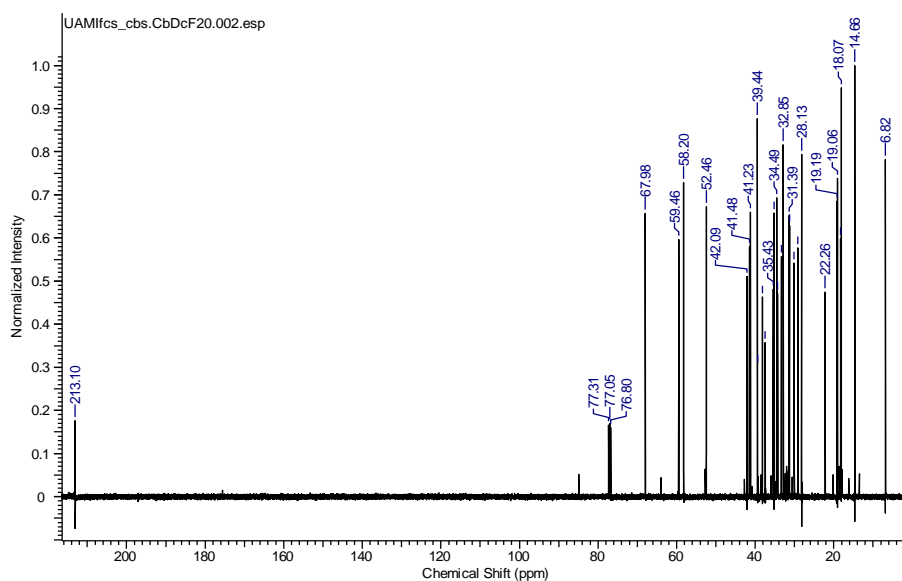


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C , del compuesto **1** aislado de hojas de *C. brasiliense*.

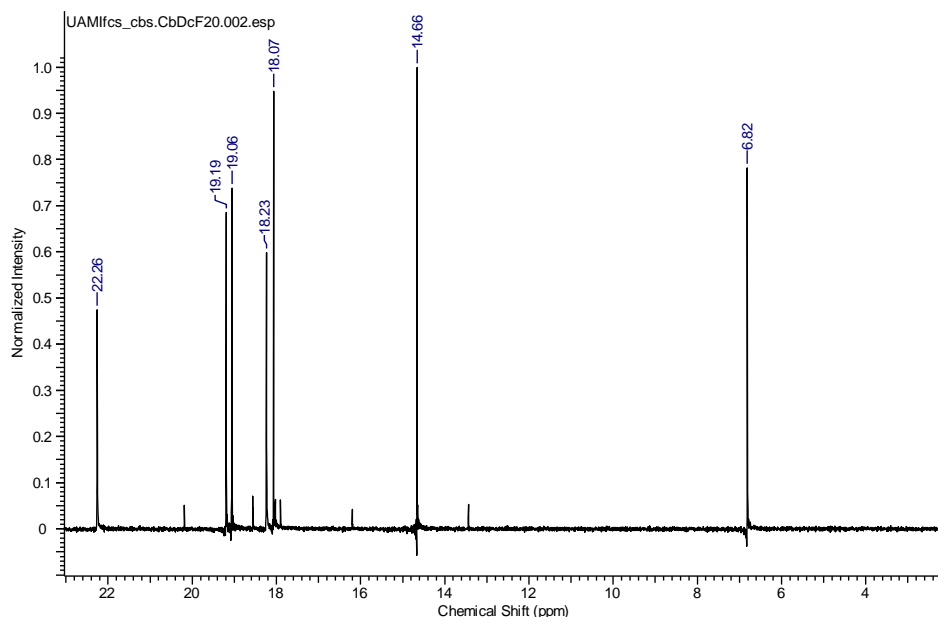


Figura 26A. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C , del compuesto **1** aislado de hojas de *C. brasiliense*.

De acuerdo al análisis de los datos de RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 3) y a la comparación con lo descrito por Thuy *et al.*, (2007), este compuesto (Figura 27) corresponde al canofilol (**1**).

Tabla 3. Valores de desplazamiento químico de ^{13}C para el canofilol (**1**).

Comparativo con los datos experimentales obtenidos.

CARBONO NO.	Canofilol	$\delta^{13}\text{C}$ (400 MHz, DOCl_3), (1)
	$\delta^{13}\text{C}$ DESCRITOS	
1	22.7	22.21
2	41.51	41.43
3	213.13	213.04
4	58.23	58.15
5	42.11	42.04
6	41.25	41.18
7	18.25	18.18
8	52.5	52.41
9	37.47	37.40
10	59.49	59.41
11	34.51	35.38
12	28.15	30.04

13	38.16	39.3
14	37.47	38.09
15	29.14	31.21
16	31.26	29.07
17	35.17	35.10
18	39.38	39.39
19	33.38	34.44
20	30.1	32.80
21	31.41	31.34
22	41.51	33.31
23	6.82	6.77
24	14.67	14.61
25	19.2	18.02
26	19.08	19.01
27	18.08	19.14
28	68.04	67.93
29	34.26	32.80
30	32.85	34.21

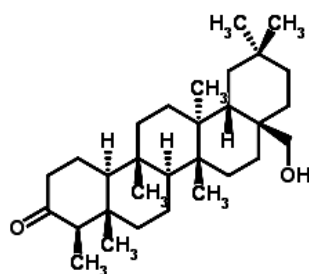


Figura 27. Estructura química del canofilol (1) aislado de hojas de *C. brasiliense*.

Por otro lado, la fracción reunida 1 de C1 (C1R1) (950 mg) se adsorbió en 2.5 g de sílica gel de fase normal para ser separada por cromatografía en columna (CC). Se utilizó un sistema de elución de hexano-acetato de etilo en un gradiente de 1:0 hasta 5:5., obteniendo 36 fracciones que fueron reagrupadas en 7 sub-fracciones (R1-R7) de acuerdo a la similitud en los compuestos. En la fracción R3 se observó un precipitado blanco que fue lavado con metanol y comparado con el canofilol por CCF demostró ser este compuesto aislado anteriormente (Figura 28).

La fracción R7 de C2 (250 mg), se preparó para una columna de fase reversa (RP18, C3), el sistema de elución empleado fue de acetonitrilo-agua 95:5 hasta acetonitrilo 100% se obtuvieron 22 fracciones. En las primeras fracciones (2-3) se

observó un compuesto azul oscuro al revelarse con 4-hidroxibenzaldehído eluída con un sistema acetonitrilo-agua 95:5 (Figura 29). Estas fracciones (2 y 3) fueron reunidas (R2) y concentradas en un rotavapor y se realizó el análisis de RMN de ^1H y ^{13}C .

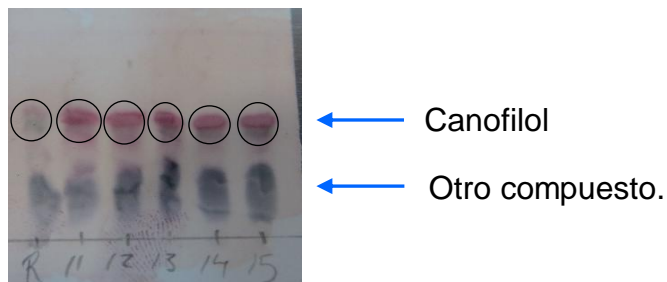


Figura 28. CCF de fase normal. Sistema: Hexano-AcOEt (7:3). R: referencia, unión de las fracciones 21-25 de C1; 11 a 15: fracciones eluidas con hexano-AcOEt 85:15. Revelador: 4-hidroxibenzaldehído.

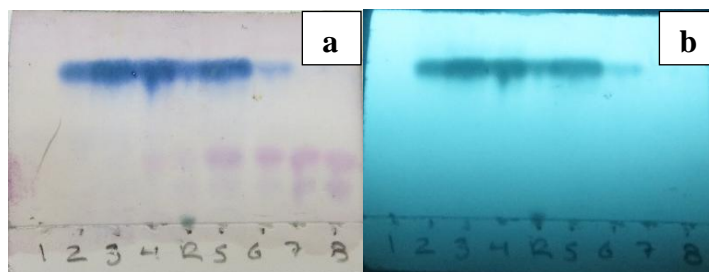


Figura 29. CCF de fase reversa. Sistema: acetonitrilo-agua (95:5) a) placa revelada con 4-hidroxibenzaldehído. B) placa observada bajo luz $\text{UV}\lambda=254\text{ nm}$. R: referencia reunión de fracciones 31-32 C2; fracciones 1-3 eluidas con acetonitrilo-agua 95:5; fracciones 4-8 eluidas con acetonitrilo 100%.

Análisis espectroscópico del compuesto 2.

El análisis de RMN de ^1H , mostró la presencia de un sistema AB en δ 6.60 (1-H, d, $J= 10$ Hz) de doble enlace (Figura 30).

