



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Metabolitos secundarios del árbol tropical *Vismia mexicana* (Clusiaceae) y su actividad sobre la Transcriptasa Reversa (VIH-1)”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

GRISELDA HERNANDEZ PASTEUR



DIRECTOR DE TESIS:
DR. RICARDO REYES CHILPA

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

PRESIDENTE:

Dr. Adolfo Andrade Cetto. Facultad de Ciencias. UNAM.

VOCAL:

Dra. Patricia Guevara Fefer. Facultad de Ciencias. UNAM

SECRETARIO: TUTOR

Dr. Ricardo Reyes Chilpa. Instituto de Química. UNAM.

SUPLENTE:

Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez. Instituto de Química. UNAM.

SUPLENTE:

Dr. Rene de Jesús Cárdenas Vázquez. Facultad de Ciencias. UNAM.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a la máxima casa de estudios superiores, la UNAM por haberme permitido realizar mis estudios tanto de bachillerato como profesionales en sus instalaciones, primero en el CCH Azcapotzalco, luego la Facultad de Ciencias y el Instituto de Química, donde aprendí que la responsabilidad, la persistencia, el compañerismo y la paciencia son indispensables para lograr lo que deseemos.

Después agradezco a mis padres, a mi padre pues gracias a él tengo la entereza y coraje para seguir adelante; a mi madre, por haberme apoyado desde el primer momento a luchar por lo que quiero, por haber estado ahí tanto en las buenas como en las malas, por aconsejarme, escucharme y ayudarme a salir de las adversidades, por todos los sacrificios hechos, por que a pesar de todo y todos lo logramos...este triunfo es por y para las dos, y como dice la canción, su canción, *“gracias mujer querida, por tantos años que me has dado de tu vida, en mis momentos de amargura, tu has sido mi pañuelo, en mis momentos de tristeza, mi consuelo y cuando he triunfado tu has sido mi bandera por que has estado conmigo de todas maneras, nunca me has abandonado, conmigo siempre has estado, tu eres mi vida, la única solo tu, mujer divina...”*

Agradezco a mis amigos de la facultad Jorge, Mariana, Laura, Viridiana y Marisol, con quienes pase los mejores últimos 5 años de mi vida, por haberme apoyado incondicionalmente y escuchado en momentos difíciles, por sus consejos y por incitarme a seguir adelante...amigos si se pudo gracias por todo.

También agradezco al M. en C. Ramiro Cruz Duran por haber sido el culpable de que me apasionaron las plantas, al ser un excelente profesor y mostrarme que una planta es mas de lo que parece y que no debemos hacer las cosas por obligación sino por vocación y amor; a la Dra. Patricia Guevara Fefer, que ha pasado de profesora a ser una amiga, muchas gracias por haberme apoyado y escuchado cuando mas lo necesitaba y por sus enseñanzas dentro del laboratorio; al Dr. Ricardo Reyes Chilpa, por haberme aceptado en su laboratorio sin conocerme y haberme permitido realizar este proyecto de tesis, así como por todas sus enseñanzas, comprensión y apoyo que tuve en todo momento, pero principalmente por haberme ayudado a saber que lo mió lo mió es la Fitoquímica; a todos mis compañeros del laboratorio 2-5 del Instituto de Química, por ser tan buenos compañeros, por todos los buenos ratos de desestres, por sus comentarios, enseñanzas y aportaciones para la realización de esta tesis, así que gracias Don Jhon, Cesar, Edgar, Juan Carlos, Karlita, Itzel, Yoscelina, Laura, Sandra, Ximena, Aura, e Iliana y en especial a la Biol. Roció Gómez Cancino (Chio) por su gran apoyo en la realización de las pruebas biológicas.

Al proyecto "Fitofarmacos Antivirales (VIH-1) de Árboles Tropicales de México" (PICSA 10-55) financiado por el Instituto de Ciencias y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF), por la beca otorgada durante la realización de este proyecto; así como a la DGAPA-UNAM en los proyectos PAPIIT IN 203810 e IG 200513 por su apoyo económico en este trabajo.

A los sinodales Dr. Adolfo Andrade Cetto; Dra. Patricia Guevara Fefer, Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez y al Dr. Rene de Jesús Vásquez Cárdenas por su apoyo en la revisión de la presente tesis, así como por sus comentarios y aportaciones.

INDICE

1- RESUMEN.....	6
2- INTRODUCCION.....	7
3- ANTECEDENTES.....	9
3.1- Clusiaceae.....	9
3.2- Usos tradicionales de especies del genero <i>Vismia</i>	13
3.3- Fitoquímica de <i>Vismia</i>	15
3.4- Actividad biológica de compuestos y extractos de especies de <i>Vismia</i>	24
3.5- Generalidades del VIH.....	27
3.6- Ciclo replicativo del VIH.....	28
3.7- Fármacos usados contra el VIH.....	29
3.8- Extractos y Compuestos de plantas con actividad antiviral (VIH-1).....	31
4- OBJETIVOS.....	33
5- MATERIALES Y METODOS.....	34
6- RESULTADOS.....	36
6.1- Cromatografía en Capa Fina de extractos.....	36
6.2- Cromatografía en Columna de un extracto.....	37
6.3- Cromatografía en Capa Fina Preparativa de fracción X.....	39
6.4- Identificación tentativa de muestras.....	41
6.4.1- Fracción X3.....	41
6.4.2- Fracción X4 y subfraccion X4m.....	47
6.4.3- Fracción X5 y subfraccion X5m.....	48
6.4.4- Fracción XI.....	51
6.4.5- Fracción XIII.....	53
6.4.6- Fracción XV.....	55
6.5- Actividad sobre la Transcriptasa Reversa del VIH-1.....	58
7- DISCUSION.....	64
8- CONCLUSIONES.....	65
9- BIBLIOGRAFIA.....	66
10- ANEXO.....	74

1- RESUMEN

Actualmente más de 40 millones de personas a nivel mundial están infectadas con VIH y han ocurrido 24 millones de fallecimientos en todo el mundo. Aunque se han desarrollado fármacos, estos no eliminan por completo la infección, pero si mejoran la calidad de vida de los enfermos; no obstante, menos del 7% de la población infectada con este virus tiene acceso a estos tratamientos debido a sus altos costos y a la baja disponibilidad por lo que es necesario continuar con la búsqueda de compuestos y extractos activos.

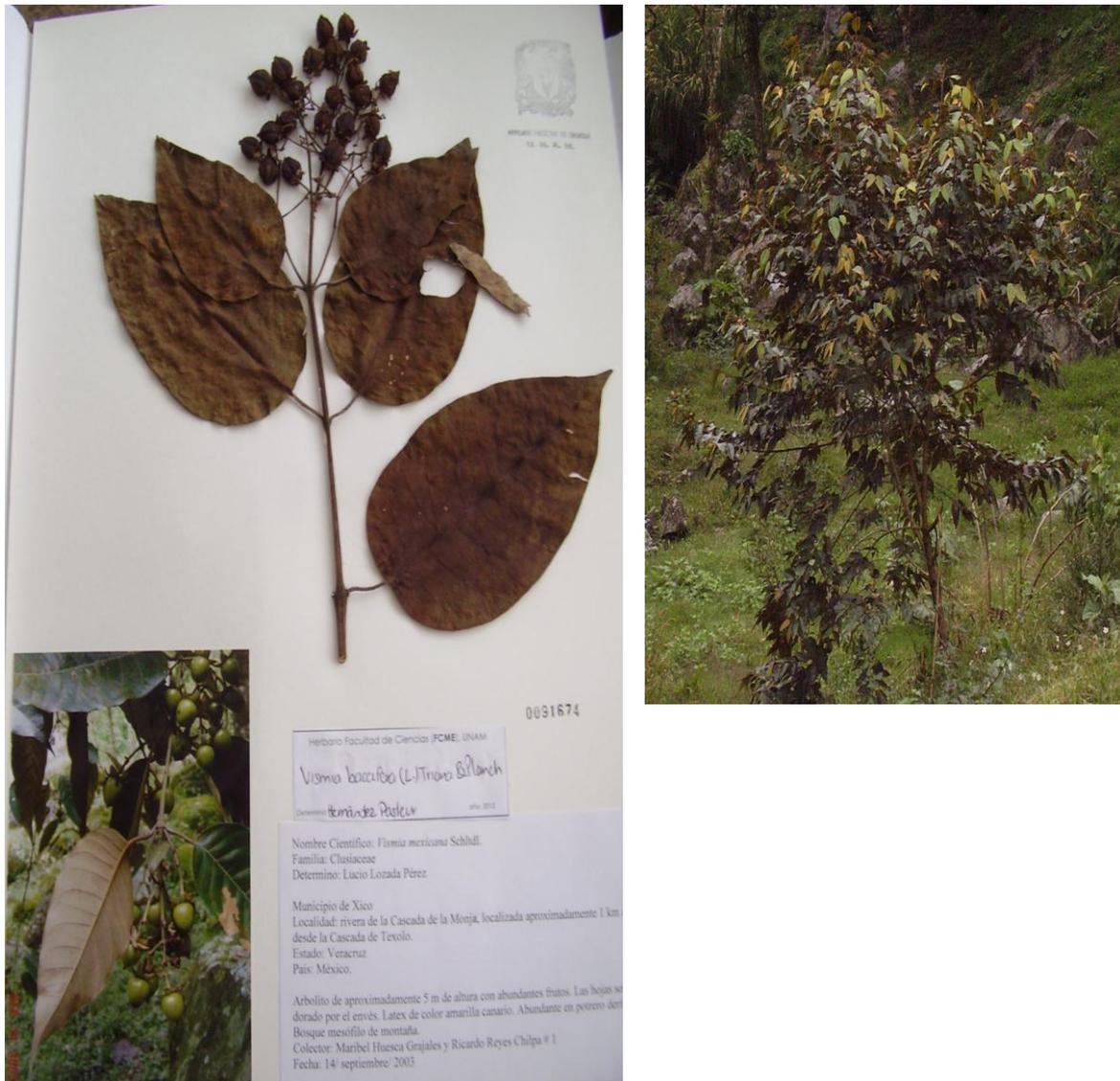
En este trabajo, se estudió el extracto de metanol de las hojas de *V. mexicana* encontrando que inhibe (50 µg/ml) en 84% la actividad de la enzima transcriptasa reversa del VIH-1 *in vitro*. Dicho extracto se sometió a Cromatografía en Columna (CC) y se obtuvieron XVII fracciones, que fueron analizadas por Cromatografía en Capa Fina (CCF) reveladas con FeCl₃ para determinar la presencia de compuestos fenólicos. Una de las fracciones se sometió a Cromatografía en Capa Fina Preparativa (CCFp) obteniéndose 7 subfracciones. Se determinó la actividad inhibitoria de la Transcriptasa Reversa del VIH-1 (RT-VIH-1) de la mayoría de las fracciones y subfracciones; las más potentes se analizaron mediante métodos espectroscópicos (RMN de ¹H y ¹³C, UV) y espectrométricos (Espectrometría de Masas) para identificar los compuestos presentes; además se calculó su IC₅₀. Las fracciones X, X5m, XI, XIII, XV fueron las más activas. La fracción X contiene flavonoides glicosilados (astilbin y engeletin) mientras que las fracciones XIII y XV contienen taninos hidrolizables, estas ultimas fueron las más potentes con 75 y 78% de inhibición respectivamente. También se evaluó la actividad inhibitoria de la RT del VIH-1 de algunos estándares, como: taxifolin, quercetina, kaempferol, (+) catequina, ácido galico y ácido protocatechuico, siendo los más potentes la quercetina, kaempferol y el ácido galico (50 µg/ml) con 55, 49 y 42% de inhibición de la enzima RT del VIH-1.

2- INTRODUCCION

El agente etiológico del SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) el VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) es un retrovirus ubicado en el género *Lentivirus*, los cuales poseen largos períodos de incubación y tienen como blanco diversos linajes de células hematopoiéticas, particularmente linfocitos (Freed y Martin, 2001). Hasta el momento han sido identificados y caracterizado dos tipos: VIH-1 y VIH-2 (Coffin *et al.*, 1986). La FDA por sus siglas en Ingles (Administración de Fármacos y Alimentos de los E.U.A) ha aprobado a la fecha 24 fármacos, 11 son inhibidores de la transcriptasa reversa, 10 son inhibidores de proteasa, 2 son inhibidores de fusión y 1 es inhibidor de integrasa (Hupfeld y Efferth, 2009). A la fecha, también se han logrado identificar poco más de 120 compuestos naturales, principalmente de plantas, que pueden impedir la replicación del virus (Vlietnick *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2005). El compuesto natural más importante es la coumarina (+)-calanólido A que ha sido aislado de distintas especies de *Calophyllum* perteneciente a la familia Clusiaceae, es un potente inhibidor de la enzima de la Transcriptasa Reversa del VIH-1 (RT del VIH-1) (Kashman *et al.*, 1992, Huerta-Reyes *et al.*, 2004a). Actualmente se encuentra en la fase II/III de evaluación clínica con pacientes VIH-1 positivos. De superar los ensayos clínicos, podría convertirse en el primer fármaco, originalmente extraído de una especie vegetal y posteriormente producido sintéticamente, que se aprobase para uso clínico en el tratamiento del SIDA (Butler, 2005; Sarawak, 2008). El interés en dicho compuesto ha estimulado los estudios químicos sobre la familia Clusiaceae, anteriormente conocida como Guttiferae, que está constituida por ~36 géneros y 1600 especies, con distribución pantropical y diferentes hábitos de vida: árboles, arbustos, lianas, hierbas anuales o perennes. La familia Clusiaceae en México consta de ~8 géneros y 21 especies. En un estudio bioprospectivo fueron evaluados los posibles efectos inhibitorios de los extractos orgánicos de las hojas de las 21 especies sobre la RT del VIH-1 (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a). Cinco especies mostraron una alta actividad inhibitoria ($\geq 70\%$), siete fueron moderadamente activas (50-70%) y nueve

mostraron <50% de inhibición. La más activa fue *Calophyllum brasiliense* con mas del 77% de inhibición. Otras especies con alta actividad fueron *Clusia massoniana* y *Vismia mexicana* con el 72% de inhibición de la enzima. Con el fin de contribuir a identificar los principios activos presentes en *Vismia mexicana* (Fig. 1), en la presente tesis se estudio y evaluó el efecto del extracto metanólico de las hojas y sus fracciones cromatográficas sobre la enzima RT-VIH-1.

Fig. 1. Ejemplar de herbario y foto de *Vismia mexicana* (Cascada de la Monja, Xico, Ver).



3- ANTECEDENTES

3.1- Clusiaceae

La familia Clusiaceae, anteriormente conocida como Guttiferae contiene árboles, arbustos o plantas herbáceas, de hojas simples, limbo con puntos o líneas glandulares de color claro, observadas a trasluz, o bien con glándulas de color oscuro. Se reconocen 40 géneros con ~1000 especies distribuidas en regiones templadas, subtropicales y tropicales del mundo (Rodríguez, 1996).

Los géneros más importantes son *Clusia*, *Calophyllum* y *Vismia* con cerca de 300, 178 y 60 especies, respectivamente (Kearns *et al.*, 1998). Recientemente, *Vismia* fue segregada de Clusiaceae e introducida en Hypericaceae Juss, los caracteres que la diferencian de la primera son principalmente la presencia de androceo fasciculado, anteras pequeñas y estilos libres (Robson, 1978; Gustafsson *et al.*, 2002). La delimitación y separación de la familia ha sido mejor apoyada con datos moleculares, secuencias de ADN (APG II, 2003; Davis *et al.*, 2005; Tokuoka & Tobe, 2006).

La familia Hypericaceae se distribuye principalmente en zonas tropicales y templadas del mundo y agrupa a 8 géneros con cerca de 560 especies. En nuestro país, se considera la presencia de 4 géneros y ~15 especies, para el caso del estado de Veracruz se conocen 2 géneros (*Hypericum* y *Vismia*) con 9 especies (Pérez y Castillo, 2008).

En el género *Vismia*, podemos encontrar árboles o arbustos, que llegan a medir hasta 15 m de alto, sus hojas son opuestas y simples; la inflorescencia es de tipo cimosa, con pedicelos articulados cerca de la base; las flores son hermafroditas; el cáliz presenta 5 sépalos, que son pubescentes dorsalmente, con el margen membranoso y glandular; la corola tiene 5 pétalos, con glándulas rojizas, lineales y

circulares; tiene abundantes estambres, dispuestos en 5 fascículos anipetalos con 50 cada uno, connados casi hasta la mitad de su longitud, los fascículos estaminoidales 5, que son alternos a los fascículos estaminales, obovados; las anteras presentan dehiscencia longitudinal, ovoides; el ovario es 5 locular, con placentación axial, con 5 estilos libres, y estigmas subcapitados; su fruto es una baya, indehiscente, glandular y con numerosas semillas cilíndricas (Pérez y Castillo, 2008).