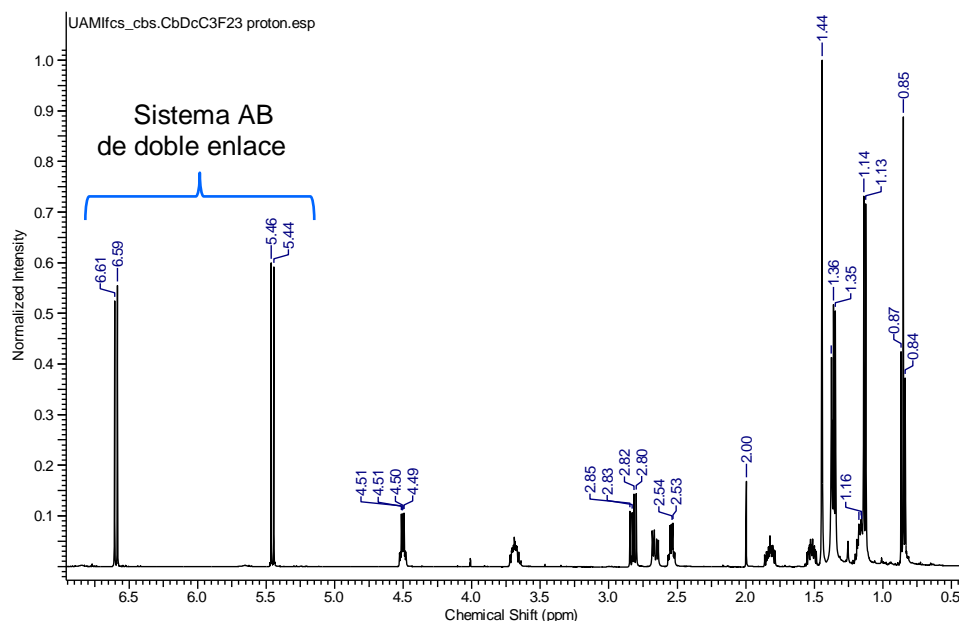


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H , del compuesto **2** aislado de hojas de *C. brasiliense*.

Se observó también otra señal base de oxígeno como doble de cuarteto con constante de acoplamiento de 3.28 y 7.25 Hz, que indica una posición *cis* de los hidrógenos (H-2 y H-3) (Figura 30A, incisos a) y c)) éste a su vez se acopla en COSY con dos señales, una doblete en δ 1.34 con una $J = 6.56$ Hz para tres hidrógenos, que es asignado a un metilo de H-15 (ver figura 30A, inciso b)), y la otra una señal doble de cuarteto en δ 2.54 con una $J = 3.28$ Hz para un hidrógeno que se asigna a H-3 (Figura 30A, inciso c)), que a su vez este se acopla a un metilo en δ 1.13 con una $J = 7.25$ Hz, que es asignado a H-16 (Figura 30A, inciso b)) (Ajithabai *et al.*, 2012).

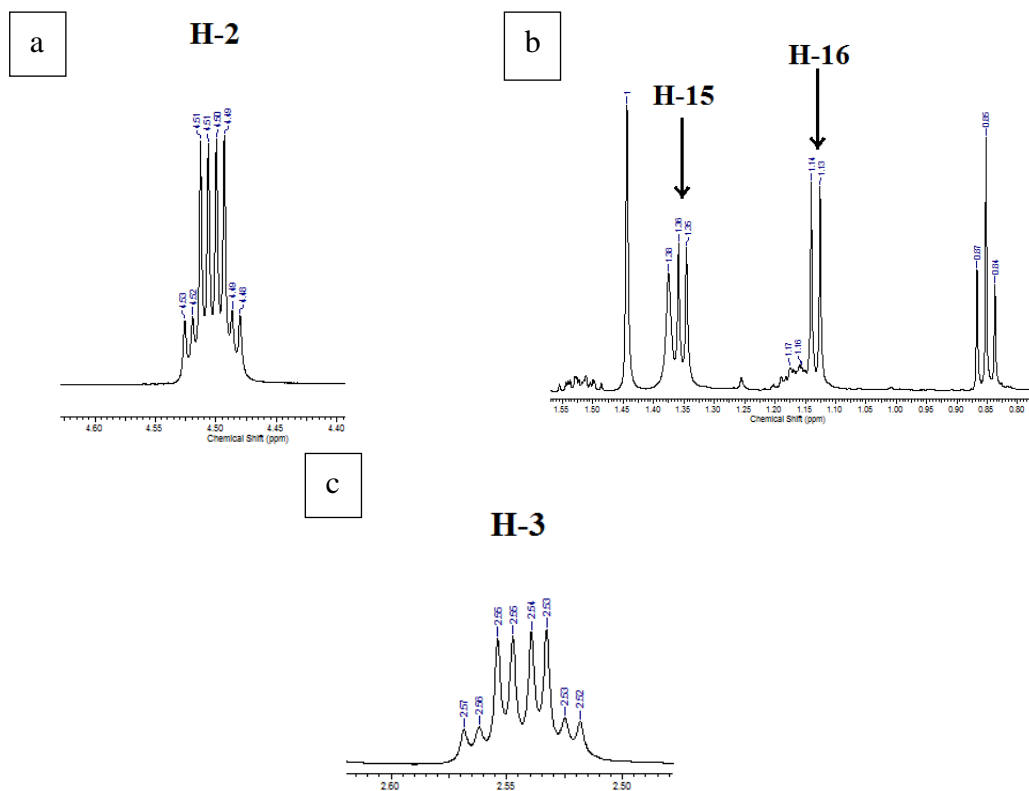


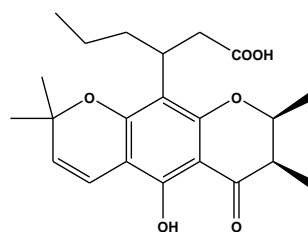
Figura 30A. Expansión del espectro de RMN de ^1H , del compuesto (2) aislado de hojas de *C. brasiliense*.

De acuerdo al análisis de los datos de RMN (Tabla 4) y la comparación con lo descrito en la literatura (Plattner *et al.*, 1974; Huerta-Reyes *et al.*, 2004) este compuesto corresponde al ácido apetalico (2) (Figura 31).

Tabla 4. Valores de desplazamiento químico de ^{13}C para el ácido apetalico (2). Comparativo con los datos experimentales obtenidos.

CARBONO NO.	Ácido apetalico	$\delta^{13}\text{C}$ (400 MHz (DOCl_3), (2)
	$\delta^{13}\text{C}$ DESCRITOS	
2	79	78.18
3	45.9	44.18
4	199.5	201.09
5	157.2	157.28
6	116	115.61

7	125.7	125.62
8	78.3	76.04
10	102	102.55
11	160	160.50
12	102.8	101.23
13	109.5	108.88
14	160	160.50
15	19.7	16.21
16	10.7	9.27
17	28.5	28.07
18	28.5	28.47
19	30.8	30.48
20	38.9	38.63
21	173.7	179.38
22	35.8	35.45
23	21.1	20.76
24	14.3	13.96



Ácido apetalico

Figura 31. Estructura química del ácido apetalico (**2**) aislado de hojas de *C. brasiliense*.

La fracción 6, se separó en una columna de fase reversa la cual fue eluída con una mezcla de acetonitrilo-agua 5:5, hasta 4:6, obteniendo 20 fracciones de 12 mL. En las fracciones 9-13 se observó un punto de color azul al revelarse con 4-hidroxibenzaldehído (Figura 32). Estas fracciones fueron reunidas y concentradas a presión reducida obteniendo 8 mg del compuesto (**3**). Este compuesto se analizó por RMN de ^1H y ^{13}C para su identificación.

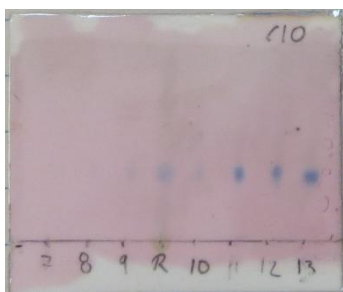


Figura 32. CCF de fase reversa. Sistema acetonitrilo-agua 9:1. Fracción 7: acetonitrilo-agua 5:5; fracciones 8 a 13: acetonitrilo-agua 4:6; R: referencia F2C5. Revelador: 4-hidroxibenzaldehído.

El espectro de RMN de ^1H y ^{13}C (Figuras 33, 34, 34A y 34B), mostró señales características de una dipiranocumarina (Tablas 5 y 6), esto de acuerdo a los datos descritos en la literatura (Kashman *et al.*, 1992), resultando este compuesto como el (-)-calanólido B y que de acuerdo al análisis de HPLC se encuentra mezclado en una proporción (80:20) con el (+)-calanólido A.

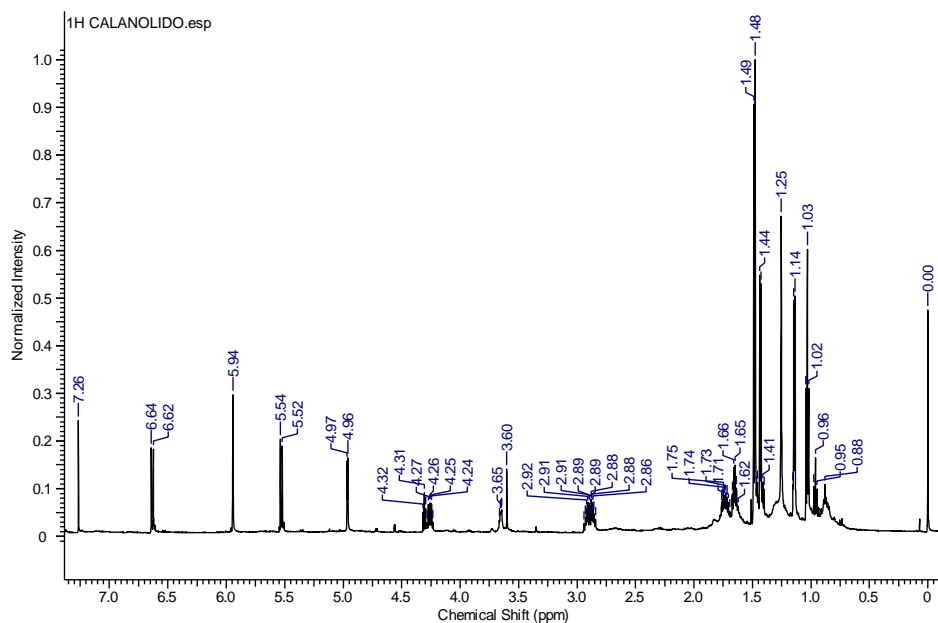


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H , del compuesto (3) aislado de hojas de *C. brasiliense*.

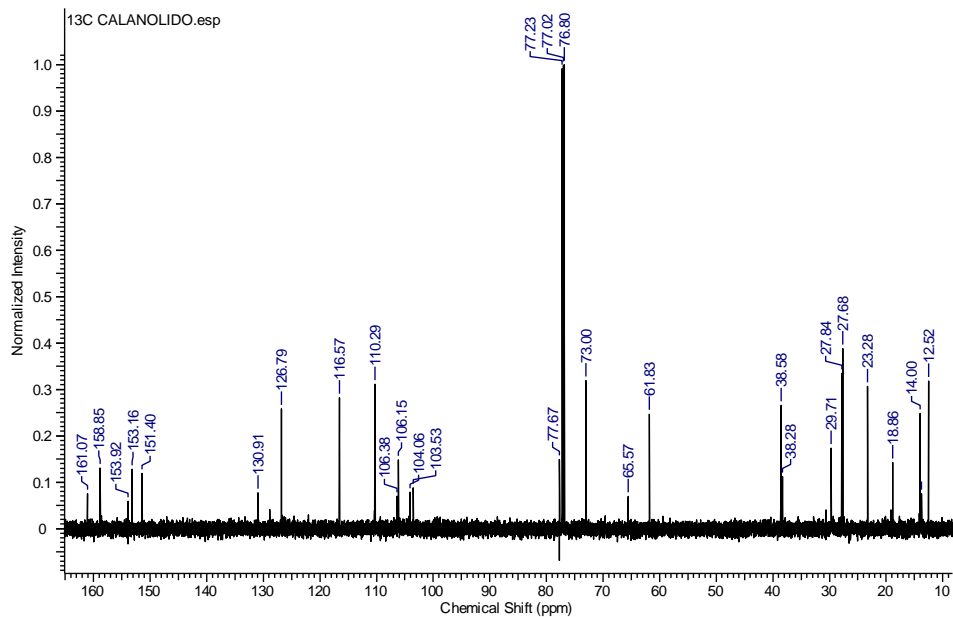


Figura 34. Espectro de RMN de ¹³C, del compuesto (3) aislado de hojas de *C. brasiliense*.

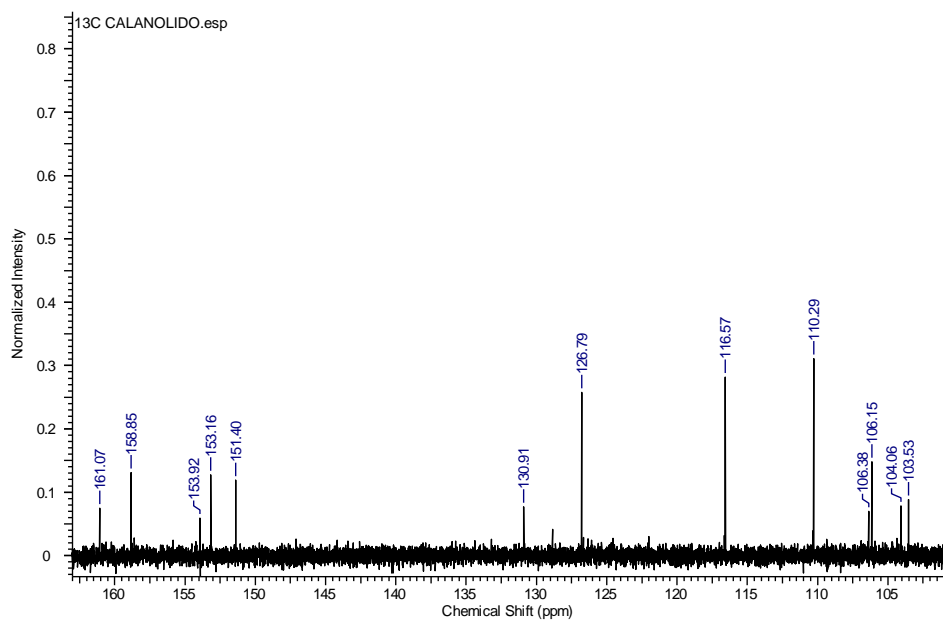


Figura 34A. Expansión del espectro de RMN de ¹³C, del compuesto (3) aislado de hojas de *C. brasiliense*.

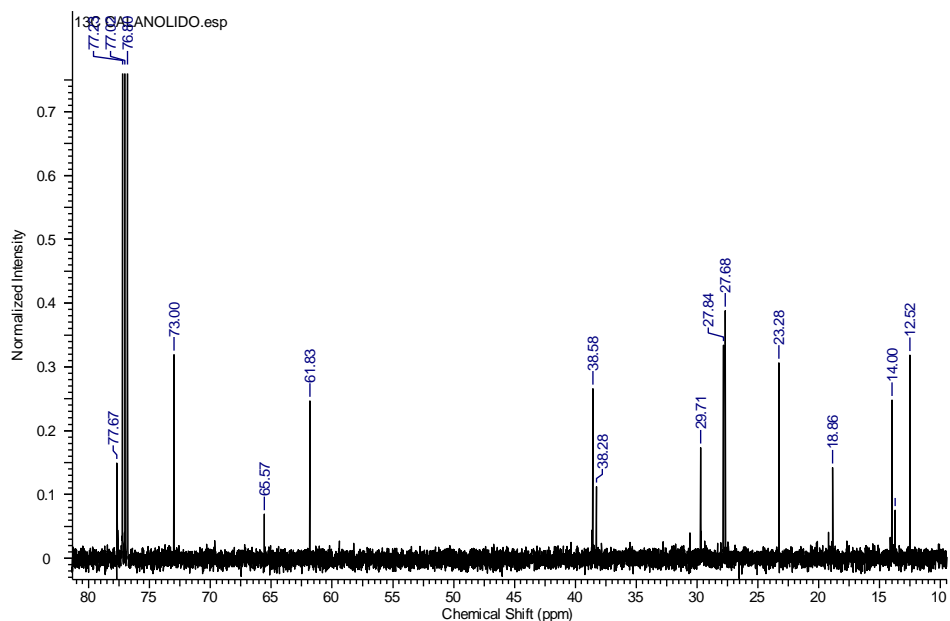


Figura 34B. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C , del compuesto **(3)** aislado de hojas de *C. brasiliense*.

Tabla 5. Valores de desplazamiento químico de ^1H para los calanólidos A, B y C. Comparativo con los valores experimentales obtenidos.

PROTÓN NO.	δ ^1H DESCRITOS.			δ ^1H (600 MHz, DOCl_3), (3) .
	Calanólido A	Calanólido B	Calanólido C	
3	5.92, t, J= 1.0 Hz	5.93, t, J= 1.0 Hz	5.94, t, J= 1.0 Hz	5.94, s
4	—	—	—	—
4 ^a	—	—	—	—
4b	—	—	—	—
6	—	—	—	—
7	5.52, d, J=9.5 Hz	5.51, d, J=10 Hz	5.56, d, J=10.5 Hz	5.53, d, J= 9.59 Hz
8	6.60, d, J= 9.5 Hz	6.61, d, J= 10 Hz	6.83, d, J= 10.5 Hz	
8a	—	—	—	6.63, d, J= 10.05 Hz
8b	—	—	—	—
10	3.90, dq, J= 9.0, 6.5 Hz	4.24, dq, J= 10.5, 6.5 Hz	4.32, dq, J= 2.5, 7.0 Hz	4.25, dq, J= 6.4, 10.9 Hz
11	1.91, ddq, J=9.0, 8.0, 6.5 Hz	1.73, ddq, J=10.5, 3.3, 6.5 Hz	2.22, ddq, J=2.5, 6.0, 7.0 Hz	1.70-1.76, m
12	4.70, d, J= 8.0 Hz	4.95, d, J= 3.3 Hz	5.06, d, J= 6.0, 1.5 Hz	4.96, d, J= 3.20 Hz
12 ^a	—	—	—	—
12b	—	—	—	—
13 a			2.88, ddd	2.84-2.94, m
13 b	2.87, m	2.87, m	2.79, ddd	2.84-2.94, m

14 a 14 b	1.63 m	1.63 sext, J= 7.0 Hz	1.60 sext, J= 7.0 Hz	1.65, sext, J= 7.31 Hz 1.65, sext, J= 7.31 Hz
15	1.01, t, J= 7.5 Hz	1.01, t, J= 7.5 Hz	0.98, t, J= 7.5 Hz	1.03, d, J= 7.31
16	1.44 s	1.46 s	1.46 s	1.48, s
17	1.49 s	1.47 s	1.46 s	1.49, s
18	1.44, d, J= 6.5 Hz	1.41, d, J= 6.0 Hz	1.41, d, J= 7.0 Hz	1.43, d, J= 6.40
19	1.13, d, J= 6.5 Hz	1.12, d, J= 7.0 Hz	1.06, d, J= 7.5 Hz	1.14, d, J= 7.31

Tabla 6. Valores de desplazamiento químico de ^{13}C para los calanólidos A, B y C. Comparativo con los valores experimentales obtenidos.