A nivel mundial, *Vismia* está representada por 55 a 65 especies distribuidas en América Tropical y África Tropical. En México se estima que existen 3 especies de *Vismia*: *V. mexicana*, *V. camparaguey* y *V. baccifera* (Huerta-Reyes *et al*, 2004). Sin embargo, algunos autores consideran que *V. mexicana* y *V. baccifera* son sinónimos. Dos especies se encuentran en el estado de Veracruz: *V. baccifera* y *V. camparaguey* (Pérez y Castillo, 2008). De acuerdo a estos autores, los sinónimos de *V. baccifera* (L) Triana & Planch (1862) son:

Hypericum bacciferum L. (1771).

Vismia guttifera Pers. (1807).

V. dealbata Kunth., Nov. (1821).

V. mexicana Schltldl. (1836).

V. panamensis Duchass. & Walp. (1850).

Caopia baccifera (L.) Kuntze. (1891).

Vismia baccifera (= *Vismia mexicana*) es un árbol o arbusto, de 2-12 (-15) m de alto, glabro, con la corteza parda, estriada, caduca, las ramas igualmente glabras, las lenticelas alargadas estrellado-ferrugíneas, con puntos de exudado amarillo. Las hojas son opuestas, simples, perennes, pecioladas, el haz es pardo-rojizo, glabrescente, el envés pardo-rojizo, blanquecino, con puntos de exudado amarillento, la lamina es deltoide, ovada, oblongo-lanceolada, de (4.0 -) 6.5 - 15.5 (- 20.5) cm de largo, (1.4 -) 2.7 - 8.0 cm de ancho, el margen es entero, el ápice

acuminado, con la base atenuada, obtusa, la nervación eucamptodroma, de (10 -) 12 - 16 (- 20) pares de nervios laterales, los nervios impresos, prominentes en el haz y envés, con puntos de exudado amarillento, el pecíolo perpendicular a las ramas, acanalado, de (0.9-) 1.4 - 2.3 cm de largo, glabrescente. La inflorescencia es terminal y cimosa, de (1 -) 5 - 10 (- 12) cm de largo, con (1 -) 16 - 60 (- 194) flores, el pedúnculo ausente o de 1cm de largo, el raquis estriado, cuadrangular, estrellado-ferrugíneo, los pedicelos articulados en la base, de 2 - 10 mm de largo, con mechones de tricomas estrellados, de 1 mm de largo; flores hermafroditas; cáliz actinomorfo, con 5 sépalos connados en la base, erectos, perennes en los frutos, algunas veces reflejos, deltoides, ovado-lanceolados, de 4 - 6 (- 7) mm de largo, 2 - 4 mm de ancho, coriáceos, estrellado-ferrugíneos, la superficie interior glabra o barbada, las glándulas, negras escasas, lineares y circulares, el margen pardo, de 0.5 - 1.0 mm de ancho, membranoso, ciliado, con círculos y líneas negras, el ápice agudo u obtuso; corola actinomorfa, con 5 pétalos libres caducos o perennes en los frutos, pardos, amarillentos, ovados, espatulados, de 4 - 8 mm de largo, 2 - 3 mm de ancho, membranaceos, las glándulas rojizas, circulares, rojizas hacia el margen apical, la superficie exterior glabra, la superficie interior barbada, parda, el margen entero, la base atenuada, el androceo con 5 fascículos de estambres, opuestos a los pétalos, caducos, a veces perennes en los frutos, los fascículos de estaminodios 5, alternos a los estambres, perennes en los frutos, pardos, espatulados, de 1.0 - 1.5 mm de largo, pilosos; estambres 45 - 50, connados en la base, en fascículos pardos, espatulados, de 2 - 4 mm de largo, pilosos, las anteras dorsifijas, 2 -tecas, la dehiscencia longitudinal, pardo-rojizas, oblongas de 0.3 mm de largo, el ápice y la base obtusos, glabras, la superficie papilosa; ovario súpero, 5 -carpelar, 5 -locular, pardo, globoso, de 1.2 - 3.0 mm de largo, 1.0 - 1.5 mm de ancho, glabro, los óvulos numerosos, los estilos 5, libres, perennes en frutos, de 1.0 - 3.5 mm de largo, glabros, homostilos, el estigma capitado, de 0.5 mm de ancho, la superficie papilosa. Fruto una baya, pardo-rojiza, circular en corte transversal, de 7-18 mm de largo, 6 - 17 mm de ancho, 5 -locular, indehiscente, la superficie glabrescente, el ápice y la base obtusos; semillas de 30

- 50 por lóculo, rojizas, rectas, curvadas, de 2 - 3 mm de largo, 1 mm de ancho, la superficie papilosa (Pérez y Castillo, 2008).

Vismia baccifera (= *Vismia mexicana*) se puede encontrar desde los 190 a los 1600 msnm, principalmente en vegetación de Selva Alta Perennifolia, Selva Mediana Subperennifolia, Bosque de Pino-Encino, Bosque de Encino, Bosque Caducifolio y vegetación secundaria derivada de estas comunidades vegetales. Se puede encontrar en Centroamérica y Sudamérica (Colombia y Venezuela). En México se distribuye en Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Veracruz (Figura 2). Entre sus nombres comunes tenemos “huacalillo, chotillo, nanchillo y tesuate colorado” (Oax) (Pérez y Castillo, 2008).

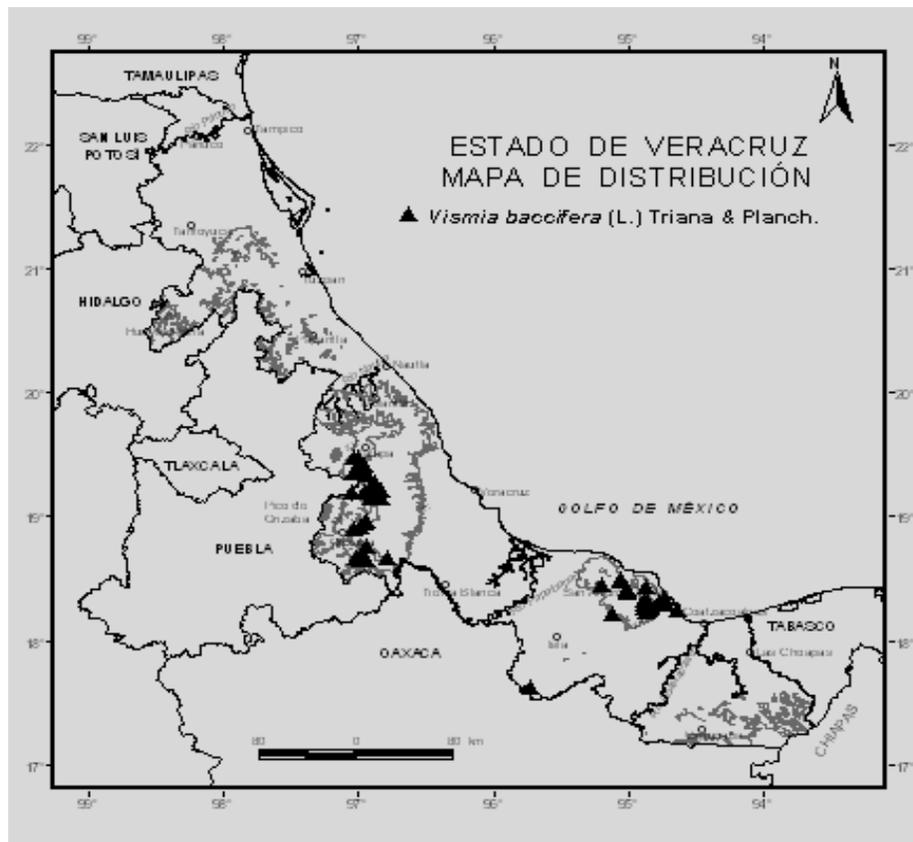


Figura 2. Distribución de *Vismia baccifera* (= *Vismia mexicana*)

3.2- Usos tradicionales de especies del genero *Vismia*

En la Tabla 1 se muestran algunos de los usos tradicionales que se le han dado a especies del genero *Vismia*, en diferentes países de Sudamérica y África. En general se aplican para tratar infecciones internas y externas causadas por microorganismos, como colorantes y en padecimientos del sistema nervioso.

Tabla 1. Usos tradicionales de especies del genero *Vismia*.
(Con base en Vizcaya *et al.*, 2012).

Uso	Especie y sitio
Contra mordedura de serpiente; pintura decorativa para el cuerpo (Ewan, 1962)	<i>Vismia sp.</i> , (Amazonas)
De la resina se obtienen tintes, taninos y aceites (Ferrari <i>et al.</i> , 1979)	<i>V. baccifera</i> (Colombia y Brasil)
La savia fresca se usa como purgante, contra afecciones del tracto urinario y enfermedades superficiales de la piel; la corteza y hojas como antipirético y antirreumático (Peres, 1978); el jugo de los frutos se usa para teñir lana y preparar alimentos (Peres y Nagen, 1997)	<i>V. guianensis</i> (Colombia y Brasil)
La madera es útil en la fabricación de mangos o empuñaduras de herramientas domesticas (Ferrari <i>et al.</i> , 1979)	<i>V. baccifera</i> (Colombia y Brasil)
El látex se usa contra la pitiriasis (infección superficial), lesiones de leishmaniasis (Delle Monache <i>et al.</i> , 1984)	<i>V. cayennensis</i> (Amazonas)
Para aliviar comezón, tratar heridas externas: la decocción de las hojas para bajar la fiebre; el látex de la corteza se usa contra infecciones	<i>Vismia sp.</i> (Guyana Francesa)

fúngicas bucales; el látex de la fruta se usa en lesiones provocadas por leishmaniasis (Simmonds <i>et al.</i> , 1985)	
Hojas y raíces disminuyen la dificultad para comprender instrucciones (Schultes, 1993) Se reafirma el uso que le dan personas con dificultad de entendimiento de instrucciones, y se aporta que también se usa para la relajación de los músculos en personas con dificultad para hablar provocada por la degeneración motora (Adams <i>et al.</i> , 2007)	<i>V. tomentosa</i> (Amazonas)
Llamado comúnmente lacre, se utilizan las hojas para aliviar dolores en general y de riñones y como planta mágica religiosa (Alburquerque <i>et al.</i> , 2007)	<i>V. guianensis</i> (Noroeste de Brasil)
Utilizadas para enfermedades infecciosas, principalmente de transmisión sexual (Suffredini <i>et al.</i> , 2007)	<i>V. guianensis</i> y <i>V. leonensis</i> (Guinea)
Llamada pichirina en dicha zona, el látex se utiliza como cataplasma aplicado en la piel para combatir la sarna (Sanz- Biset <i>et al.</i> , 2009)	<i>V. macrophylla</i> (Amazonas del Perú)
La decocción del exudado de los frutos se usan para combatir la hepatitis (Sanz- Biset <i>et al.</i> , 2009)	<i>V. sandwithii</i> (Amazonas del Perú)
Las hojas cocidas son utilizadas para bañar al bebe antes de dormir para proporcionarle un mayor descanso (Ruysschaert <i>et al.</i> , 2009)	<i>V. cayennesis</i> (Suriname)
Baños de hojas cocidas para preservar la salud del bebe en general (Ruysschaert <i>et al.</i> , 2009)	<i>V. guinanensis</i> (Suriname)
Se usa para dolores estomacales (Ruysschaert	<i>V. macrophylla</i> (Suriname)

<i>et al.</i> , 2009)	
Se usa en heridas infecciosas (Valadeau <i>et al.</i> , 2010)	<i>V. baccifera</i> (Perú)
La infusión de hojas que se utiliza para controlar los escalofríos (Valadeau <i>et al.</i> , 2010)	<i>V. pozuzoensis</i> (Perú)
Infusiones de los tallos se usa para tratar el dolor de garganta, así como también para tratar y prevenir el virus de la influenza (Valadeau <i>et al.</i> , 2010)	<i>V. popuzoensis</i> (Perú)

3.3- Fitoquímica de *Vismia*

El deseo permanente por conseguir medicamentos de origen natural, así como el reiterado uso y aprobación de la medicina folclórica tradicional, llevó a una serie de científicos a desarrollar detallados y minuciosos experimentos destinados a conocer plantas con actividades farmacológicas. Métodos y ensayos variados han mostrado que los extractos de algunas especies de *Vismia*, presentan propiedades antibacterianas, antimicóticas, antiparasitarias, insecticidas y antivirales entre otras, dichos descubrimientos merecen especial atención y profundización en el estudio de este importante género. De las especies de *Vismia* se han aislado antraquinonas, antronas, antranoides prenilados, flavonoides, benzofenonas, xantonas, lignanos, cumarinas, sesquiterpenos, triterpenos y componentes volátiles (Vizcaya *et al.* 2012). En la Tabla 2 se muestran los compuestos hasta ahora reportados para el género *Vismia*.

Las antraquinonas, son el grupo más numeroso de quinonas; están compuestas por tres anillos, dos aromáticos que rodean a una quinona, la mayoría contienen hidroxilos en los carbonos 1 y 2; frecuentemente están en forma de glicosidos, que se hidrolizan durante el proceso de extracción. A veces el glicósido deriva de una quinona reducida, la antrona, y puede tener la molécula de azúcar unida al

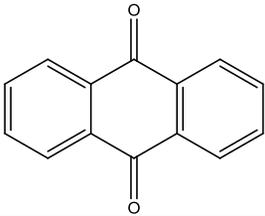
carbono 9, o bien unido a un átomo de oxígeno. Estos compuestos son de color naranja o rojo, su principal propiedad es su poder purgante y se usan como colorantes (Valencia, 1995).

Los flavonoides son un grupo de sustancias que se encuentran en las plantas cuyas estructuras corresponden a la serie $C_6-C_3-C_6$, por lo que su esqueleto de carbonos consiste en dos anillos de benceno (C_6) separados por una cadena alifática de 3 carbonos. Estos compuestos pueden encontrarse en forma de glicosidos. Su principal función, es como pigmentos en las flores y frutos, que ayudan a atraer insectos y animales favoreciendo la polinización y dispersión de semillas. También se cree que los flavonoides tienen una función protectora y le confieren a la planta resistencia contra las enfermedades (Valencia, 1995).

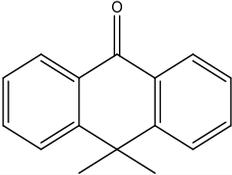
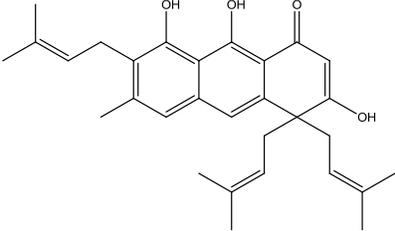
Otros compuestos importantes son: coumarinas, terpenoides (sesquiterpenos y triterpenos) y lignanos. A continuación se describen algunos de estos grupos. Las coumarinas poseen un esqueleto benzopirano. Una característica común en muchas coumarinas es la presencia de cadenas isoprenoides, frecuentemente de una, dos o tres unidades, ligadas a un átomo de carbono del núcleo, a un átomo de oxígeno o a ambos. Son sustancias fluorescentes fotosensibles, que se pueden encontrar en forma de glicosidos. Se usan como veneno para peces, como espasmolíticos y vasodilatadores, para el oscurecimiento de la piel, como repelentes de insectos, como narcóticos, para disminuir la sensibilidad de los nervios, para causar parálisis en músculos lisos y una de las sustancias aromáticas más empleadas (Valencia, 1995).

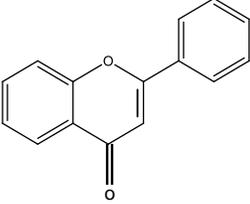
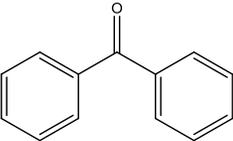
Los sesquiterpenos son compuestos $C_{15}H_{24}$, derivados de 3 moléculas de isopentenil pirofosfato $-C_5-$. Los triterpenos con estructura $C_{30}H_{48}$, se encuentran en forma de resinas, corcho y aceites esenciales. Muchos de los lignanos se encuentran como glicosidos y se presentan como sólidos incoloros (Valencia, 1995).