CARBONO NO.	$\delta^{13}\text{C}$ DESCRITOS			$\delta^{13}\text{C}$ (600 MHz DOCl_3), (3).
	Calanólido A	Calanólido B	Calanólido C	
2	160.4	160.9	160.8	161.07
3	110.1	110.3	111.1	110.29
4	158.9	158.7	158.6	158.85
4 ^a	104	103.5	103.5	103.53
4b	151.1	151.4	150.6	151.4
6	76.6	77.7	78.8	77.67
7	126.9	126.7	126.9	126.79
8	116.5	116.5	115.7	116.57
8 ^a	106.3	106.1	102.9	106.15
8b	153.1	153.9	152.6	153.92
10	77.7	73.0	75.6	73
11	40.5	38.6	35.1	38.58
12	67.2	61.9	65.9	61.83
12 ^a	106.3	106.2	109.2	106.38
12b	154.4	153.1	154.6	153.16
13	38.7	38.2	38.9	38.28
14	23.3	23.3	23.2	23.28
15	14	14	14	14
16	27.4	27.8	28.2	27.84
17	28	27.7	28.4	27.68
18	18.9	18.9	16.8	18.86
19	15.1	12.5	7.2	12.52

7.10 Cuantificación de ácido apotético y (-)-calanólido B en el extracto de diclorometano de células en suspensión de *C. brasiliense*

El extracto de diclorometano de la biomasa (264.2 mg, 1.24 %), fue inyectado en el HPLC y analizado con el Método 1 y mostró el siguiente cromatograma:

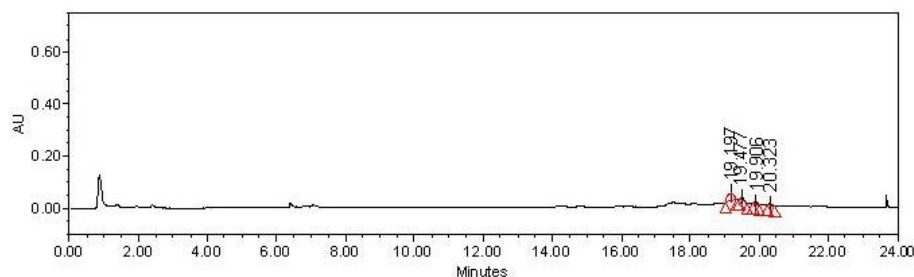


Figura 35. Cromatograma del extracto de diclorometano de la biomasa de *C. brasiliense*.

El análisis comparativo por HPLC del extracto de diclorometano de la biomasa con los tiempos de retención del ácido apotético ($T_r = 19.52$ min) y el (-)-calanólido B ($T_r = 22.13$ min) (Figuras 35 y 36) no muestra la presencia de ambos compuestos en la biomasa. Debido al alto contenido de carbohidratos provenientes de los residuos de medio de cultivo en la biomasa celular, el extracto de diclorometano se purificó a través de una cromatografía en columna. El extracto se adsorbió con sílica gel de fase normal (70-230 mesh) y se inició la elución con diclorometano al 100% colectando 200 mL (fracción 1) y un avance de polaridad con una mezcla diclorometano-metanol 9:1 (200 mL, fracción 2) y finalmente un lavado con metanol 100% (300 mL, fracción 3). Las dos primeras fracciones se analizaron por HPLC, haciendo un comparativo con el cromatograma del extracto inicial. De acuerdo al cromatograma de HPLC en la fracción 1, se observa la presencia de ácido apotético con $T_r = 19.52$ min (Figura 37).

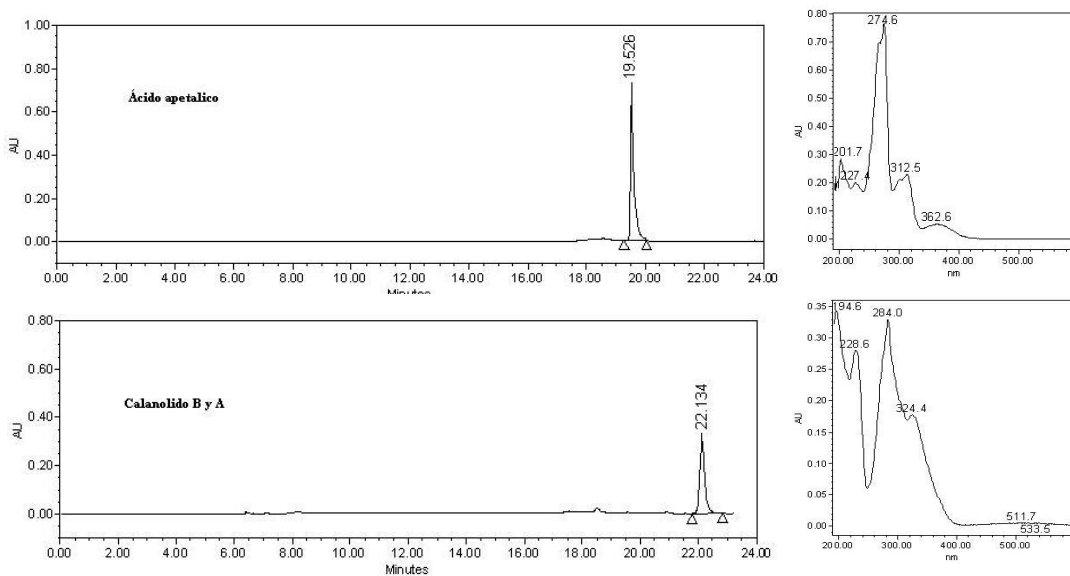


Figura 36. Cromatogramas y espectros de absorción del ácido apetalico (**2**) y del (-)-calanolido B (**3**) con trazas del (+)-calanolido A.

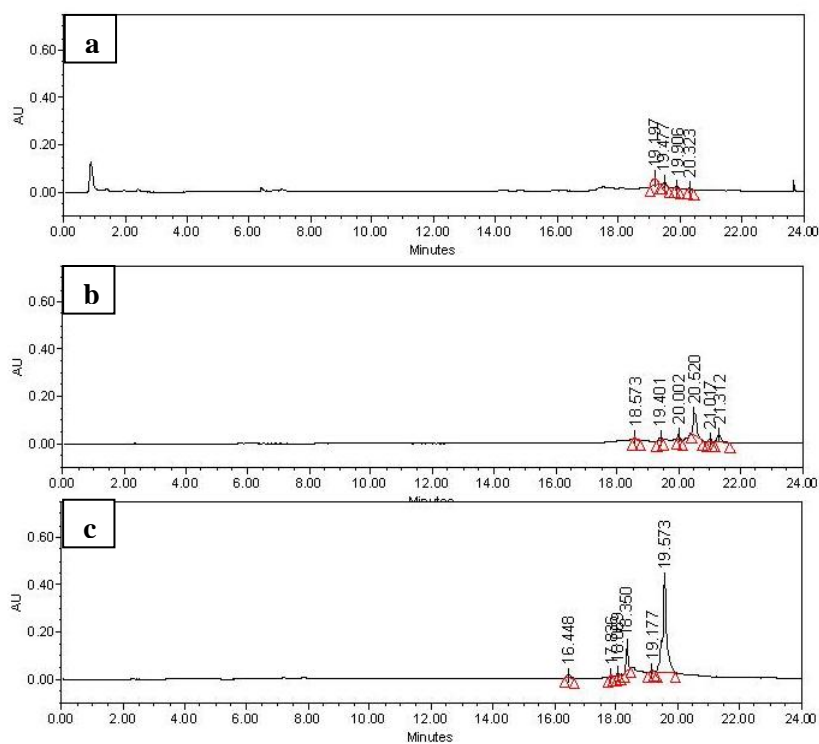


Figura 37. Cromatogramas comparativos del contenido de ácido apetalico (Tr = 19.52 min) y (-)-calanolido B (Tr = 22.13 min) en: a) extracto de diclorometano íntegro; b) fracción 1 (100%, CH₂Cl₂) y c) fracción 2 (CH₂Cl₂-MeOH 9:1).

La cuantificación del ácido apético se realizó usando la curva de calibración descrita en la metodología con ayuda de las áreas de los picos de los respectivos cromatogramas y resolviendo la respectiva ecuación, dando como resultado que el compuesto **2** (ácido apético) se encuentra en 0.0235 mg /g BS en la suspensión celular de *C. brasiliense* y en 6.96 mg/g en el extracto acetónico de hojas de planta silvestre.

Por otra parte, el (-)-calanólido B con trazas del (+)-calanólido A no fue observado en alguno de los dos tratamientos realizados al extracto de diclorometano de la biomasa (fracción 1 y fracción 2). Con la finalidad de reducir el Tr del (-)-calanólido B para poder observarlo en los extractos de los cultivos celulares se modificó el Método 2, logrando reducirlo a 10.54 min en comparación con el obtenido con el Método 1 (Figura 38) sin observar cambio en su espectro de absorción.

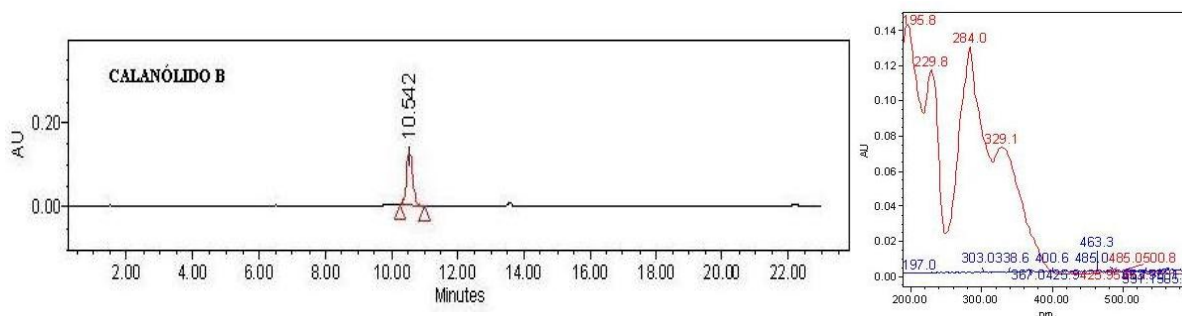


Figura 38. Cromatograma y espectro de absorción del (-)-calanólido B (**3**) obtenidos con el Método 2.

Los extractos de diclorometano tratados se analizaron por HPLC utilizando el Método 2, sin observarse la presencia de los calanólidos (Figura 39) ya que al comparar los Tr de los compuestos eluidos ninguno coincide con el estándar de (-)-calanólido B (Tr = 10.54 min), incluso al comparar los espectros de absorción de dichos compuestos, estos tampoco coinciden con el observado para el estándar (compuesto **3**). Por lo anterior podemos concluir que los cultivos de células en

suspensión de *C. brasiliense* no producen estos compuestos en estas condiciones de cultivo.