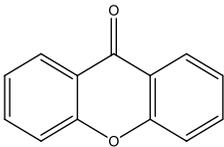
Tabla 2. Composición química del genero *Vismia*.
(Con base en Vizcaya *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2003)

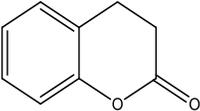
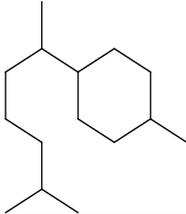
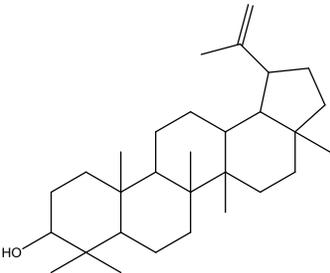
COMPUESTO	ESPECIE QUE LO PRESENTA
Antraquinonas 	
Vismiaquinona A	<i>V. reirchartiana</i> Ewan (Goncalves y Mora, 1981) <i>V. japurensis</i> Reichard (Miraglia <i>et al.</i> , 1981) <i>V. martiana</i> Richard (Nagen y Faria de Jesús, 1997) <i>V. parviflora</i> Cham & Schltl (Nagen y Faustino, 1997) <i>V. baccifera</i> Planch & Triana (Hussein <i>et al.</i> , 2003) <i>V. laurentii</i> De Wild (Nguemeving <i>et al.</i> , 2006) <i>V. baccifera var. dealbata</i> Planch & Triana (Salas <i>et al.</i> , 2008)
Vismiaquinona B	<i>V. japurensis</i> Reichard (Miraglia <i>et al.</i> , 1981) <i>V. martiana</i> Richard (Nagen y Faria de Jesús, 1990) <i>V. laurentii</i> De Wild (Nguemeving <i>et al.</i> , 2006)
Vismiaquinona C	<i>V. martiana</i> Richard (Nagen y Faria de Jesús, 1990) <i>V. parviflora</i> Cham & Schltl (Nagen y Faustino, 1997)
Laurentenquinona A, B y C	<i>V. laurentii</i> De Wild (Noungoue <i>et al.</i> , 2008)
Isoxantrorina	<i>V. laurentii</i> De Wild (Noungoue <i>et al.</i> , 2008)
Acido crisofanico	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Camelle <i>et al.</i> , 1982) <i>V. cayeneensis</i> Jacq (Pinheiro <i>et al.</i> , 1984) <i>V. martiana</i> Richard (Nagen y Faria de Jesus, 1990) <i>V. parviflora</i> Cham & Schltl (Nagen y Faustino, 1997)
Fiscion	<i>V. cayeneensis</i> Jacq (Nagen y Faria de Jesús, 1990) <i>V. guaramirangae</i> Huber (Camelle <i>et al.</i> , 1982)

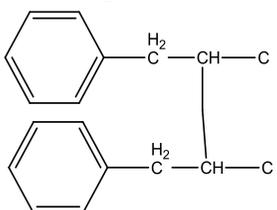
	<p><i>V. japurensis</i> Reichard (Pinheiro <i>et al.</i>, 1984)</p> <p><i>V. mexicana</i> Schltdl (Pihneiro <i>et al.</i>, 1984)</p> <p><i>V. rubescens</i> Oliv (Schultes, 1993)</p>
Madagascina	<p><i>V. guaramirangae</i> Huber (Camelle, 1982)</p> <p><i>V. martiana</i> Richard (Nagen y Faria de Jesus, 1990)</p> <p><i>V. parviflora</i> Cham & Schltdl (Nagen y Faustino, 1997)</p>
2-isoprenil-emodina	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Camelle <i>et al.</i> , 1982)
Metil-5,7-dihidroxi-2,2,9-trimetil-6,11-dihidroxi-2-Hantra [2,3-b] piran-8-carboxilato	<i>V. laurentii</i> De Wild (Tchamo <i>et al.</i> , 2008)
3-geranil-oxi-6-metil-1,8-dihidroxiantraquinona	<p><i>V. guianensis</i> Aubl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p> <p><i>V. orientalis</i> Engl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p>
3-(19-hidroxigeraniloxi)-6-metil-1,8-dihidroxiantraquino	<p><i>V. guianensis</i> Aubl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p> <p><i>V. orientalis</i> Engl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p>
3-O-(2-hidroxi-3-metil-but-3-enil)emodina	<p><i>V. guianensis</i> Aubl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p> <p><i>V. orientalis</i> Engl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p>
3-O-(2-metoxi-3-metil-but-3-enil)emodina	<p><i>V. guianensis</i> Aubl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p> <p><i>V. orientalis</i> Engl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p>
3-O-(3-hidroximetil-but-2-enil)emodina	<p><i>V. guianensis</i> Aubl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p> <p><i>V. orientalis</i> Engl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p>
3-O-(3-hidroximetil-4-hidroxi-2-enil)emodina	<p><i>V. guianensis</i> Aubl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p> <p><i>V. orientalis</i> Engl (Epifano <i>et al.</i>, 2007)</p>

Antronas 	
Ferruantrona	<i>V. baccifera</i> var. <i>ferruginea</i> Plach & Triana (Delle <i>et al.</i> , 1979) <i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzales <i>et al.</i> , 1980)
3-geraniloxi-6-metil-1,8-dihidroxiantrona	<i>V. laurentii</i> De Wild (Nguemeving <i>et al.</i> , 2006)
γ -hidroxiantrona A3	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Delle <i>et al.</i> , 1983)
Bioantrona A1	<i>V. guianensis</i> Aubl (Botta <i>et al.</i> , 1986)
Bivismiaquinona	<i>V. baccifera</i> Planch & Triana (Hussein <i>et al.</i> , 2003) <i>V. laurentii</i> De Wild (Nguemevig <i>et al.</i> , 2006)
Antranoides prenilados 	
Harunganina	<i>V. baccifera</i> var. <i>ferruginea</i> Plach & Triana (Delle <i>et al.</i> , 1979) <i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzales <i>et al.</i> , 1980) <i>V. macrophyla</i> Kunth (Hussein <i>et al.</i> , 2003)
Ferruginina A	<i>V. baccifera</i> var. <i>ferruginea</i> Plach & Triana (Delle <i>et al.</i> , 1979) <i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzales <i>et al.</i> , 1980) <i>V. macrophyla</i> Kunth (Hussein <i>et al.</i> , 2003)
Ferruginina B	<i>V. baccifera</i> var. <i>ferruginea</i> Plach & Triana (Delle <i>et al.</i> , 1979) <i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzales <i>et al.</i> , 1980) <i>V. macrophyla</i> Kunth (Hussein <i>et al.</i> , 2003) <i>V. mexicana</i> Schltdl (Pinheiro <i>et al.</i> , 1984)
Ferruginina C	<i>V. macrophyla</i> Kunth (Hussein <i>et al.</i> , 2003)

γ - hidroxiferru ginina A	<i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Camelle <i>et al.</i> , 1982) <i>V. guaramirangae</i> Huber (Camelle <i>et al.</i> , 1982)
γ,γ' -dihidroxiferru ginina A	<i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzalez <i>et al.</i> , 1980) <i>V. guaramirangae</i> Huber (Delle Monache <i>et al.</i> , 1983) <i>V. mexicana</i> Schltdl (Pinheiro <i>et al.</i> , 1984)
Vismiona A	<i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzalez <i>et al.</i> , 1980) <i>V. japurensis</i> Reichard (Miraglia <i>et al.</i> , 1981) <i>V. mexicana</i> Schltdl (Pinheiro <i>et al.</i> , 1984)
Vismiona B	<i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzalez <i>et al.</i> , 1980) <i>V. mexicana</i> Schltdl (Pinheiro <i>et al.</i> , 1984) <i>V. baccifera</i> Planch & Triana (Hussein <i>et al.</i> , 2003)
Vismiona H	<i>V. guianensis</i> Aubl (Botta <i>et al.</i> , 1986)
Vismina	<i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzalez <i>et al.</i> , 1980) <i>V. baccifera</i> Planch & Triana (Hussein <i>et al.</i> , 2003)
Deacetilvismiona A	<i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzalez <i>et al.</i> , 1980) <i>V. jefensis</i> N. Robson (Fuller <i>et al.</i> , 1999)
Acetilvismiona B	<i>V. japurensis</i> Reichard (Pinheiro <i>et al.</i> , 1984)
Diacetilvismiona H	<i>V. jefensis</i> N. Robson (Hussein <i>et al.</i> , 2003)
Flavonoides	
	
Kaempferol	<i>V. laurentii</i> De Wild (Nguemevig <i>et al.</i> , 2006)
Quercetina	<i>V. parviflora</i> Cham & Schltdl (Nagen y Faustino, 1997)
Benzofenonas	
	
Vismiofenona A	<i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzalez <i>et al.</i> , 1980)

	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Camelle <i>et al.</i> , 1982)
Vismiofenona B	<i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzalez <i>et al.</i> , 1980)
Vismiofenona C	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Camelle <i>et al.</i> , 1982)
Vismiofenona D y G	<i>V. cayeneensis</i> Jacq (Fuller <i>et al.</i> , 1999)
Isovismiafenona B	<i>V. decipiens</i> Cham & Schltdl (Gonzalez <i>et al.</i> , 1980)
Vismiagianona A, B, C, D y E	<i>V. guianensis</i> Aubl (Seo <i>et al.</i> , 2000)
Guttiferonas A, B, C, D y F	<i>Vismia spp</i> (Chilpa y Reyes, 2009)
<p>Xantonas</p> 	
1,4,8- trihidroxixantona	<i>V. latifolia</i> Aubl (Santos <i>et al.</i> , 2000) <i>V. rubescens</i> Oliv (Tamokou <i>et al.</i> , 2009)
1,3- dihidroxi-2- metoxixantona	<i>V. latifolia</i> Aubl (Santos <i>et al.</i> , 2000)
1,5-dihidroxi-8- metoxixantona	<i>V. latifolia</i> Aubl (Santos <i>et al.</i> , 2000)
O ¹ -demetil-3',4'- dioxipsorospermin- 3',4'-diol	<i>V. laurentii</i> De Wild (Nguemevig <i>et al.</i> , 2006)
Hipericanarina	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Cardona <i>et al.</i> , 1986)
Kielcorina	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Peres y Nagem, 1997)
Cadensina A, B, C y D	<i>V. guianensis</i> Aubl (Peres <i>et al.</i> , 2000)
8-hidroxi candensina D	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Cardona <i>et al.</i> , 1986)
Xantona prenilada V ₁ , V _{1a} , V ₂ y V _{2a}	<i>V. guianensis</i> Aubl (Botta <i>et al.</i> , 1986)

Laurentixantona A	<i>V. laurentii</i> De Wild (Nguemevig <i>et al.</i> , 2006)
Cumarinas 	
Vismiaguianina A y B	<i>V. guianensis</i> Aubl (Seo <i>et al.</i> , 2000)
Sesquiterpenos 	
trans- α -farneseno	<i>V. cayeneensis</i> Jacq (Pinheiro <i>et al.</i> , 1984)
cis- α -farneseno	<i>V. mexicana</i> Schltld (Pinheiro <i>et al.</i> , 1984)
Humuleno	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Camelle <i>et al.</i> , 1982)
β -sileneno	<i>V. japurensis</i> Reichard (Pinheiro <i>et al.</i> , 1984) <i>V. cayeneensis</i> Jacq (Pinheiro <i>et al.</i> , 1984)
Triterpenos 	
Sitosterol	<i>V. cayeneensis</i> Jacq (Miraglia <i>et al.</i> , 1981) <i>V. japurensis</i> Reichard (Simmonds <i>et al.</i> , 1982) <i>V. guaramirangae</i> Huber (Camelle <i>et al.</i> , 1982) <i>V. parviflora</i> Cham & Schltld (Nagen y Faustino, 1997) <i>V. martiana</i> Richard (Nagen y Faria de Jesus, 1990)
Estigmasterol	<i>V. laurentii</i> De Wild (Nguemevig <i>et al.</i> , 2006)
β -amirina	<i>V. cayeneensis</i> Jacq (Miraglia <i>et al.</i> , 1981)
Lupeol	<i>V. parviflora</i> Cham & Schltld (Nagen y Faustino, 1997)
Friedelano	<i>V. laurentii</i> De Wild (Nguemevig <i>et al.</i> , 2006)

Friedelanol	<i>V. rubescens</i> Oliv (Tamokou <i>et al.</i> , 2009) <i>V. laurentii</i> De Wild (Nguemevig <i>et al.</i> , 2006) <i>V. japurensis</i> Reichard (Miraglia <i>et al.</i> , 1981)
Friedelina	<i>V. japurensis</i> Reichard (Miraglia <i>et al.</i> , 1981) <i>V. martiana</i> Richard (Nagen y Faria de Jesus, 1990) <i>V. parviflora</i> Cham & Schltl (Nagen y Faustino, 1997) <i>V. laurentii</i> De Wild (Kuede <i>et al.</i> , 2007) <i>V. rubescens</i> Oliv (Tamokou <i>et al.</i> , 2009) <i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i> Planch & Triana (Salas <i>et al.</i> , 2008)
Dammaradienol	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Camelle <i>et al.</i> , 1982) <i>V. martiana</i> Richard (Nagen y Faria de Jesus, 1990)
Acido Betulinico	<i>V. cayeneensis</i> Jacq (Miraglia <i>et al.</i> , 1981) <i>V. martiana</i> Richard (Nagen y Faria de Jesus, 1990) <i>V. parviflora</i> Cham & Schltl (Nagen y Faustino, 1997)
Turical-7,24-dien-3-ona	<i>V. laurentii</i> De Wild (Noungoue <i>et al.</i> , 2008)
Stigmata-7,22-dien-3-ona	<i>V. laurentii</i> De Wild (Noungoue <i>et al.</i> , 2008)
<p>Lignan</p> 	
Siringaresinol	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Delle Monache <i>et al.</i> , 1983)
Deacetilsiringaresinol	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Delle Monache <i>et al.</i> , 1983)
Sesamina	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Delle Monache <i>et al.</i> , 1983) <i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i> Planch & Triana (Salas <i>et al.</i> , 2008)
5,5'-dimetoxisesamina	<i>V. guaramirangae</i> Huber (Camelle <i>et al.</i> , 1982)

3.4 Actividad biológica de compuestos y extractos de especies de *Vismia*

En la Tabla 3 se muestran ensayos biológicos hechos a extractos y compuestos aislados de especies del genero *Vismia*, realizados en Sudamérica, África y Europa, observándose que tienen actividad insecticida, antitumoral, así como antiviral y bactericida, siendo los compuestos más probados antranoides y lignanos.