En cambio, se observó la presencia de dos compuestos mayoritarios con Tr de 12.67 y 13.57 min en la fracción 1, y dos compuestos del tipo diterpeno en 12.55 y 19.58 min respectivamente en la fracción 2. Dichos compuestos también se observaron en CCF (Figura 41).

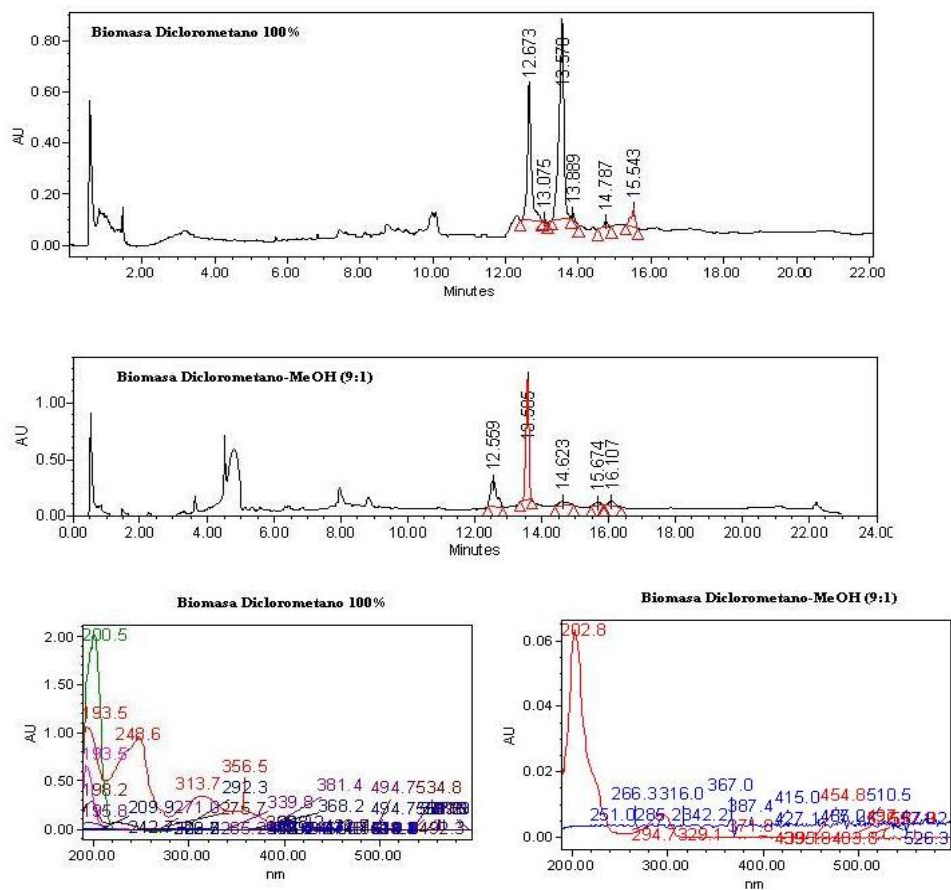


Figura 39. Cromatogramas y espectros de absorción de los extractos de diclorometano de la biomasa de *C. brasiliense* tratados con diclorometano y diclorometano-metanol 9:1. Método 2.

Debido a que el canofilol no se observó en el método 1, se propuso un segundo método que permitió identificar el canofilol en los extractos de la biomasa de *C. brasiliense* (Figura 40). Comparando su Tr = 16.16 min con los Tr de los compuestos separados en los extractos, observamos que sólo la fracción 1,

mostró la presencia de canofilol (Tr = 16.10 min) aunque en muy baja cantidad (Figura 39). Con la finalidad de cuantificar el compuesto (1), se trató de hacer una curva de calibración sin conseguirlo debido a que el canofilol presentó poca solubilidad en metanol para poder analizarse con el Método 2, observándose un cromatograma con baja resolución en sus picos, haciendo necesario adaptar un nuevo método con una columna para HPLC de fase normal para cuantificar su presencia en los cultivos *in vitro* de *C. brasiliense*.

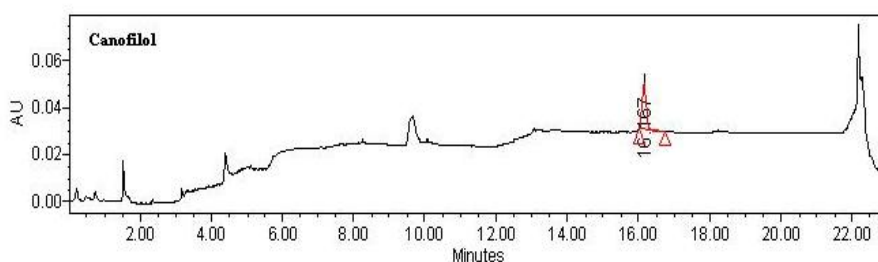


Figura 40. Cromatograma y espectro de absorción del canofilol (Tr = 16.16 min).

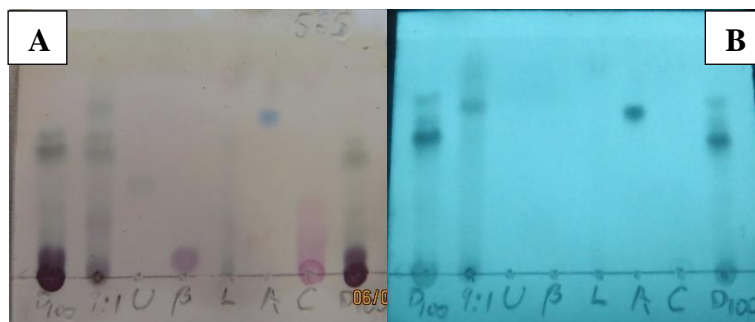
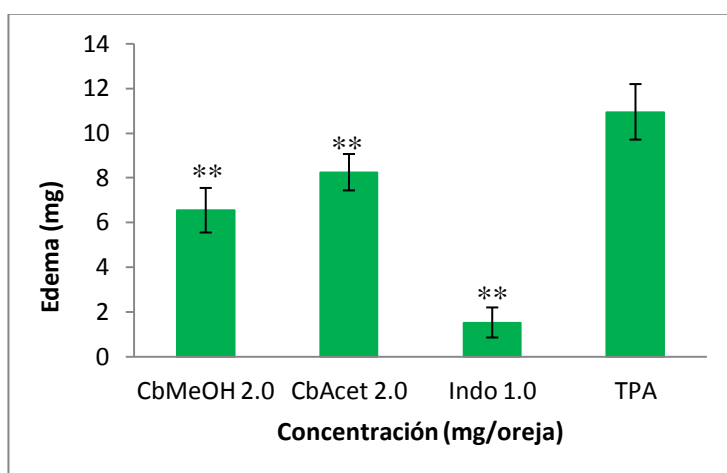


Figura 41. CCF de fase reversa. Sistema metanol-acetonitrilo 5:5. A: revelador 4-hidroxibenzaldehído. B: placa observada a longitud UV de onda corta. D100: fracción 100% diclorometano; 9:1: fracción diclorometano-metanol 9:1; U: referencia de ácido ursólico; β : referencia de β sitosterol; L: lavado 100% MeOH; A: ácido apetalico; C: canofilol.

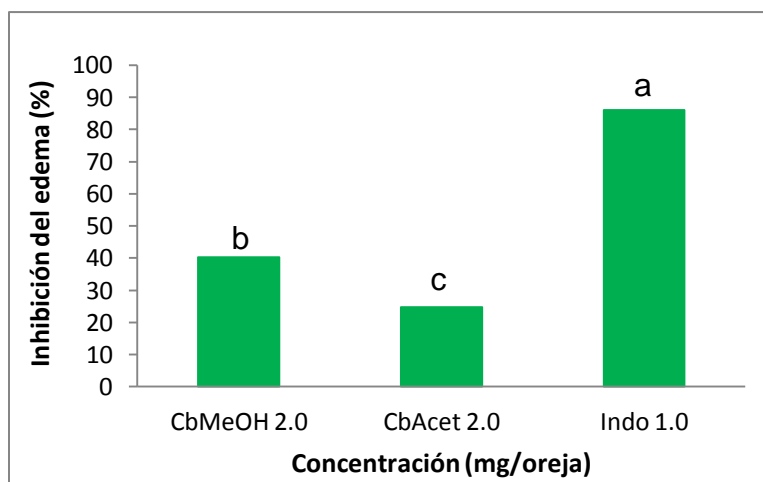
7.11 Actividad antiinflamatoria: Modelo de edema auricular inducido con TPA

Se determinó la actividad antiinflamatoria de los extractos acetónico (CbAcet) y metanólico (CbMeOH) de hojas de plantas silvestres de *C. brasiliense* en el modelo agudo de edema auricular en ratones. Los extractos de la planta aplicados a una concentración de 2 mg/oreja, inhiben significativamente el desarrollo del edema auricular. La mayor inhibición se obtuvo con el extracto metanólico, la cual fue inferior al del fármaco indometacina (Figuras 42 y 43).



$\bar{X} = n=5 \pm D.E.$; $F = 100.73$, $\rho < 0.0001$; de acuerdo a la prueba de Dunnett_{0.05} 1.45, promedios con ** son estadísticamente diferentes al control negativo.

Figura 42. Efecto de los extractos metanólico y acetónico de hojas de plantas silvestres de *C. brasiliense* sobre la formación del edema auricular inducido con TPA.



Porcentaje de inhibición del edema. $\bar{X} = n=5 \pm D.E.$; $F = 100.73$, $p < 0.0001$; de acuerdo a la prueba de Tukey_{0.05} 1.6, promedios con letras iguales son significativamente similares.

Figura 43. Inhibición del edema auricular inducido con TPA por efecto del extracto metanólico y acetónico de hojas de plantas silvestres de *C. brasiliense*.