**Tabla 3. Actividad biológica de compuestos del genero *Vismia*.
(Con base en Vizcaya *et al.*, 2012)**

Actividad Biológica Probada	Especie y sitio
Las vismionas y ferrugininas aisladas de <i>Vismia</i> inhiben el apetito en larvas de <i>Spodoptera</i> y <i>Locusta</i> (Simmonds <i>et al.</i> , 1985)	<i>Vismia sp.</i> (Guyana Francesa)
Actividad citotóxica y antitumoral de compuestos aislados de dicho genero (Delle Monache <i>et al.</i> , 1984)	<i>Vismia sp.</i> (Sudamérica)
Se emplean extractos en una composición cosmética dermatológica que estimula la síntesis de colágeno, útil contra los efectos del envejecimiento cutáneo, también mejora la cicatrización y trata las diversas patologías acompañadas de una deficiencia de colágeno (Bonte y Meybeck, 1997)	<i>V. cayennensis</i> , <i>V. guianensis</i> , <i>V. macrophylla</i> , <i>V. latifolia</i> , <i>V. sandwithii</i> , <i>V. sessilifolia</i> , <i>V. guinnensis</i> , <i>V. angusta</i> , <i>V. confertiflora</i> , <i>V. amazonica</i> , <i>V. dealbata</i> , <i>V. ferruginia</i> , <i>V. tomentosa</i> , <i>V. baccifera</i> , <i>V. lindeniana</i> y <i>V. japurensis</i> (España)
Extractos de MeOH y CH ₂ Cl ₂ no tienen actividad insecticida contra <i>Sitophiluz oryzae</i>	<i>V. baccifera</i> (Región de Lancillo)

(Broussalis <i>et al.</i> , 1999)	
Se establece un protocolo de regeneración <i>in vitro</i> a través de organogénesis, ya que dicha especie produce Vismiona A (compuesto anticanceroso) (Monacelli <i>et al.</i> , 1999)	<i>V. guiannensis</i>
Extracto inactivo contra el virus de herpes, sin embargo fue activo contra <i>Mycobacterium phlei</i> (López <i>et al.</i> , 2001)	<i>V. macrophylla</i> (Colombia)
Extractos etanólicos de frutos activos contra <i>Trypanosoma brucei</i> y <i>Trypanosoma cruzi</i> con un rango de actividad >10 µg/mL (Zacaria <i>et al.</i> , 2004)	<i>V. orientalis</i> (Tanzania)
Posee actividad contra el virus de herpes simple (HSB-1 y -2), mostrando una IC ₅₀ =5.5 µg/mL (Khan <i>et al.</i> , 2005)	<i>V. macrophylla</i>
Actividad antimalarica, la Vismiona H posee una IC ₅₀ =0.088 µg/mL (Menan <i>et al.</i> , 2006)	<i>V. guiannensis</i> (Este de África)
Actividad antibacteriana del extracto crudo, aislandose Sesamina, Friedelina y Vismiaquina contra <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> y <i>P. aeruginosa</i> , teniendo valores de CIM entre 2 a 5 mg/mL (Salas <i>et al.</i> , 2006)	<i>V. baccifera var. dealbata</i>
Extractos MeOH activos contra bacterias gram negativas y gram positivas y dos cepas de levaduras, obteniendose un rango de CIM entre 4.88 y >78.12 µg/mL (Kuate <i>et al.</i> , 2007)	<i>V. laurentii</i>

<p>Toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso en animales de experimentación (Salas <i>et al.</i>, 2007)</p>	<p><i>V. baccifera var. dealbata</i></p>
<p>Presento una IC₅₀=52.4 µg/mL contra <i>Leshmania amazonensis</i> (Estevez <i>et al.</i>, 2007)</p>	<p><i>V. tomentosa</i> (Grupo étnico Peruvian Chayahuita)</p>
<p>Actividad citotóxica <i>in vitro</i> del extracto, presentando un porcentaje de letalidad de -100 en la línea de células cancerosas KM-12 (Suffredini <i>et al.</i>, 2007)</p>	<p><i>V. guianensis</i> (Brasil)</p>
<p>Frutos extraídos por percolacion con éter de petróleo, AcOEt y MeOH, mostraron su capacidad captadora de radicales, teniendo mayor actividad el de AcOEt seguido por el de éter de petróleo, asociándose la actividad a ferruginina A y - hidroxiferruginina y la antraquinona vismiaquinona A (Alvarez <i>et al.</i>, 2008)</p>	<p><i>V. baccifera var. ferruginea</i> y <i>V. guianensis</i></p>
<p>La Sesamina, demostró tener actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer pulmonar con una IC₅₀=1 mg/mL (Salas <i>et al.</i>, 2008)</p>	<p><i>V. baccifera var. dealbata</i></p>
<p>La corteza presento una IC₅₀ >100 µg/mL para Leishmaniasis (Valadeau <i>et al.</i>, 2009)</p>	<p><i>V. baccifera</i> (Perú)</p>
<p>Infusión de hojas mostró una IC₅₀ >100 µg/mL para Leishmaniasis y 22.9 ± 8.9 µg/mL contra la malaria (Valadeau <i>et al.</i>, 2009)</p>	<p><i>V. pozuzoensis</i> (Perú)</p>
<p>La xantona aislada de esta planta interviene en el efecto vasodilatador sobre las arterias en</p>	<p><i>V. latifolia</i> (Brasil)</p>

ratas pequeñas, a través de la inhibición de los mecanismos sensibles al calcio activados por la proteína quinasa C (Camara <i>et al.</i> , 2010)	
Los extractos de los tallos de dicha planta, mostró elevada actividad antioxidante (Lizcano <i>et al.</i> , 2010)	<i>V. baccifera</i> (Amazonas)

3.5- Generalidades del VIH

En 1981 se descubrió una nueva enfermedad humana, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Dos años después se identificó el agente causal, el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), descubierto por un equipo de investigadores del Instituto Pasteur; sin embargo fue hasta 1984 que este hallazgo tomo relevancia tras la confirmación por parte de investigadores estadounidenses de que un retrovirus era el responsable de la enfermedad (Reyes-Chilpa y Huerta-Reyes, 2009; Hirsch y Curran, 1996). También se identificó que el principal blanco del VIH son los linfocitos CD4+, debido a que estas células son parte importante del mecanismo de defensa del organismo, la disminución de estas favorece la aparición de infecciones que resultan letales (Sierra *et al.*, 2005). Actualmente más de 40 millones de personas están infectadas con VIH y han ocurrido 24 millones de fallecimientos en todo el mundo, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de compuestos activos (Reyes-Chilpa y Huerta-Reyes, 2009).

3.6- Ciclo de replicación del VIH.

La replicación del VIH-1 se lleva a cabo en diez pasos (Cos *et al.*, 2004; Figura 3), que son: 1) La interacción de los viriones libres con la célula. 2) La unión y fusión del virus, mediante las glicoproteínas virales gp120 (SU) y gp41 (TM), con los receptores CD4+ (Dalgleish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984) y los correceptores de quimiocinas CXCR4 o CCR5 de la célula hospedera (Fauci, 1996). 3) Las partículas virales parcialmente desnudas quedan libres en el citoplasma. 4) Se inicia la transcripción del ARN viral en un ADNc de doble cadena (Hu y Temin, 1990), proceso que es regulado por la enzima Transcriptasa Reversa (RT) (Freed y Martin, 2001). 5) El ADN producto de la retrotranscripción es transportado a través del citoplasma hacia el interior del núcleo, donde es integrado al ADN cromosomal de la célula hospedera mediante la enzima IN que forma parte del complejo de preintegración (Pullen y Champoux, 1990). 6) El ADN viral integrado sirve como molde para que la ARN polimerasa dependiente de ADN (Pol II) sintetice los ARNm que son traducidos en proteínas virales en el citoplasma de las células infectadas (Evans y Levy, 1993). 7). El precursor de las glicoproteínas gp160 y las poliproteínas de Gag y Gag/Pol son transportadas por vías independientes hacia la membrana. 8) Éstas participan en la formación de partículas esféricas que contienen las glicoproteínas virales TM y SU. 9) Éstas emergen de la célula como viriones inmaduros (Berman *et al.*, 1988). 10) La proteólisis subsecuente, mediada por la proteasa ubicada en el virión inmaduro, genera partículas que contienen la nucleocápside cónica característica de los viriones maduros (Kato *et al.*, 1985). La proteólisis puede ocurrir durante o inmediatamente después de que la partícula viral deja la célula (Freed y Martin, 2001; Goff, 2001).

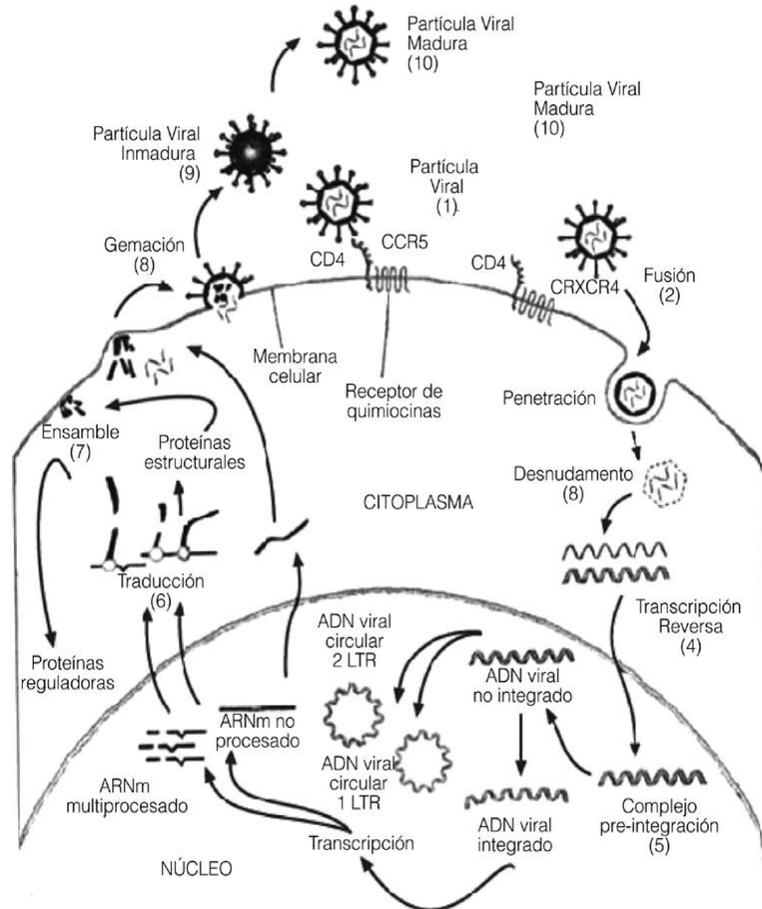


Figura 3. Ciclo replicativo del VIH

3.7- Fármacos usados contra el VIH

Se han desarrollado fármacos para combatir la enfermedad y en los últimos años han aparecido en el mercado medicamentos que aunque no erradican por completo la infección, aumentan considerablemente la esperanza de vida. Se clasifican según su mecanismo de acción en inhibidores de proteasa, inhibidores de la fusión e inhibidores de la retrotranscriptasa, estos a su vez se pueden separar en nucleosídicos y no nucleosídicos (Tabla 4), a pesar de ello, menos del 7% de la población infectada con VIH tiene acceso a estos tratamientos debido a sus altos costos y a la escasa disponibilidad (Esparza, 2005). Un aspecto importante que hay que tomar en cuenta, es que los medicamentos pueden

provocar efectos adversos, como pueden ser diarreas, dolores de cabeza, anemia, anorexia, dolores abdominales, erupciones, entre otros (Mullin *et al.*, 2000) por todo esto es necesario seguir con la búsqueda de compuestos naturales que ayuden en las terapias.

Tabla 4. Fármacos usados para el tratamiento del VIH.

(Adaptado de Sierra *et al.*, 2005)

Fármacos	Tipo de compuesto	Mecanismo de acción
Zidovudina (AZT), Didanosida (ddI), Zalcitabina (ddC), Statudina (d4T), Lamivudina (3TC), Abacavir (ABC), Tenofovir	Inhibidores Nucleosídicos de la RT (IN-RT)	Bloquean la retrotranscripción, pues son análogos nucleosídicos o nucleotídicos que carecen del grupo hidroxilo en la posición 3' de la ribosa
Nevirapina, Delavirdina, Efavirenz	Inhibidores no Nucleosídicos de la RT (INNRT)	Se unen específicamente a la RT del VIH-1 alterando el sitio activo de la enzima y reduciendo la unión de los nucleótidos naturales
Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprénavir, Lopinavir	Inhibidores de la Proteasa (IP)	Son moléculas que mimetizan los sitios de anclaje del polipéptido Gag-pol y por lo tanto compiten con él por la proteasa. Esto lleva a la producción de partículas virales inmaduras no infecciosas
Enfurtivida	Inhibidores de la Fusión (IF)	Son péptidos que se unen a las proteínas gp 41 y bloquean la fusión de la membrana viral con la membrana celular

3.8- Extractos y Compuestos de plantas con actividad antiviral (VIH-1).

Se estima que el 80% de las personas que viven en países en vías de desarrollo dependen casi exclusivamente de la medicina tradicional para aliviar sus malestares, es por ello que ha resultado muy interesante la búsqueda de terapias anti-VIH a base de compuestos naturales presentes en organismos vivos. Este tipo de investigaciones permitirán elaborar tratamientos accesibles y de bajo costo que combatan eficazmente el SIDA (Cos *et al.*, 2004).

Numerosas investigaciones han demostrado que una amplia gama de agentes virales es susceptible al tratamiento con extractos de plantas. Compuestos naturales como son los flavonoides, terpenoides, lignanos, alcaloides y saponinas entre otros, presentan actividad antiviral contra virus como el de la influenza, los de la hepatitis B y C, el del herpes simple y los rotavirus. En investigaciones con el VIH se ha descubierto que ciertos flavonoides, cumarinas, polisacáridos, triterpenos y proteínas tienen actividad anti-VIH que actúan sobre diferentes etapas del ciclo de replicación (Jassim y Naji, 2003).

En un estudio bioprospectivo se evaluaron los efectos inhibitorios de los extractos orgánicos de las hojas de las 21 especies de la familia Clusiaceae *sensu lato* en México, sobre la Transcriptasa Reversa del Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (TR-VIH-1) (Huerta-Reyes *et al.*, 2004). Cinco de estas presentaron una alta actividad inhibitoria (mayor al 70%). La especie más activa fue *Calophyllum brasiliense*, seguida de *Vismia mexicana*, cuyo extracto de diclorometano-metanol (1:1) presentó 72.9% de inhibición, de este último género también se evaluaron otras dos especies, observándose los siguientes resultados (Tabla 5), a la fecha se desconocen los compuestos presentes en dichas plantas. Aunque algunos autores consideran que *V. mexicana* y *V. baccifera* son sinónimos, en este trabajo se consideraron como especies diferentes siguiendo los resultados de Huerta-Reyes *et al.*, 2004.

Tabla 5. Inhibición de la Transcriptasa Reversa del VIH-1 de extractos de hojas de *Vismia* spp. de México (Huerta Reyes *et al.*, 2004).

Especie	Estado	% de inhibición (50 µg/ml)
<i>V. baccifera</i>	Oaxaca	57.8
<i>V. camparagüey</i>	Oaxaca	70.8
<i>V. mexicana</i>	Chiapas	72.9

4- OBJETIVOS

-Determinar la actividad inhibitoria del extracto de *Vismia mexicana* sobre la enzima transcriptasa reversa del VIH-1.

-Determinar la actividad inhibitoria de las fracciones de un extracto de las hojas de *Vismia mexicana* sobre la transcriptasa reversa del VIH-1.

-Conocer la composición química de las fracciones del extracto de *Vismia mexicana*.

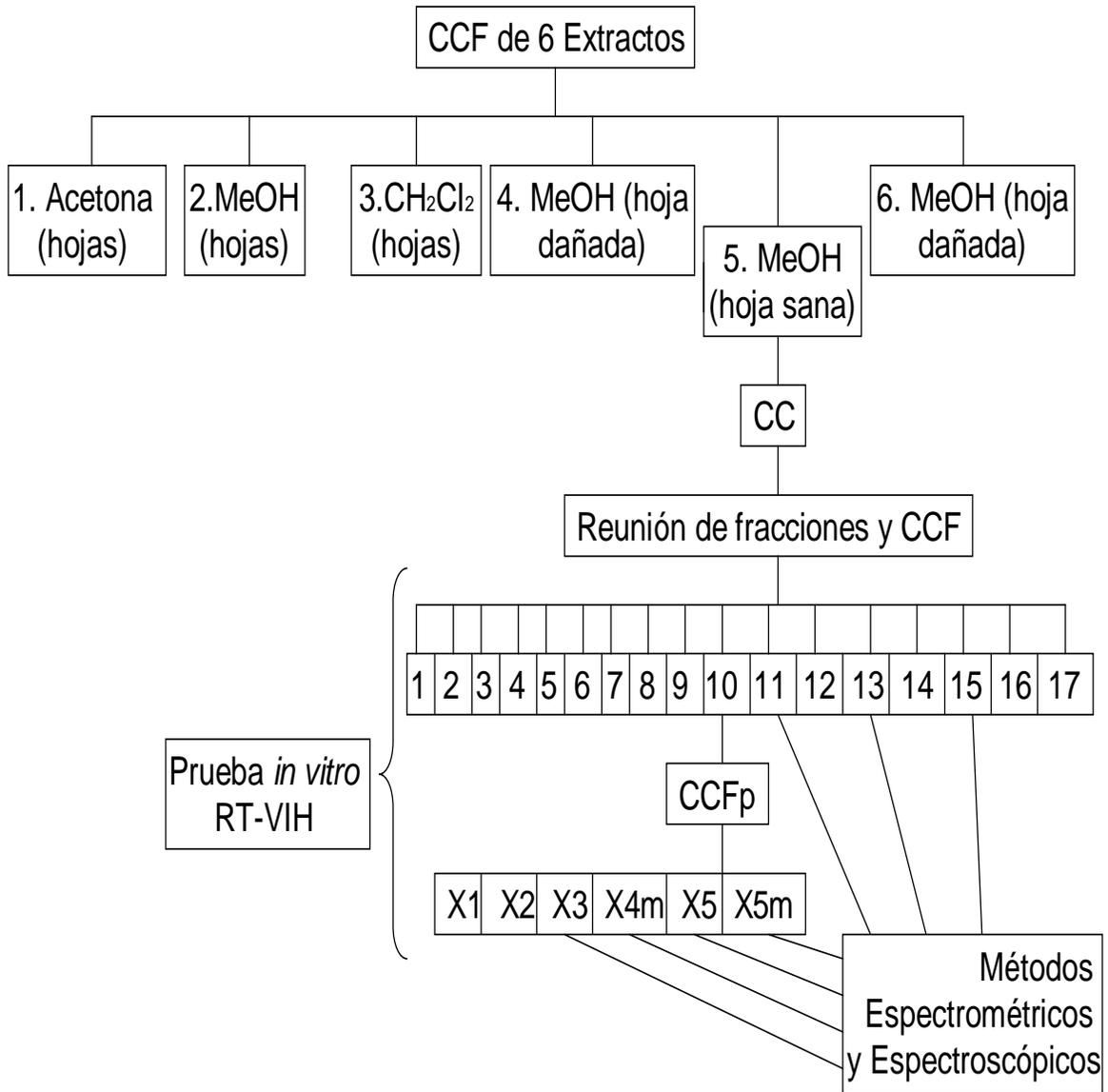
-Determinar la actividad inhibitoria sobre la Transcriptasa Reversa del VIH-1 de varios compuestos relacionados con los presentes en el extracto de *Vismia mexicana*.

5- MATERIALES Y METODOS

Para el estudio químico y biológico se empleo la metodología señalada en la Fig. 4 y consistió de las siguientes etapas:

- 1.- Se emplearon extractos de hojas tanto sanas y atacadas (por hongos y herbivoría) de *Vismia mexicana* colectadas en el Estado de Veracruz, en 2008 por el Biol. Edgar Estrella Parra.
- 2.- Los extractos de acetona, diclometano y metanolicos fueron analizados por Cromatografía en Capa Fina (CCF) siguiendo los protocolos ya establecidos en el laboratorio (Reyes *et al*, 2004; Huerta *et al*, 2004) y se eligió el de composición mas simple.
- 3.- El aislamiento de los compuestos principales se realizó por métodos cromatográficos del extracto seleccionado: Columna Abierta (CC), Capa Fina Analítica (CCF) de las fracciones y preparativa (CCFp) de las fracciones, usando Silica Gel 60 (fase normal) y Silica Gel C-18 (fase reversa).
- 4.- La identificación de los compuestos aislados se efectuó por métodos espectroscópicos (Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C , Ultravioleta y Espectrometría de Masas) (Reyes *et al*, 2004; Huerta *et al*, 2004).
- 5.- Se determinó la actividad inhibitoria del extracto seleccionado, así como de fracciones y subfracciones que lo constituyen, sobre la RT del VIH-1 utilizando el Kit Inmunocolorimétrico Cadvi Tech de acuerdo a la metodología publicada (Huerta-Reyes *et al*, 2004, Anexo 1).

Fig. 3. Esquema general de la metodología de este trabajo.



6- RESULTADOS

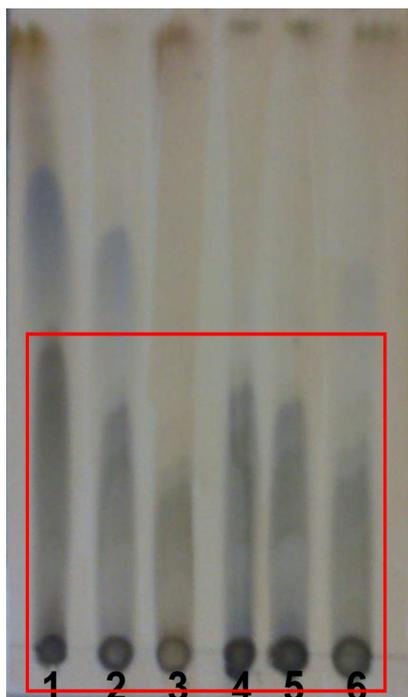
6.1- Cromatografía en Capa Fina de Extractos (CCF)

Se analizaron mediante CCF 6 extractos de hojas de *V. mexicana* (Tabla 6 y Fig. 4) colectados en Xico, Veracruz durante 2008 (cf. Estrella Parra, 2010), en especial para detectar compuestos fenólicos (flavonoides glicosilados). Para este fin, se emplearon cromatofolios de aluminio de Silica Gel 60, se aplicaron 5 µl de los extractos a una concentración de 50 mg/ml, eluyendo con Acetato de Etilo/Metanol (9:1) y para visualizar los compuestos se observaron las placas bajo luz UV (254 y 365 nm) y después de aplicar el revelador Cloruro Férrico (FeCl₃ al 1% en MeOH) para detectar compuestos fenólicos.

Tabla 6 y Fig. 4. Extractos de *Vismia mexicana* analizados por CCF (Silica Gel 60; AcOEt/MeOH 9:1).

. *Extracto seleccionado para trabajar

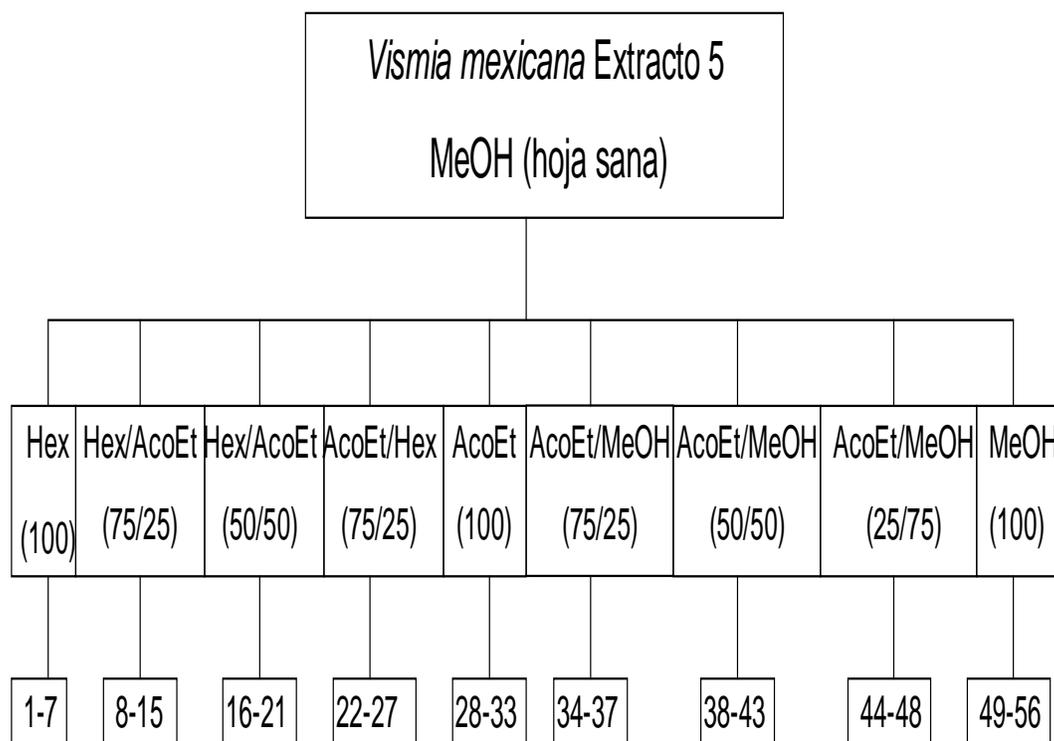
Extracto	Parte usada
1-Acetona	Hojas
2-Metanol	Hojas
3-Dicloro-metanol	Hojas
4-Metanol	Hoja dañada
*5-Metanol	Hoja sana
6-Metanol	Hoja dañada



6.2- Cromatografía en Columna de un extracto (CC)

Se seleccionó el extracto 5 (MeOH hoja sana) para separar sus componentes químicos mediante cromatografía en columna (CC) por ser el más simple de todos los analizados. El extracto (10.12g) se impregnó en celita y esta se colocó sobre la fase estacionaria Silica Gel 60 (100g). Como fase móvil se emplearon diferentes disolventes en orden creciente de polaridad y se recogieron fracciones de 200 ml (Fig. 6). Las fracciones se concentraron en rotavapor y se analizaron por CCF como previamente se ha descrito.

Fig. 5. Cromatografía en Columna Extracto de MeOH de *Vismia mexicana* .



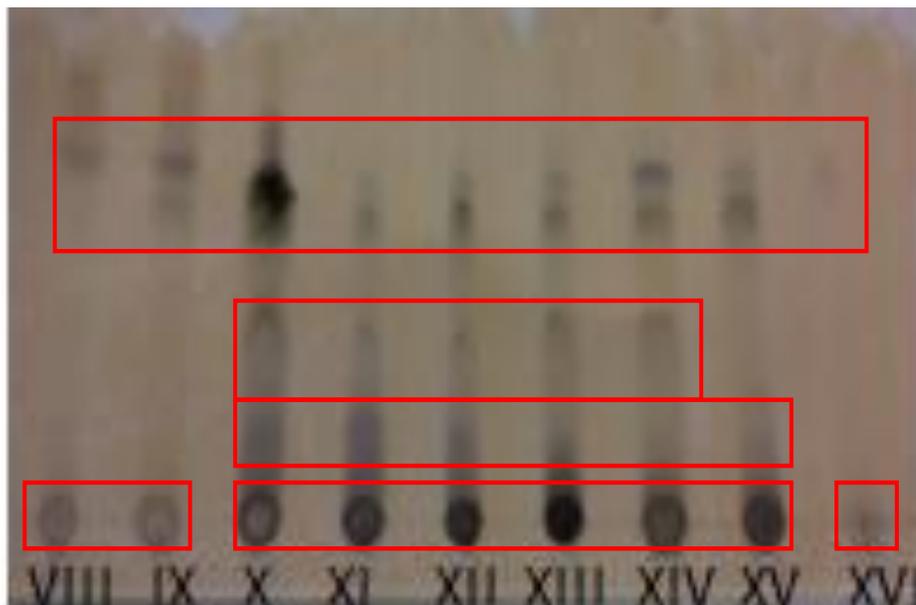
Se analizaron por CCF todas las fracciones y se reunieron aquellas que fueron similares, obteniéndose 17 fracciones secundarias (I-XVII) (Tabla 7).

Tabla 7. Reunión de las fracciones de la CC.

Reunión de fracciones	
1-2 (I)	32-33 (IX)
3-8 (II)	34-37 (X)
9-10 (III)	37 (XI)
11-13 (IV)	38-39 (XII)
14-16 (V)	40-42 (XIII)
17-20 (VI)	43-44 (XIV)
21-25 (VII)	45 (XV) 46 (XVI)
26-31 (VIII)	y 55-56 (XVII)

Posteriormente dichas fracciones se analizaron por CCF (Silica Gel 60), fase móvil: AcOEt/ MeOH (8:2), encontrando reacción positiva para fenoles (manchas oscuras) con FeCl₃ en las fracciones VIII-XVI, indicando la posible presencia de flavonoides (Fig. 7). Estas fracciones también se analizaron por CCF fase reversa (Silica Gel C-18) usando como eluyentes MeOH/ H₂O 1:1 y 7:3, mostrando poca resolución en ambos sistemas, aunque el primero fue ligeramente mejor.

Fig. 7. CCF de las fracciones VIII a XVI (Silica Gel 60; AcOEt/MeOH 8:2).



6.3- Cromatografía en Capa Fina Preparativa de la fracción X (CCFP)

Considerando los resultados obtenidos con el anterior análisis, se eligió trabajar con la fracción X. Se procedió a intentar separar los compuestos presentes mediante CCFP (Cromatografía de Capa Fina Preparativa) de 2mm de espesor, empleando como fase móvil AcOEt/MeOH (8:2). No fue necesario revelar con FeCl_3 pues fue fácil apreciar cinco franjas visibles al UV, denominándolas X1 a X5. Las franjas X1 a X5 se rasparon y eluyeron con AcOEt/MeOH (8:2), adicionalmente la X4 y X5 se eluyeron posteriormente con MeOH, denominándolas X4m, y X5m. Una vez obtenidas las subfracciones de la CCFP se realizó CCF en fase normal en cromatofolios de aluminio en silica gel 60, usando como fase móvil AcOEt/MeOH (8:2) (Fig. 8), así como en CCF fase reversa en cromatofolios de aluminio en silica C-18 usando como fase móvil MeOH/ H_2O (6:4) (Fig. 9), en ambos casos se usó como revelador FeCl_3 (al 1% en MeOH). En fase normal la mayoría de las fracciones mostraron una sola mancha, mientras que en fase reversa se observaron generalmente dos (Figs. 8 y 9).

Fig. 8. CCF (fase normal) de las fracciones secundarias X1, X2, X3, X4, X5, X4m, X5m, obtenidas del extracto 5, fracción X (Silica Gel 60; AcOEt/MeOH 8:2).

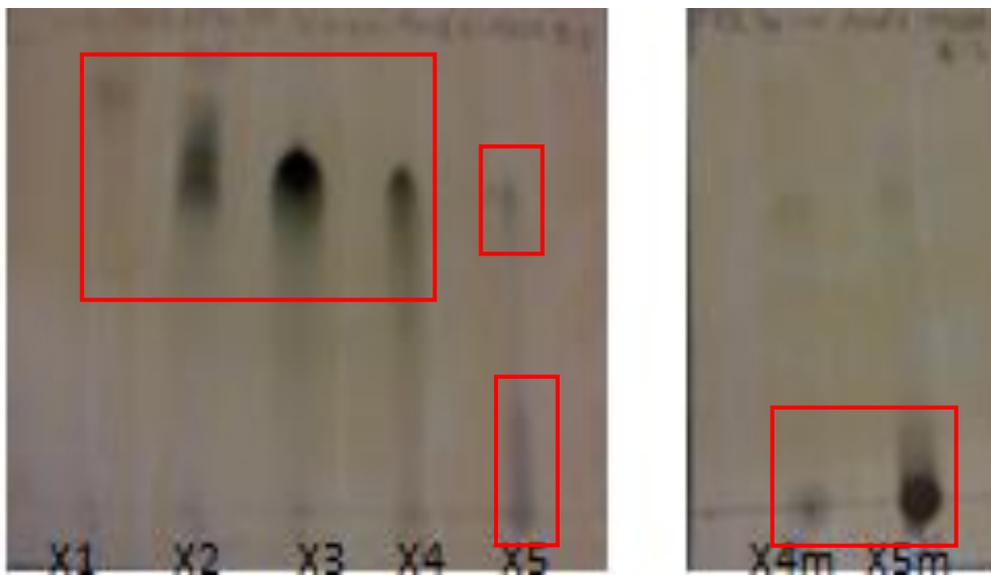
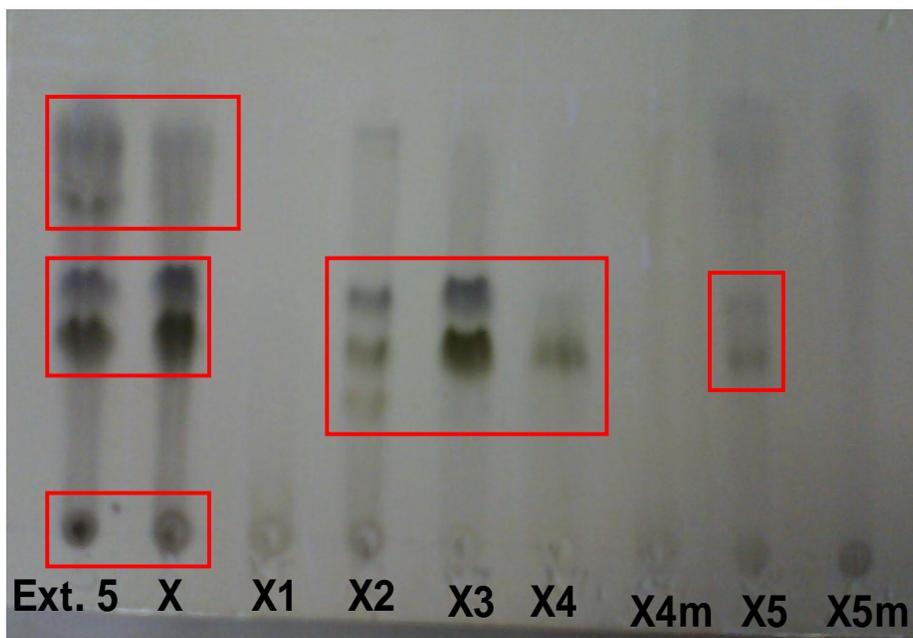


Fig. 9. CCF (fase reversa) de las fracciones secundarias X1, X2, X3, X4, X5, X4m, X5m, obtenidas del extracto 5, fracción X (Silica Gel C-18; MeOH/H₂O 6:4).