Para determinar si la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico era debido a los compuestos puros aislados canofilol (1) o ácido apetalico (2), ambos se probaron en el modelo agudo de edema auricular, encontrándose que a un nivel de significancia de $p < 0.05$, los dos compuestos no son activos a las concentraciones evaluadas (1 y 0.5 mg /oreja, respectivamente). La actividad antiinflamatoria del extracto metanólico se deba a otros compuestos presentes en este extracto de las hojas de plantas silvestres. La jacareubina y la 6-desoxijacareubina se han identificado tanto en *C. brasiliense* como en *C. inophyllum*, se tiene reportes de su actividad antiinflamatoria tanto por vía intraperitoneal como por vía oral al ser administrados a ratas en modelos de edema subplantar inducido con carragenina y granuloma con pellets de algodón en ratas normales y adrenalectomizadas, además de mostrar actividad antiulcerosa (Gopalakrishnan *et al.* 1980). Por otra parte, estudios recientes de Zakaria *et al.* (2014) demostraron que el extracto crudo obtenido de los frutos de *C. inophyllum* a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ inhibieron en 77% y 88% las actividades de las ciclooxigenasas y lipooxigenasas, respectivamente, indicando su potencial como agente antiinflamatorio. De este extracto se aislaron los inophyllums A, C y E, el ácido

calofílico, el canofilólido; xantonas como la 1,7-dihidroxi-6-metoxixantona y ácidos como el gálico, catéhuico y protocathéhuico, además de β -sitosterol, a los que se les atribuye en conjunto esta actividad antiinflamatoria. De éstos compuestos, sólo el ácido gálico, β -sitosterol, el ácido protocathéhuico y el calofilólido se han identificado en *C. brasiliense* (García-Zebadúa *et al.*, 2014) junto con la hiperina, la amentoflavona y la quercetina, que han demostrado actividad analgésica en el ensayo de retorcimiento y en relación a la segunda fase (dolor inflamatorio) de la prueba de formalina en ratones, lo que sugiere que esta planta puede ser útil para el tratamiento de procesos dolorosos (Da Silva *et al.*, 2001).

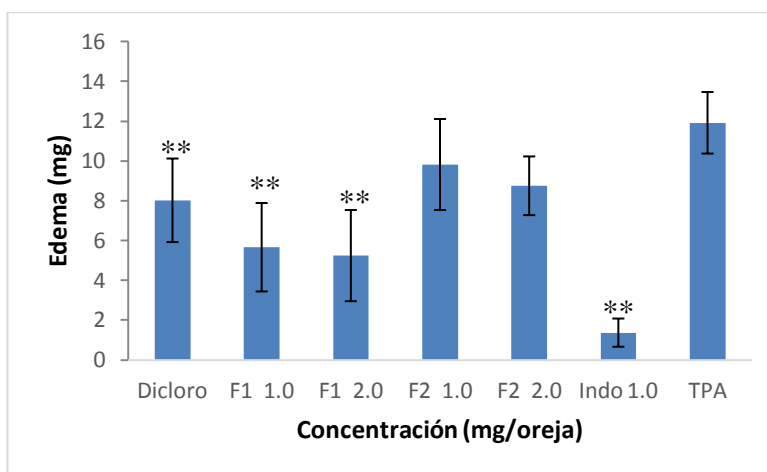
Una perspectiva podría evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos de frutos de *C. brasiliense* y de los compuestos mencionados anteriormente de manera individual en modelos de inflamación *in vitro* y la búsqueda de nuevos compuestos en caso de obtenerse actividad antiinflamatoria positiva.

En cuanto a las actividades biológicas del ácido apetalico y del canofilol, se ha reportado principalmente antifúngica del primero contra cepas de *Aspergillus fumigatus* a una concentración mínima inhibitoria del 80% (MIC_{80}) $>250 \mu\text{g/mL}$ (Hay *et al.*, 2003), mientras que del canofilol se ha reportado actividad antimicrobiana contra cepas de bacterias Grampositivas como *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium diphtheriae*, además de inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumonia* y *Proteus mirabilis* a una concentración de $400 \mu\text{g/mL}$ comparado con ampicilina y amoxicilina (Shaiq Ali *et al.*, 1999).

Por otro lado, se realizó la comparación de los porcentajes de inhibición del extracto metanólico de hojas de *C. brasiliense* con el extracto de diclorometano de la biomasa del cultivo *in vitro*, encontrándose a un nivel de significancia de $p < 0.05$, ambos extractos tienen una actividad antiinflamatoria similar. Este mismo comportamiento se observó al comparar los porcentajes de inhibición del extracto acetónico de las hojas con el de diclorometano de la biomasa.

El extracto de diclorometano de células en suspensión de *C. brasiliense*, así como las fracciones de diclorometano (fracción 1) y diclorometano-metanol (9:1)

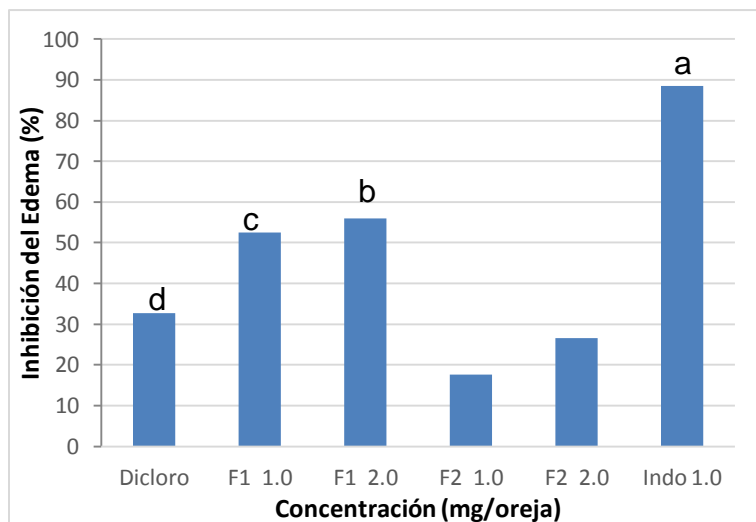
(fracción 2) derivadas del extracto, también se evaluaron en el modelo agudo de edema auricular en ratones. El análisis estadístico mostró que al compararse con el control negativo, el extracto íntegro y la fracción 1 disminuyen significativamente la formación del edema auricular inducido con TPA; en tanto que la fracción 2 fue inactiva (Figura 44).



$\bar{X} = n=5 \pm D.E.$; $F = 16.45$, $p < 0.0001$; de acuerdo a la prueba de Dunnett_{0.05} 3.26, promedios con ** son estadísticamente diferentes al control negativo.

Figura 44. Efecto del extracto de diclorometano de células en suspensión de *C. brasiliense* y de las fracciones de diclorometano (fracción 1) y diclorometano-metanol (9:1) (fracción 2), sobre la formación del edema auricular inducido con TPA.

Con base a la prueba de Tukey se determinó que la inhibición del edema auricular inducido por TPA es significativamente mayor en la fracción 1, en comparación al efecto determinado con la fracción 2 y el extracto de diclorometano íntegro empleando la misma dosis (2 mg/oreja). La actividad antiinflamatoria de ambas fracciones disminuyó al disminuir la dosis a 1 mg/oreja (Figura 45).



Porcentaje de inhibición del edema. $\bar{X} = n=5 \pm D.E.$; $F = 16.45$, $p < 0.0001$; de acuerdo a la prueba de Tukey_{0.05} 3.8, promedios con letras iguales son significativamente similares.

Figura 45. Inhibición del edema auricular inducido con TPA por efecto de las fracciones de diclorometano (fracción 1) y diclorometano-metanol (9:1) (fracción 2) del extracto diclorometánico de células en suspensión de *C. brasiliense*.

8. CONCLUSIONES

- Es el primer trabajo reportando el establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Calophyllum brasiliense*, y la determinación de sus parámetros de crecimiento, los cuales fueron similares a los reportados para cultivos *in vitro* de otras especies de plantas productoras de compuestos antiinflamatorios.
- La producción de compuestos fenólicos totales en el cultivo de células en suspensión de *C. brasiliense* está asociada al crecimiento y la máxima producción fue de 57.2mg GAE/g BS en el día 16 de cultivo.
- Se determinó la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos de los extractos metanólicos de células de *C. brasiliense* con los radicales DPPH y ABTS, siendo la mayor actividad de 130.5 M Trolox/g BS y 534.5 mM/g BS respectivamente, ambos a los 16 días de cultivo. La capacidad antioxidante está estrechamente relacionada con la producción de fenoles totales.
- Se determinaron flavonoides en el extracto metanólico de los cultivos de células en suspensión de *C. brasiliense* obteniéndose un máximo de 247.4 mg quercetina/g BS a los 12 días de cultivo. La producción de flavonoides está asociada al crecimiento.
- Se observó una mayor producción de fenoles totales, flavonoides totales, así como una mayor CAO en los extractos metanólicos de la planta silvestre en comparación con los extractos de planta aclimatada.
- La suspensión celular de *C. brasiliense* mostró una mayor producción de fenoles totales, flavonoides totales, así como una mayor CAO determinadas con DPPH y ABTS en comparación con los extractos metanólicos de la planta silvestre y la planta aclimatada, por lo que puede ser una fuente sustentable de compuestos fenólicos.

- Se aislaron, purificaron e identificaron por RMN los compuestos ácido apetalico, canofilol y (-)-calanolido B con trazas del (+)-calanolido A del extracto acetónico de hojas de *C. brasiliense*.
- Se cuantificó el ácido apetalico por el método del estándar externo, estando presente en 0.0235 mg /g BS en la suspensión celular y en 6.96 mg/g en el extracto acetónico de hojas de planta silvestre de *C. brasiliense*.
- Es necesario un nuevo método de cuantificación del canofilol por HPLC debido a su baja solubilidad.
- Los cultivos en suspensión de *C. brasiliense* no producen el (-)-calanolido B, por lo que es necesario aplicar técnicas de estimulación abióticas como reducción del contenido de nitratos y/o cobre en el medio de cultivo.