6.4- Identificación tentativa de muestras

6.4.1- Fracción X3

La CCF fase reversa (Fig. 9) sugirió que esta fracción es una mezcla de al menos dos componentes. El espectro de UV (Fig. 10) se determinó en el equipo UV-Visible Shimadza V160, e indicó que contiene compuestos de tipo aromático por las absorciones λ_{max} en 340, 290, 266 y 206 nm, lo anterior fue confirmado por el espectro de RMN¹H (Fig. 11) con base en las señales entre 5.5 a 7.5 ppm, sugiriendo que se trata de flavonoides, los cuales están glicosilados, esto por las señales para carbohidratos en 3.5 a 5.5 ppm. Estas pueden ser dos residuos de rhamnosa por las señal dobles en 1.17 (J = 4 Hz) y 0.93 (J = 4.4 Hz) asignadas a los hidrógenos del metilo en la posición 6. El espectro de RMN ¹³C (Fig. 12 y 13) mostró 58 señales, sugiriendo la presencia de tres flavonoides glicosilados (3x C₆C₃C₆-C₆). El espectro de masas obtenido mediante la técnica de bombardeo de átomos rápidos en modo positivo (FAB+) (Fig. 14) sugirió la presencia de flavonoides glicosilados con rhamnosa con un peso molecular de 521.

Fig. 10. Análisis de X3 por UV.

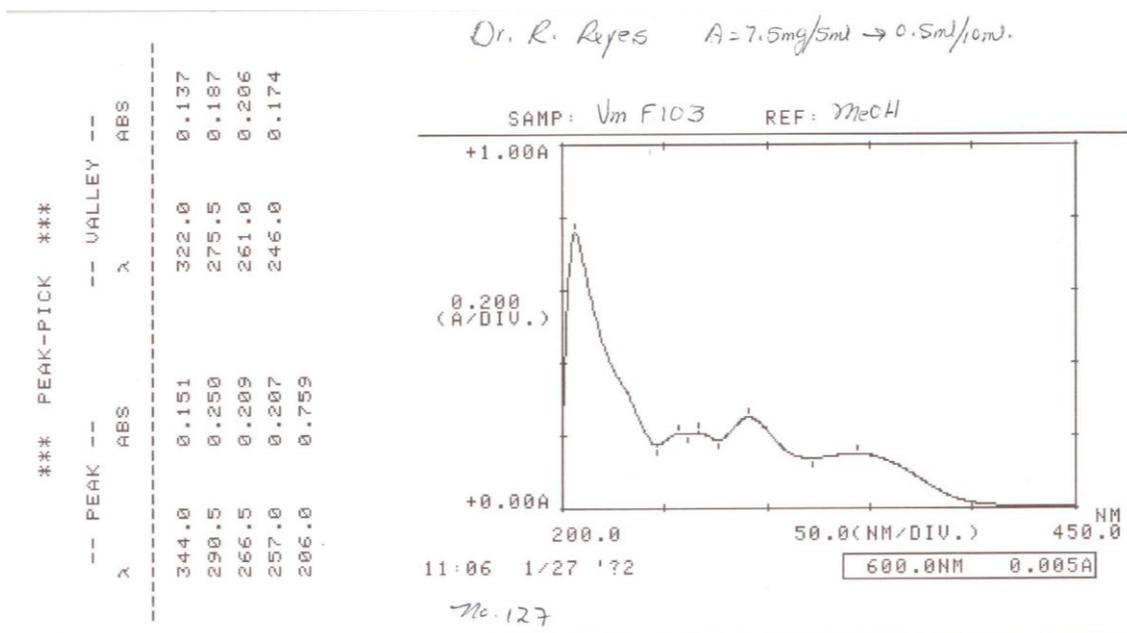


Fig. 11. Espectro de RMN¹H de la fracción X3. CD₃OD/TMS, 200 MHz.

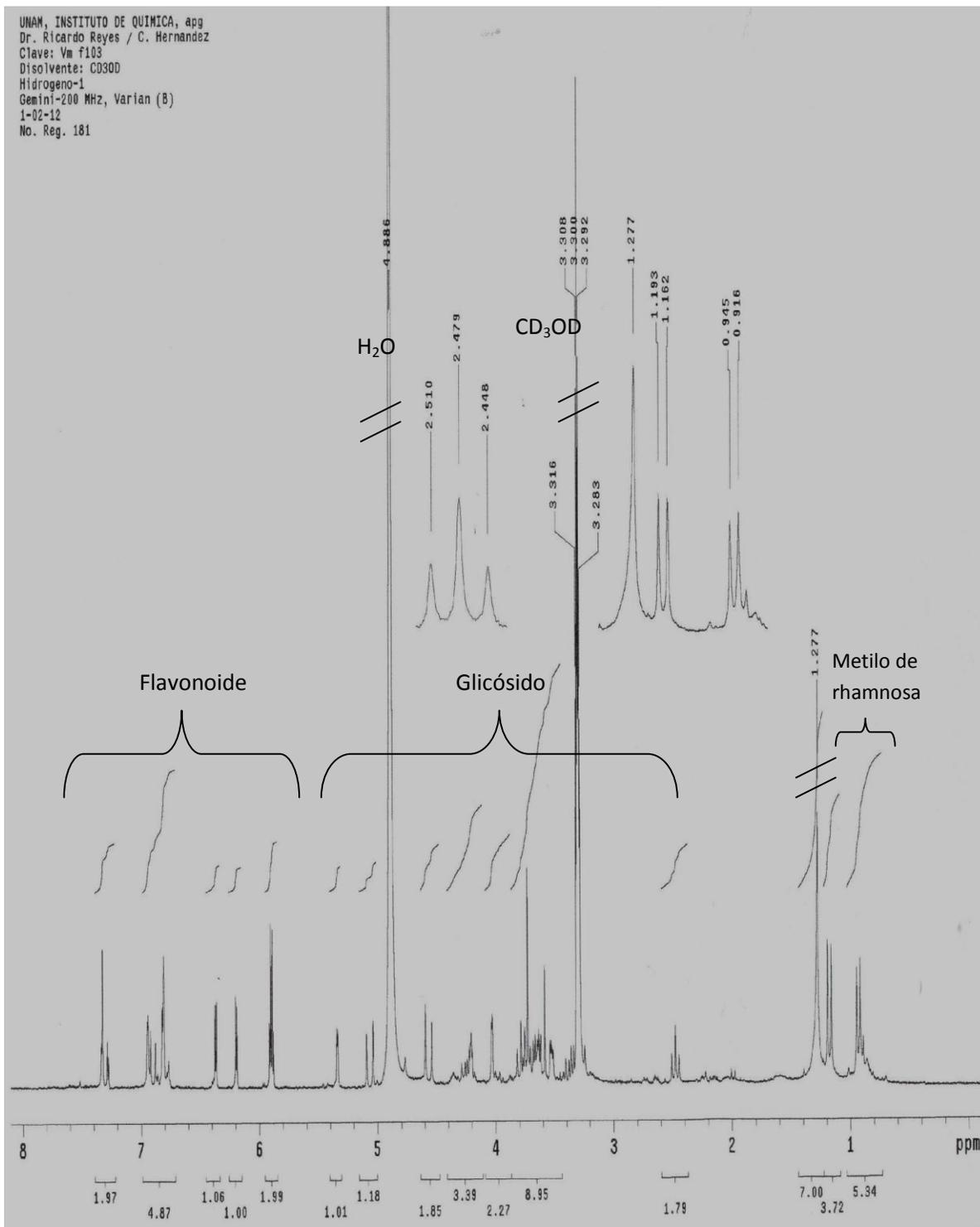


Fig. 12. Espectro de RMN¹³C de fracción X3. Señales a campo alto para los C de la mezcla de flavonoides glicosilados. CD₃OD/TMS, 50 MHz.

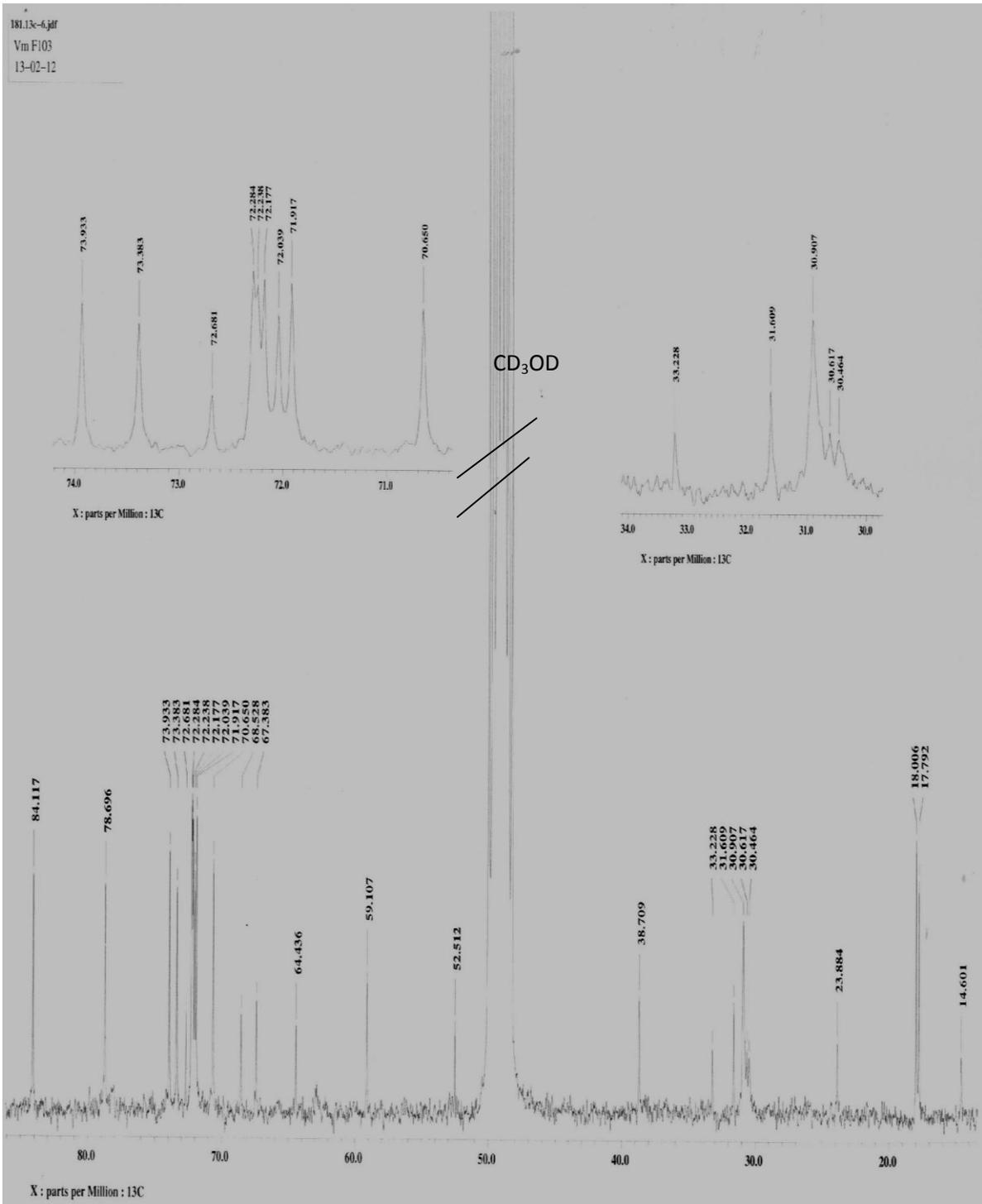


Fig. 13. Espectro de RMN¹³C de la fracción X3. Señales a campo bajo para los C de la mezcla de flavonoides. CD₃OD/TMS, 50 MHz.

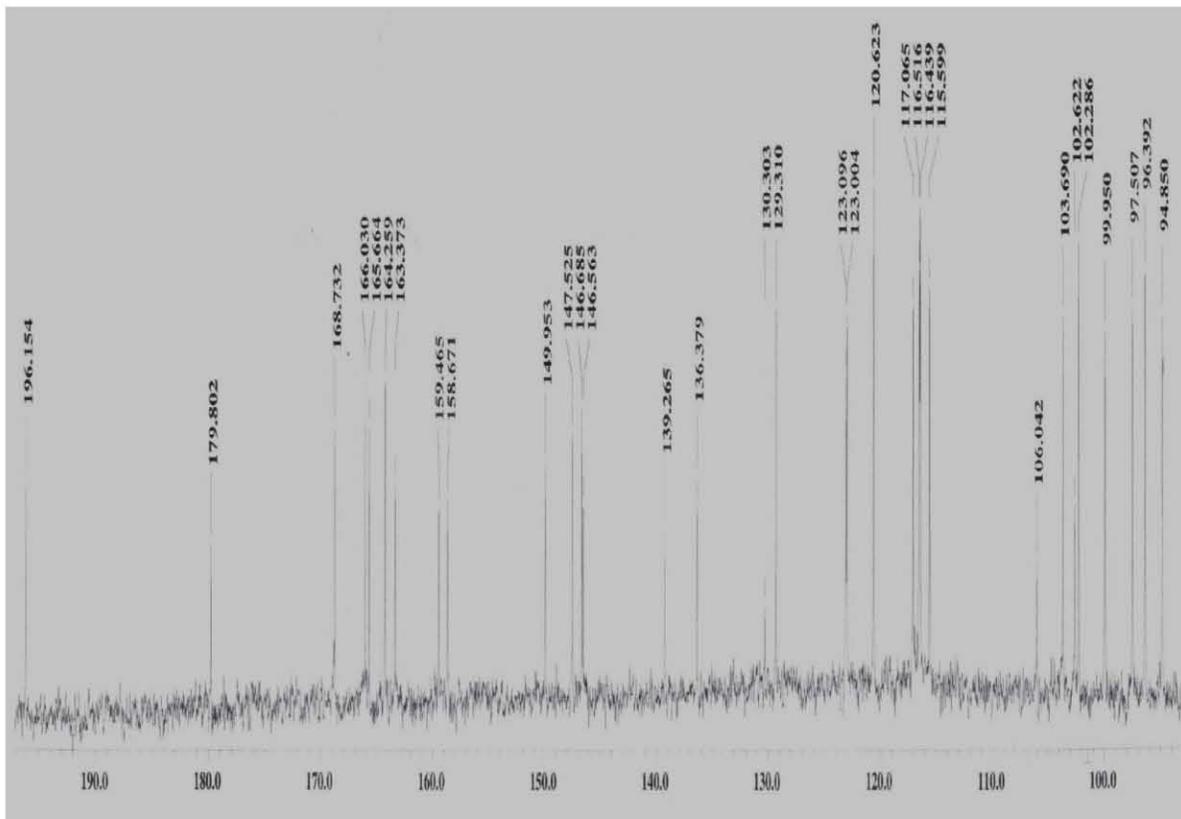
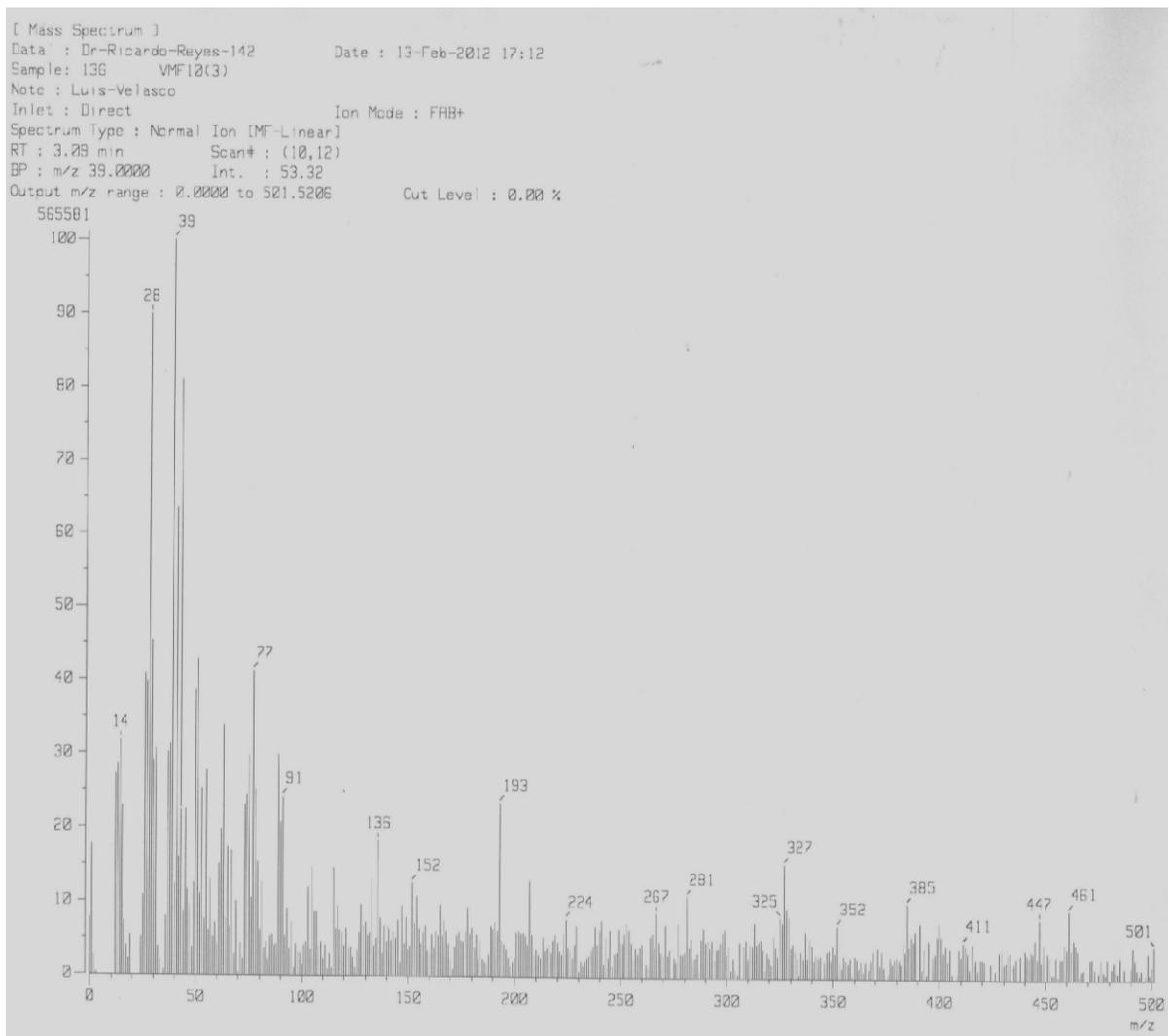


Fig. 14. Espectro de Masas, fracción X3. FAB+.



En el espectro de RMN¹³C de la fracción X3 se compararon los valores reportados para los compuestos Astilbin y Engeletin (Fig. 15) (Huang *et al.*, 2011) para determinar la presencia de dichos compuestos en la fracción analizada, obteniéndose como conclusión que estos compuestos están presentes en dicha fracción (Tabla 8). Por la complejidad del espectro de RMN¹H de esta fracción, no se asignaron los ¹H para cada uno de dichos compuestos.

Fig. 15. Estructuras del Astilbin pm: 450 (izq) y de Engeletin pm: 434 (der).

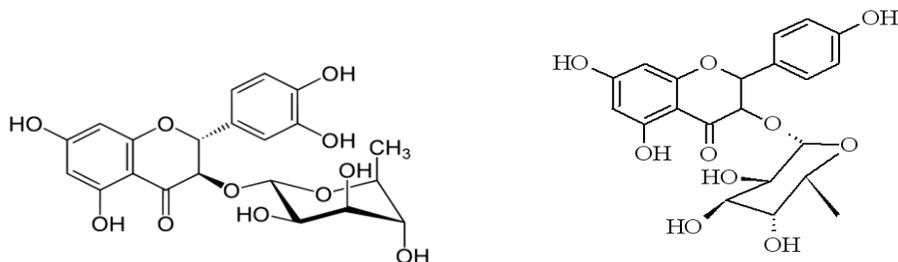


Tabla 8. Valores de RMN¹³C para Astilbin, Engeletin y fracción X3 según Huang *et al.*, 2011.

C	Astilbin	Fracción X3	Engeletin	Fracción X3
2	83.96	84.1	83.83	84.1
3	78.56	78.6	78.66	78.6
4	196.00	196.1	196.05	196.1
5	165.52	165.6	165.47	165.6
6	97.37	97.5	97.39	97.5
7	168.62	168.7	168.53	168.7
8	96.25	96.3	96.25	96.3
9	164.11	164.2	164.10	164.2
10	102.48	102.6	102.20	102.6
1'	129.18	129.3	128.58	129.3
2'	116.30	116.4	130.05	130.3
3'	146.54	146.5	116.41	116.5
4'	147.38	147.5	159.42	159.4
5'	115.46	115.5	116.41	116.4
6'	120.48	120.6	130.05	130.3
1''	102.14	102.2	102.48	102.6
2''	71.77	71.9	71.74	71.9
3''	72.15	72.1	72.12	72.1
4''	73.79	73.6	73.76	73.6
5''	70.50	70.6	70.50	70.6
6''	17.85	17.7	17.85	17.7

6.4.2- Fracción X4 y subfraccion X4m

La fracción X4 mostró una sola mancha en CCF fase normal y fase reversa al revelar con FeCl_3 (Figs. 8 y 9) la cual fue analizada por UV (Fig. 16) e indicó que contiene un compuesto de tipo aromático por las absorciones λ_{max} en 350, 289, 255 y 208.5 nm, siendo similar al espectro de X3 (340, 290, 266 y 206 nm) (Fig. 10), sugiriendo que también contiene flavonoides glicosilados.

La subfraccion X4m analizada por CCF fase normal y fase reversa (Figs. 8 y 9) no reveló con FeCl_3 indicando que no posee compuestos fenólicos, lo cual fue corroborado al analizarla por RMN^1H . (Fig. 17) observándose principalmente señales para carbohidratos (1-4 ppm) y señales traza para flavonoides (5.5-8 ppm).

Fig. 16. Análisis de UV de fracción X4.

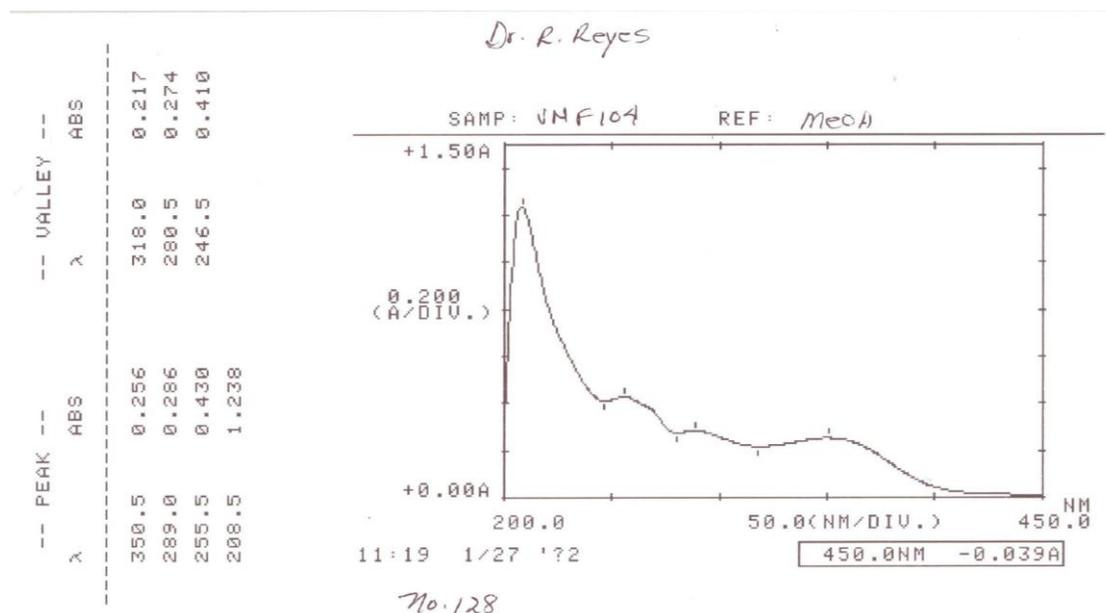
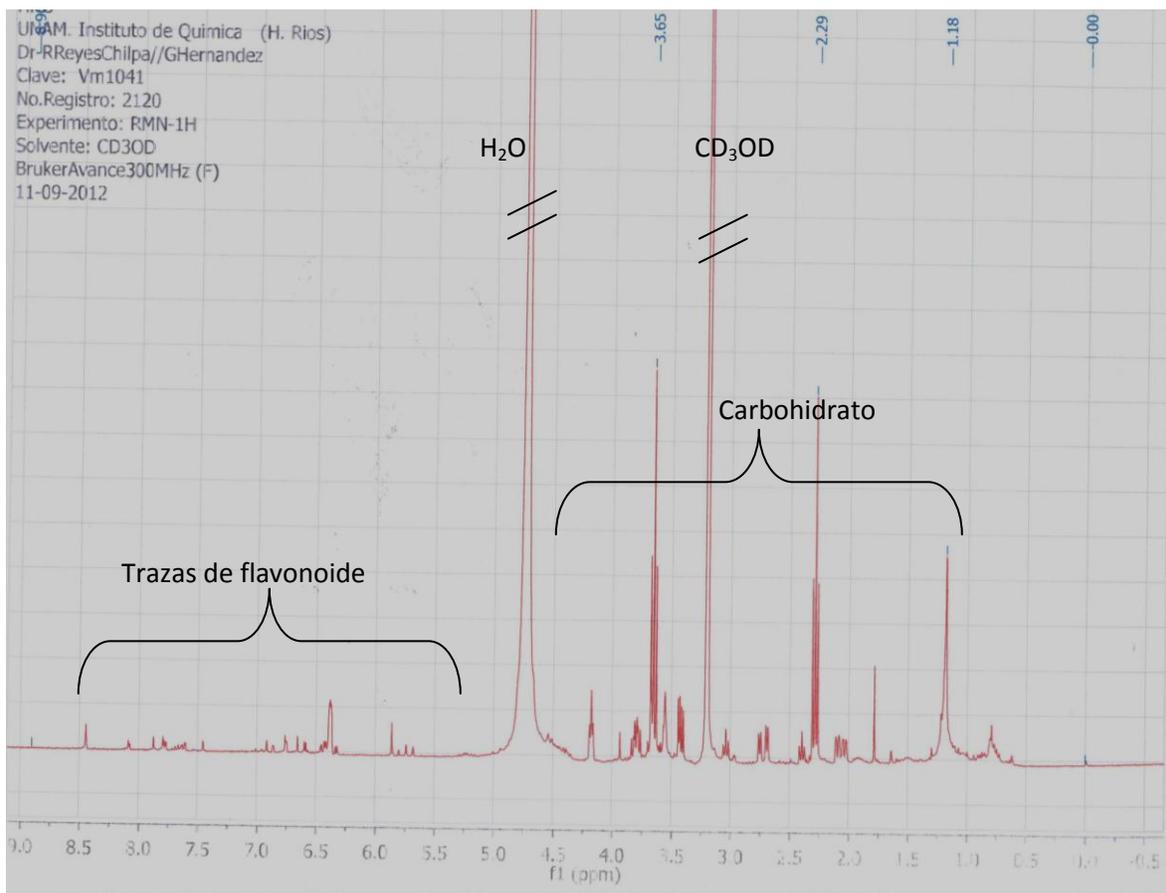


Fig. 17. Análisis de RMN¹H de la subfracción X4m. CD₃OD/TMS. 300 MHz.



6.4.3- Fracción X5 y subfracción X5m.

La fracción X5 analizada por CCF fase normal y fase reversa (Figs. 8 y 9) reveló ligeramente con FeCl₃, al analizarla por RMN¹H. (Fig. 18) se observaron principalmente señales para carbohidratos (3-5 ppm). La subfracción X5m analizada por CCF fase normal (Fig. 8) reveló en el punto de aplicación con FeCl₃; sin embargo esto no se apreció de manera tan contundente en fase reversa (Fig. 9). Al analizarla por RMN¹H se observaron principalmente señales para carbohidratos (3-5 ppm). (Fig. 19).

Fig. 18. Espectro de RMN¹H de la fracción X5. CD₃OD/TMS, 300 MHz.

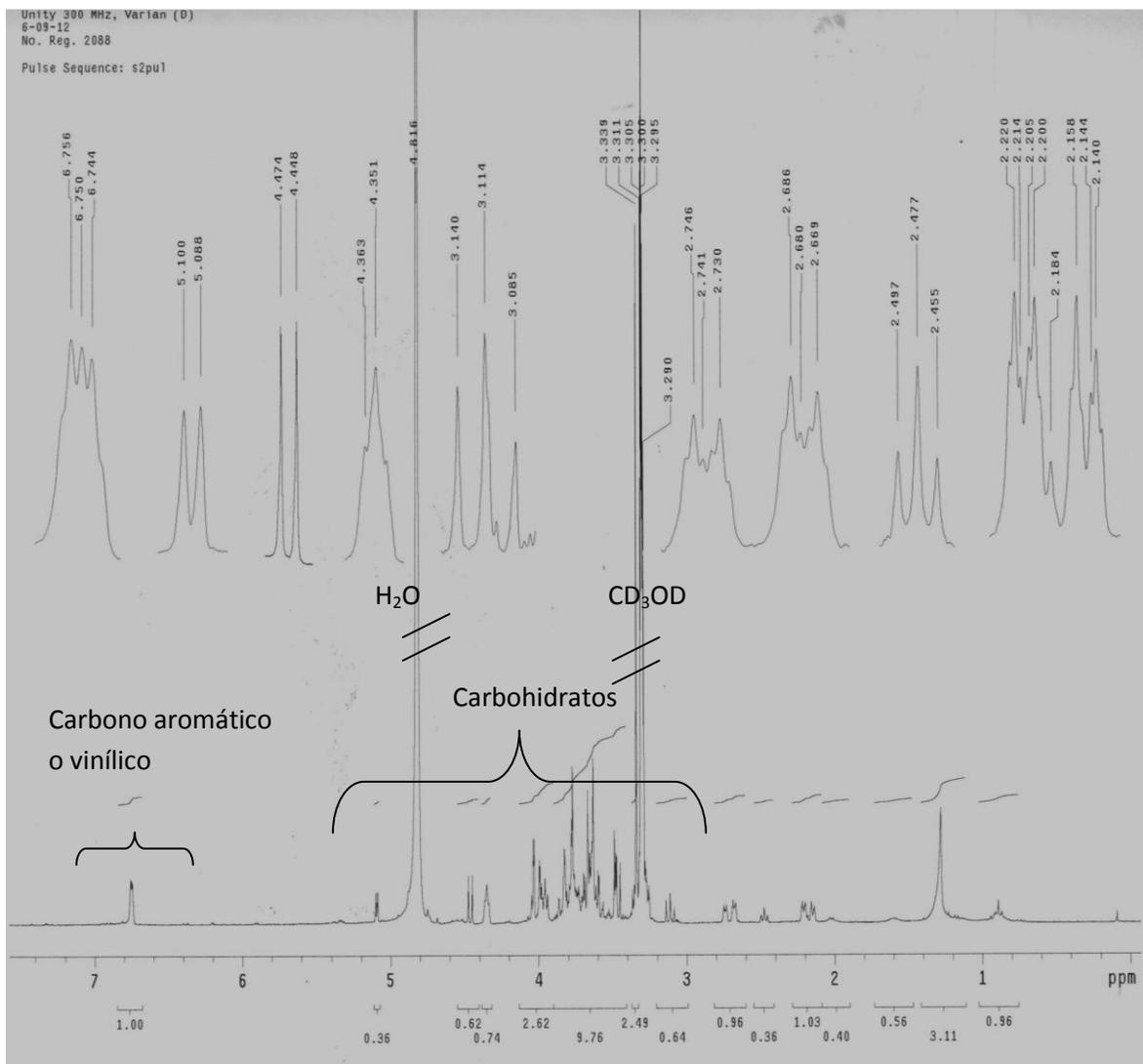
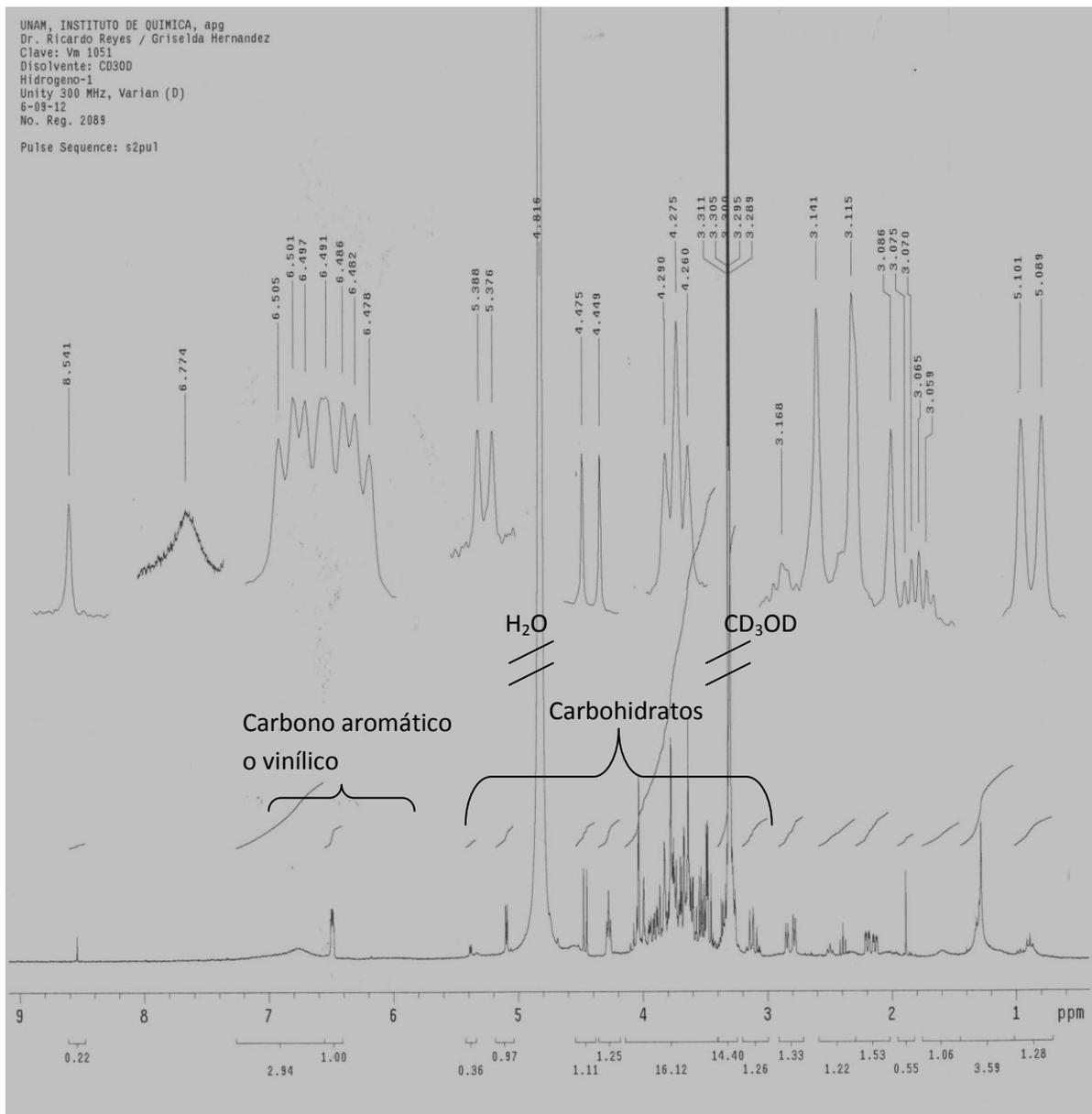