9. PERSPECTIVAS

- Aislar, purificar e identificar los dos compuestos mayoritarios con Tr de 12.67 min y 13.57 min presentes en la fracción 1 de la biomasa celular; además de los dos compuestos del tipo diterpeno con Tr de 2.55 min y 19.58 min respectivamente presentes en la fracción 2 de la biomasa, y determinar si los cuatro compuestos están presentes en las hojas del árbol silvestre y si es así, cuantificarlos.
- Aplicar técnicas de estimulación abióticas como reducción del contenido de nitratos y/o cobre en el medio de cultivo para la producción de los calanólidos por el cultivo de células en suspensión de *C. brasiliense*.
- Establecer un método de cuantificación por HPLC para el canofilol acorde con sus características de solubilidad que permita determinar si este compuesto es producido por el cultivo de células en suspensión.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto diclorometánico de la biomasa, metanólico de hojas y de los compuestos puros ácido apetalico y canofilol mediante curvas de dosis-respuesta en el modelo de edema auricular con ratones.
- Aislar, purificar e identificar los flavonoides que produce la suspensión celular de *C. brasiliense* en el día de máxima producción y evaluar su actividad antiinflamatoria en el modelo de edema auricular con ratones.

10. BIBLIOGRAFÍA

Afolayan A.J., Adebola P.O. (2004). *In vitro* propagation: A biotechnological tool capable of solving the problem of medicinal plants decimation in South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 3 (12): 683-687.

Ajithabai, M. D., Rameshkumarb, B., Jayakumara, G., Naira, G. P. (2012). Decipic acid and 12-acetyl apetalic acid from *Calophyllum decipiens*. Wight. *Indian Journal of Chemistry*, 51(2): 393-397.

Alferman, A, Paterson, M. (1995). Natural products formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 43: 199-205.

Bandara B.M.R., Dharmaratne W., Ranjith H., Sotheeswaran S., Balasubramaniam S. (1986). Two chemically distinct groups of *Calophyllum* species from Sri Lanka. *Phytochemistry*, 25 (2): 425-428.

Bernabé-Antonio, Antonio. (2010). Establecimiento *in vitro* de cultivos de callo de *Calophyllum brasiliense* (Cambess) productores de agentes anti VIH-1. Tesis de Doctorado en Biotecnología. UAM-I. México. 90p.

Bernabé-Antonio A., Álvarez L., Salcedo-Pérez E., López-Dellamary Toral F.A., Anzaldo-Hernández J., Cruz-Sosa F. (2015). Fatty acid profile of intact plants of two different sites and callus cultures derived from seed and leaf explants of *Calophyllum brasiliense* Cambess: A new resource of non-edible oil. *Industrial Crops and Products*, 77: 1014-1019.

Bernabé-Antonio A., Estrada-Zúñiga M.E., Buendía-González L., Reyes-Chilpa R., Chávez-Ávila V.M., Cruz-Sosa F. (2010). Production of anti VHI-1 calanolides in a callus culture of *Calophyllum brasiliense* (Cambes). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 103: 33-40.

Blanco-Ayala T., Lugo-Huitrón R., Serrano-López E.M., Reyes-Chilpa R., Rangel-López E., Pineda B., Medina-Campos N.O., Sánchez-Capul L., Pinzón E., Trejo-

Solís C., Silva-Adaya D., Pedraza-Chaverrí J., Ríos C., Pérez-de la Cruz V., Torres-Ramos M. (2013) Antioxidant properties of xanthones from *Calophyllum brasiliense*: Prevention of oxidative damage induced by FeSO₄. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13: 262.

Cao S.G., Sim K.Y., Pereira J., Goh S.H. (1998). Coumarins from *Calophyllum teysmannii* (Guttiferae). *Phytochemistry*, 47: 1051-1055.

Correa M.P. (1978) Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional Ed., Rio de Janeiro, Brasil.

Cronquist A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.

Da Silva K. L., Dos Santos A. R., Mattos P. E., Yunes R. A., Delle-Monache F., Cechinel-Filho V. (2000). Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Therapie*, 56 (4): 431-434.

De Young, L. M., Kheifets, J. B., Ballaron, S. J., Young, J. M. (1989). Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and Actions*, 26 (3-4): 335-341.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Reber P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytic Chemistry*, 28: 350-356.

Duke J.A., Martinez R.V. (1994) Amazonian Ethnobotanical Dictionary. CRC Press, Maryland.

Dweck A.C., Meadowsy T. (2002) .Tamanu (*Calophyllum inophyllum*) – the African, Asian, Polynesian and Pacific Panacea International. *Journal of Cosmetic Science*, 24: 341-348.

Gábor, Miklós. (2000). Inflammation models and their pharmacological applications. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary. 335 p.

Gasparotto Jr. A., Brenzan, M.A., Piloto I.C., Nakamura C.V., Prado-Dias Filho B., Rodrigues-Filho E, Ferreira AG. (2005). Phytochemical study and evaluation of the molluscicidal activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae). *Química Nova*, 28 (4): 575-578.

García- Zebadúa J.C., Magos-Guerrero G.A., Mambrú-Massip M., Estrada-Muñoz E., Contreras-Barrios M.A., Huerta-Reyes M., Campos-Lara M.G., Jiménez-Gómez-Estrada H.A., González-Ruiz K.N., Medina J.D. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10 (3): 182-217.

Gómez-Verjan J.C., Estrella-Parra E.A., González-Sánchez I., Vázquez-Martínez E.R., Vergara-Castañeda E., Cerbón M.A., Reyes-Chilpa R. (2014). Molecular mechanisms involved in the cytotoxicity induced by coumarins from *Calophyllum brasiliense* in K562 leukaemia cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66: 1189–1195.

Gong, Y., Hou, Z., Gao, Y., Xue, Y., Liu, X., Liu, G. (2012). Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 9-16.

Gopalakrishnan C., Shankaranarayanan D, Nazimudeen S.K., Viswanathan S., Kameswaran L. (1980). Anti-inflammatory and C.N.S. depressant activities of xanthenes from *Calophyllum inophyllum* and *Mesua ferrea*. *Indian Journal of Phamacology*, 12 (3): 181-191.

Gutiérrez-Almanza M. (2015). Optimización del crecimiento de la suspensión celular de *Tilia americana* variedad *mexicana* y obtención de compuestos

antiinflamatorios. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Zacatepec, Zacatepec de Hidalgo, Morelos. 79p.

Hay A.E., Guilet D., Morel C., Larcher G., Macherel D., Le Ray A.M., Litaudon M., Richomme P. (2003). Antifungal chromans inhibiting the mitochondrial respiratory chain of Pea seeds and new xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Medica*, 69: 1130-1135.

Huerta-Reyes M., Basualdo M.C., Lozada L., Jiménez-Estrada M., Soler C., Reyes-Chilpa R. (2004). HIV-1 Inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27 (6): 916- 920.

Huerta-Reyes M., Basualdo M.C., Abe F., Jiménez-Estrada M., Soler C., Reyes-Chilpa R. (2004). HIV-1 Inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27 (9): 1471-1475.

Hurtado D.V. y M.E. Merino (2001). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Ed. Trillas S.A., México. 232 p.

Isaías D.E.B., Niero R., Noldin V.F., de Campos-Buzzi F., Yunes R.A., Delle-Monache F. Cechinel-Filho V. (2004). Pharmacological and phytochemical investigations of different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). *Pharmazie*, 59: 879-881.

Itoigawa, M.; Ito, C.; Tan, H.T.W.; Okuda, M.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H. (2001). Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*. *Cancer Letters*, 169: 15-19.

Ito C., Murata T., Itoigawa M, Nakao K., Kaneda N., Furukawa H. (2006). Apoptosis inducing activity of 4-substituted coumarins from *Calophyllum brasiliense* in human leukaemia HL-60 cells. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58: 975–980.

Jin L., Tabe Y., Kimura S., Zhou Y., Kuroda J., Asou H., Inaba T., Konopleva M., Andreeff M., Miida T. (2011). Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. *British Journal of Cancer*, 104: 91-100.

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

Kimura S., Ito C., Jyoko N., Segawa H., Kuroda J., Okada M., Adachi S., Nakahata T., Yuasa T., Filho V.C., Furukawa H., Maekawa T. (2005). Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *International Journal of Cancer*, 113: 158–165

Lemos L.M.S., Martins T.B., Tanajura G.H., Gazoni V.F., Bonaldo J., Strada C.L., Silva M.G., Dall'Oglio E.L., de Sousa Júnior P.T., Martins D.T. (2012). Evaluation of antiulcer activity of chromanone fraction from *Calophyllum brasiliense* Cambess. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1): 432-439.

Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10): 2926-2930.

Lordani T.V.A., Brenzan M.A., Cortez L.E.R., Lordani C.R.F., Honda P.A., M.V.C. Lonardoni M.V.C., Cortez D.A.G. (2014). Effect of a topical formulation containing *Calophyllum brasiliense* Camb. extract on cutaneous wound healing in rats. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 29(10): 953-957.

Maldonado-Magaña A., Bernabé-Antonio A., Salcedo-Pérez E., Cruz-Sosa F. (2015). *In vitro* regeneration of *Calophyllum brasiliense* Cambess: a valuable medicinal tree. *African Journal of Biotechnology*, 14 (40): 2831-2835.

Matsuda K., Hattori S., Kariya R., Komizu Y., Kudo E., Goto H., Taura M., Uekoa R., Kimura S., Okada S. (2015). Inhibition of HIV-1 entry by the tricyclic coumarin GUT-70 through the modification of membrane fluidity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 457: 288-294.

Mesa-Vanegas A.M, Gaviria C.A., Cardona F., Sáez-Vega J.A., Blair Trujillo S., Rojano B.A. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15 (2): 13-26.

Mesía-Vela D., Sánchez R.I., Estrada-Muñiz E., Alavez-Solano D., Torres-Sosa C., Jiménez-Estrada M., Reyes-Chilpa R., Kauffman F.C. (2001). Natural products isolated from Mexican medicinal plants: novel inhibitors of sulfotransferases SULT1A1 and SULT2A1. *Phytomedicine*, 8: 481-488.

Mitul Patel, Muruganathan, Shivalinge Gowda K.P. (2012). *In vivo* animal models in preclinical evaluation of antiinflammatory activity-A review. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 1(2): 1-5.

Murakawa M., Yamaoka K., Tanaka Y., Fukuda Y. (2006). Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induced skin edema in mice. *Biochemical Pharmacology*, 71: 1331-1336.

Nair L.G., Seeni S. (2003). *In vitro* multiplication of *Calophyllum apetalum* (Clusiaceae), an endemic medicinal tree of the Western Ghats. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75: 169-174.

Nakadate, T. (1989). The mechanism of skin tumor promotion caused by phorbol esters: Possible involvement of arachidonic acid cascade/lipoxygenase, protein kinase C and calcium/calmodulin systems. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 49(1): 1-9.

Nicasio-Torres M.P., Meckes-Fisher M., Aguilar-Santamaría L., Garduño- Ramírez M.L., Chávez-Ávila V.M., Cruz-Sosa F. (2010). Production of Chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. *Acta Physiologica Plantarum*, 34: 307-316.

Niembro R.A. (1986). Árboles y arbustos útiles de México. Naturales e introducidos. Editorial Limusa. México. D.F.

Noldin V.F., Isaias D. B., Cechinel-Filho V. (2006). Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. *Química Nova*, 29(3): 549-554.

Oliveira J.C., Moreto D.R., Martins D.T.O. (1994). Propriedades farmacológicas gerais da *Calophyllum brasiliense* Camb. (Guarandi). In: XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Florianópolis – SC – Brasil.

Osuna L., Tapia N., Zamilpa A., Jiménez-Ferrer E., Tortoriello J. (2013). Biosynthesis stimulation of nor-secotriterpene anxiolytics in cell suspension cultures of *Galphimia glauca* Cav. *Engineering Life Sciences*, 14(1): 68-75.

Patil A.D., Freyer A. J., Eggleston D.S., Haltiwanger R.C., Bean M.F., Taylor P.B., Caranfa M.J., Breen A.L., Bartus H.R., Johnson R.K., Hertzberg R.P., Westley J.W. (1993). The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn *Journal of Medicinal Chemistry*, 36: 4131-4138.

Pawar K.D., Joshi S.P., Bhide S.R., Thengane S.R. (2007). Pattern of anti-HIV dipyrano-coumarin expression in callus cultures of *Calophyllum inophyllum* Linn. *Journal of biotechnology*, 130 (4): 346-353.

Pawar K.D., Thengane S.R. (2009). Influence of hormones and medium components on expression of dipyrano-coumarins in cell suspension cultures of *Calophyllum inophyllum* L. *Process Biochemistry*, 44(8): 916-922.

Pawar K. D., Thengane S. R. (2011). Influence of abiotic elicitation on production of dipiranocoumarins in suspension cultures of *Calophyllum inophyllum* L. *Acta Physiologica Plantae*, 33: 2149-2158.

Pawar K.D., Yadav A.V., Shouche Y.S., Thengane S.R. (2011). Influence of endophytic fungal elicitation on production of inophyllum in suspension cultures of *Calophyllum inophyllum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 106: 345-352.

Payá M., Ferrándiz M.L., Sanz M.J., Bustos G., Blasco R., Rios J.L., Alcaraz M.J. (1993). Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. *Phytotherapy Research*, 7(2): 159-162.

Pérez E.M., Ramírez R.M., Núñez, H.G. (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Primera edición. Ed. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 179 p.

Pérez-Hernández J., González-Cortázar M., Marquina S., Herrera-Ruiz M., Meckes-Fisher M., Tortoriello J., Cruz-Sosa F., Nicasio-Torres M.P. (2014). Sphaeralcic acid and tomentin, antiinflammatory compounds produced in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia*. *Planta Medica*, 80: 1-6.

Pires C. T. A., Brenzan M. A., Scodro R. B. D. L., Cortez D. A. G., Lopes L. D. G., Siqueira V. L. D., Cardoso R. F. (2014). Anti-Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity of *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(3): 324-329.

Plattner, R. D., Spencer, G. F., Weisleder, D., & Kleiman, R. (1974). Chromanone acids in *Calophyllum brasiliense* seed oil. *Phytochemistry*, 13(11): 2597-2602.

Quintero R.R. (1990). Ingeniería Bioquímica, teoría y aplicaciones. Ed. Alhambra Mexicana S.A., 2da. Ed, pp. 27-38.

Ramawat K.G., Mathur M. (2007). *Biotechnology. Secondary metabolites. Plants and microbes*. Published by Science Publishers, Enfield, NH. USA. Second Ed., 62-63.

Reyes-Chilpa R., Jiménez-Estrada M., Estrada-Muñiz E. (1997). Antifungal xantones from *Calophyllum brasiliensis* heartwood. *Journal of Chemical Ecology*, 23: 1901-1911.

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

Reyes-Chilpa R., Hatsuko Baggio C., Alavez Solano D., Estrada Muñiz E., Kauffman F.C., Sánchez S.I., Mesía Vela S. (2006). Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthonés isolated from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 167-172.

Rutter R.A. (1990). *Catalogo de las plantas útiles de la Amazonia peruana. Lingüístico de verano. Yarina-cocha, Iquitos, Perú.*

Sartori N.T., Canepelle D., Souza P.T.Jr., Martins D.T.O. (1999). Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 67: 149-156.

Shaiq Ali M., Mahmud S., Perveen S., Rizwani G.H., Ahmad V.U. (1999). Screening for the antimicrobial properties of the leaves of *Calophyllum inophyllum* Linn (Guttiferae). *Journal of Chemical Society of Pakistan*, 21 (2): 174-178.

Sistema Nacional de Información Forestal 2005. CONABIO. Consultado el 20 de Febrero de 2014 en http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/24-gutti1m.pdf.

Spino C., Dodier M., Sotheeswaran S. (1998). Anti-HIV coumarins from *Calophyllum* seed oil. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8: 3475-3478.

Stafford, A.M. (2002). Plant cell cultures as a source of bioactive small molecules. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 5: 296-303.

Stanley P.L., Steiner S., Havens M., Tramposch K.M. (1991). Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacology and Physiology*, 4 (4): 262-271.

Stevens, P.F. (1980). A revision of the old world species of *Calophyllum* (*Guttiferae*). *Journal of Arnold Arboretum*, 61 (2): 117-171.

Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [cited 2015 Sept 14] Available from: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

Sorol C.B., Carvajal S., Solís V.C., González N.L., Eckers F. (2015). Bases para la conservación de las semillas de *Calophyllum brasiliense* (Calophyllaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 50 (1): 93-106.

Su X.-H., Zhang M.L., Li L.G., Huo C.H., Gu Y.C., Shi Q.W. (2008). Chemical Constituents of the plants of the genus *Calophyllum*. *Chemistry and Biodiversity*, 5 (12): 2579–2608.

Surveswaran S., Cai Y.Z., Corke H., Sun M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102: 938– 953.

Taticek R., Moo-Young M., Legge L. (1991). The scale-up of plant cell culture: engineering considerations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 24:139-158.

Tapia N., Zamilpa A., Bonfil M., Ventura E., Cruz-Vega D., Del Villar A., Cruz-Sosa F., Osuna L. (2013). Effect of the culture medium and biotic stimulation on taxane

production in *Taxus globosa* Schltdl *in vitro* cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(12): 3447:55.

Thengane S.R., Bhosle S.V., Deodhar S.R., Pawar K.D., Kulkarni D.K. (2006). Micropropagation of Indian laurel (*Calophyllum inophyllum*), a source of anti-HIV compounds. *Current Science*, 90(10): 1393-1397.

Thuy T.T., Cuong N.H., Sung T.V. (2014). Triterpenes from *Celastrus hindsii* Benth. *Journal of Chemistry*, 45(3): 373-376.

Tiuman T.S, Brenzan M.A., Ueda- Nakamura T., Dias Filho B.P., García Cortez D.A., Nakamura C.V. (2012). Intramuscular and topical treatment of cutaneous Leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (-) mammea A/BB. *Phytomedicine*, 19: 1196- 1199.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. *Calophyllum brasiliense* Cambess. [Internet]. Saint Louis, Missouri, U.S. [cited 2015 Sept 14]. Available from: <http://www.tropicos.info/Name/7800054?langid=66>.

Vozzo, A. (2003). Tropical tree seed manual. Washington, D.C. USDA Agriculture Handbook US Forest Service, 864 p.

Wojdylo A., Oszmiański J., Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105: 940–949.

Xu Z.Q., Barrow W.W., Suling W.J., Westbrook L., Barrow E., Lin Y.M., Flavin M.T. (2004). Anti-HIV natural product (+)-calanolide A is active against both drug-susceptible and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12 (5): 1199–1207.

Yasunaka K., Abe F., Nagayama A., Okabe H., Lozada-Pérez L., López-Villafranco E., Muñoz E.E., Aguilar A., Reyes-Chilpa R. (2005). Antibacterial activity of crude

extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 97 (2): 293-299.

Yim H.S., Chye F.Y., Koo S.M., Matanjun P., How S.E., Ho C.W. (2012). Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 235-242.

Young J.M., Wagner B.M., Spires D.A. (1983). Tachyphylaxis in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and arachidonic acid-induced ear edema. *Journal of Investigative Dermatology*, 80(1): 48-52.

Zakaria M.B., Ilham Z., Muhamad N.A. (2014). Anti-inflammatory activity of *Calophyllum Inophyllum* fruits extracts. *Procedia Chemistry*, 13: 218-220.