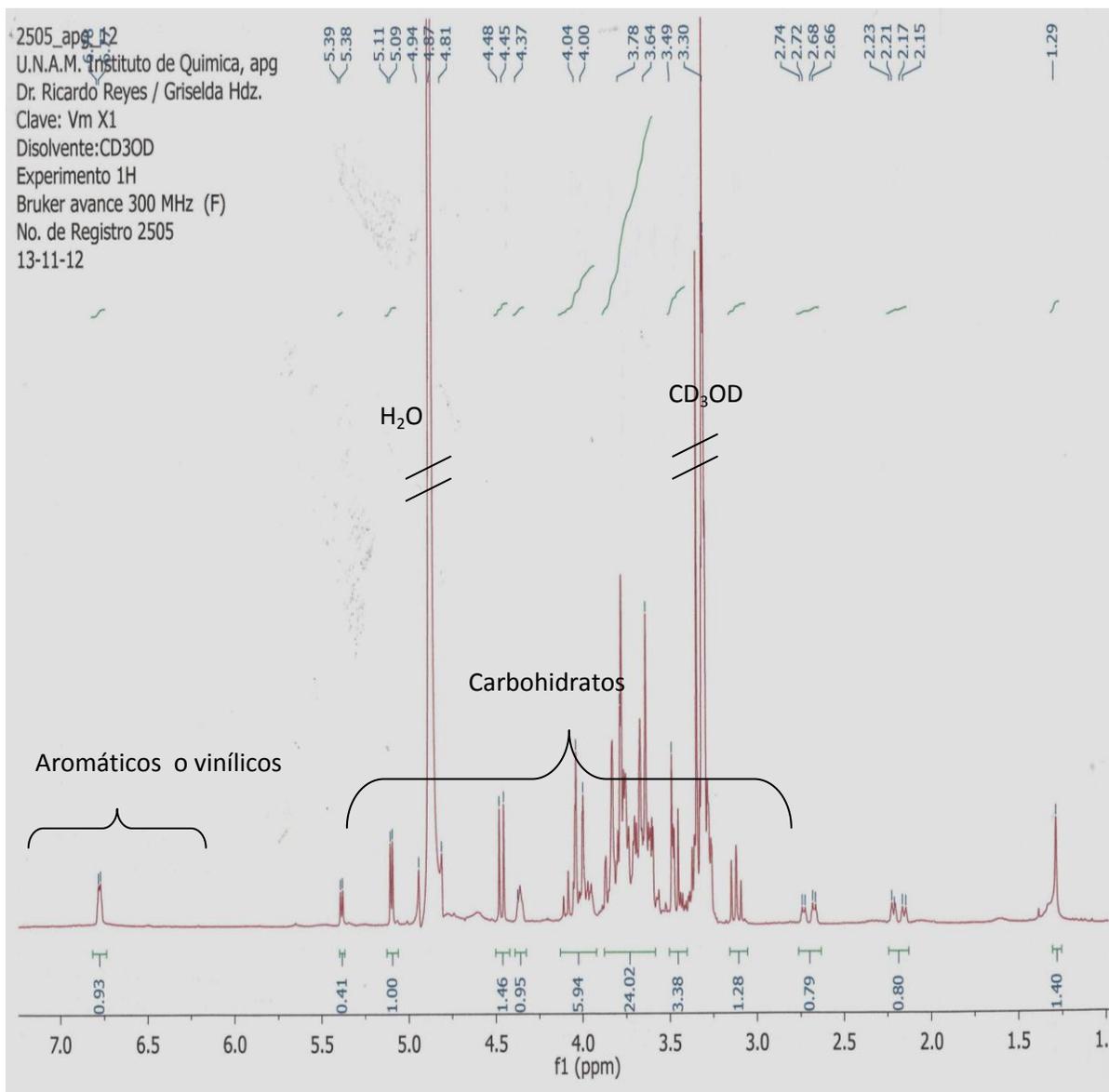
Fig. 19. Espectro de RMN¹H de la subfraccion X5m. CD₃OD/TMS, 300 MHz.



6.4.4- Fracción XI

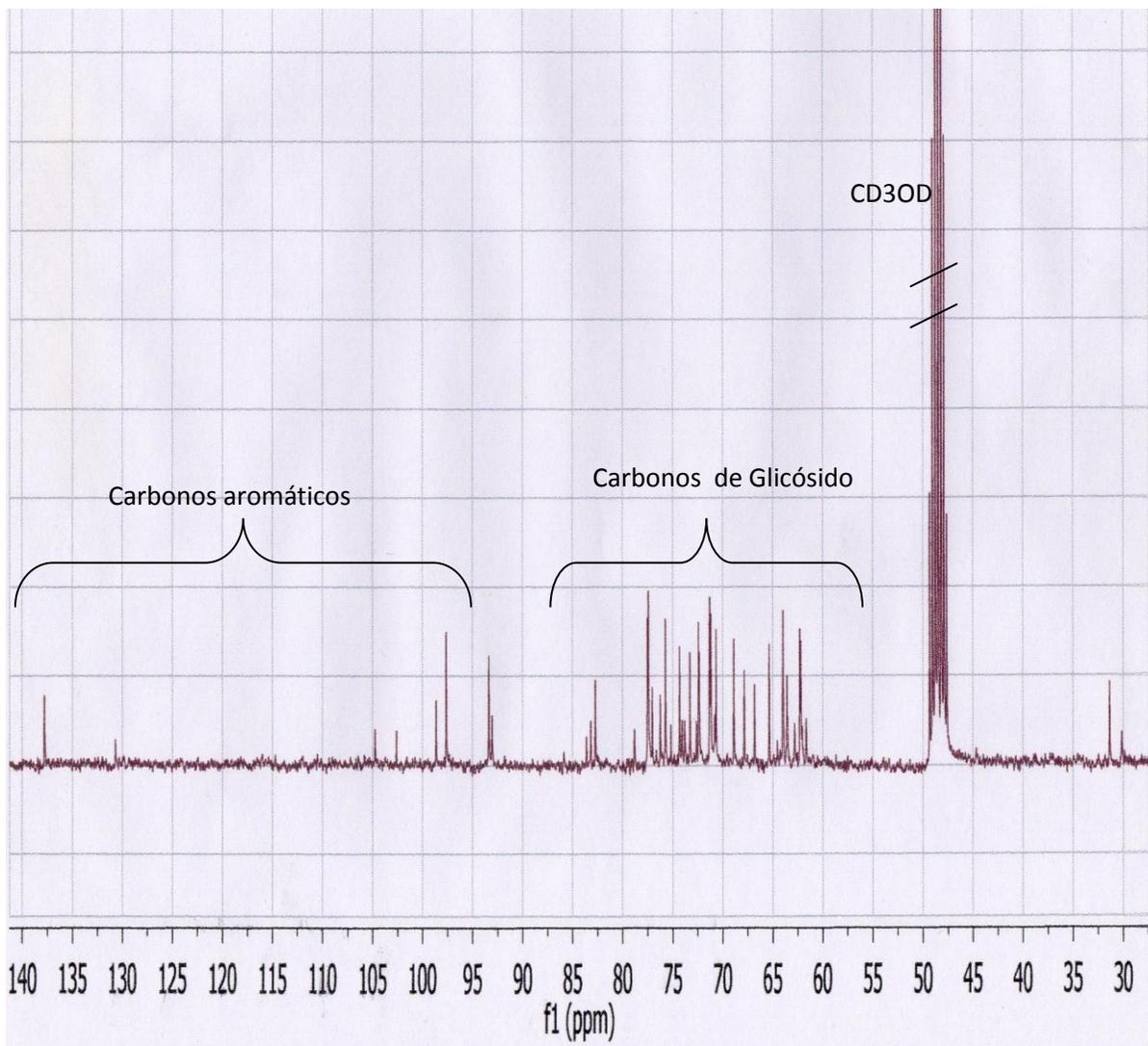
La fracción XI presentó reacción positiva para FeCl_3 en CCF fase normal (Fig. 7), sin embargo al analizarse por RMN¹H. (Fig. 20) se observaron principalmente señales para carbohidratos.

Fig. 20. Espectro de RMN¹H de la fracción XI. $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$, 300 MHz.



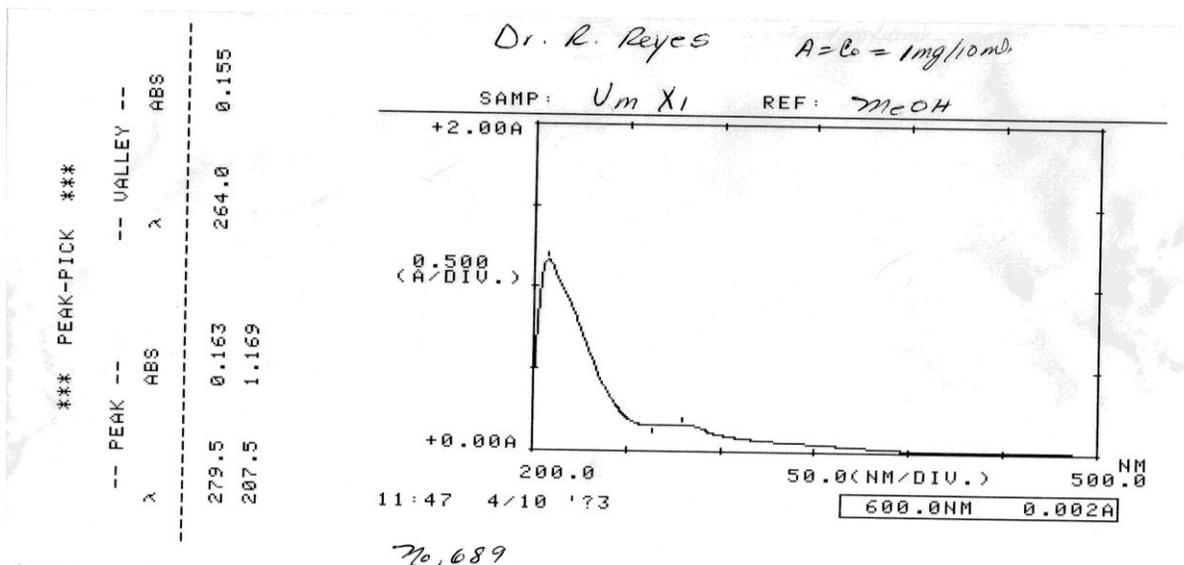
Esta fracción también se sometió a RMN¹³C pudiéndose apreciar que presenta señales para carbohidratos principalmente, así como para carbonos aromáticos o vinílicos (Fig. 21).

Fig. 21. Espectro de RMN¹³C de fracción XI. CD₃OD/TMS, 300 MHz.



En el espectro de UV (Fig. 22) se observaron bandas en λ_{max} 207 y 279 nm indicando se trata de un compuesto(s) con dobles enlaces, corroborando lo observado en RMN.

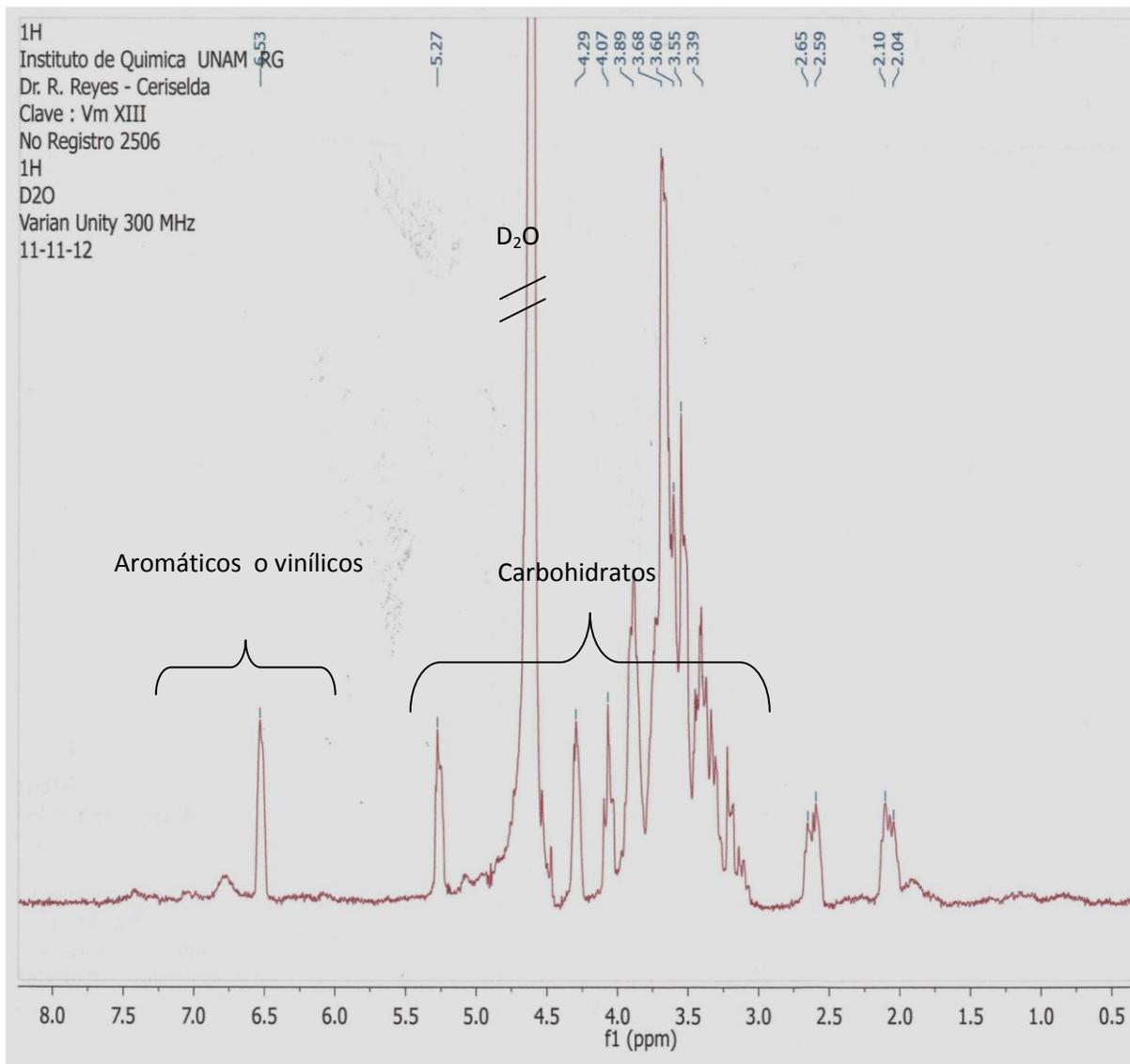
Fig. 22. Análisis de UV de fracción XI.



6.4.5- Fracción XIII

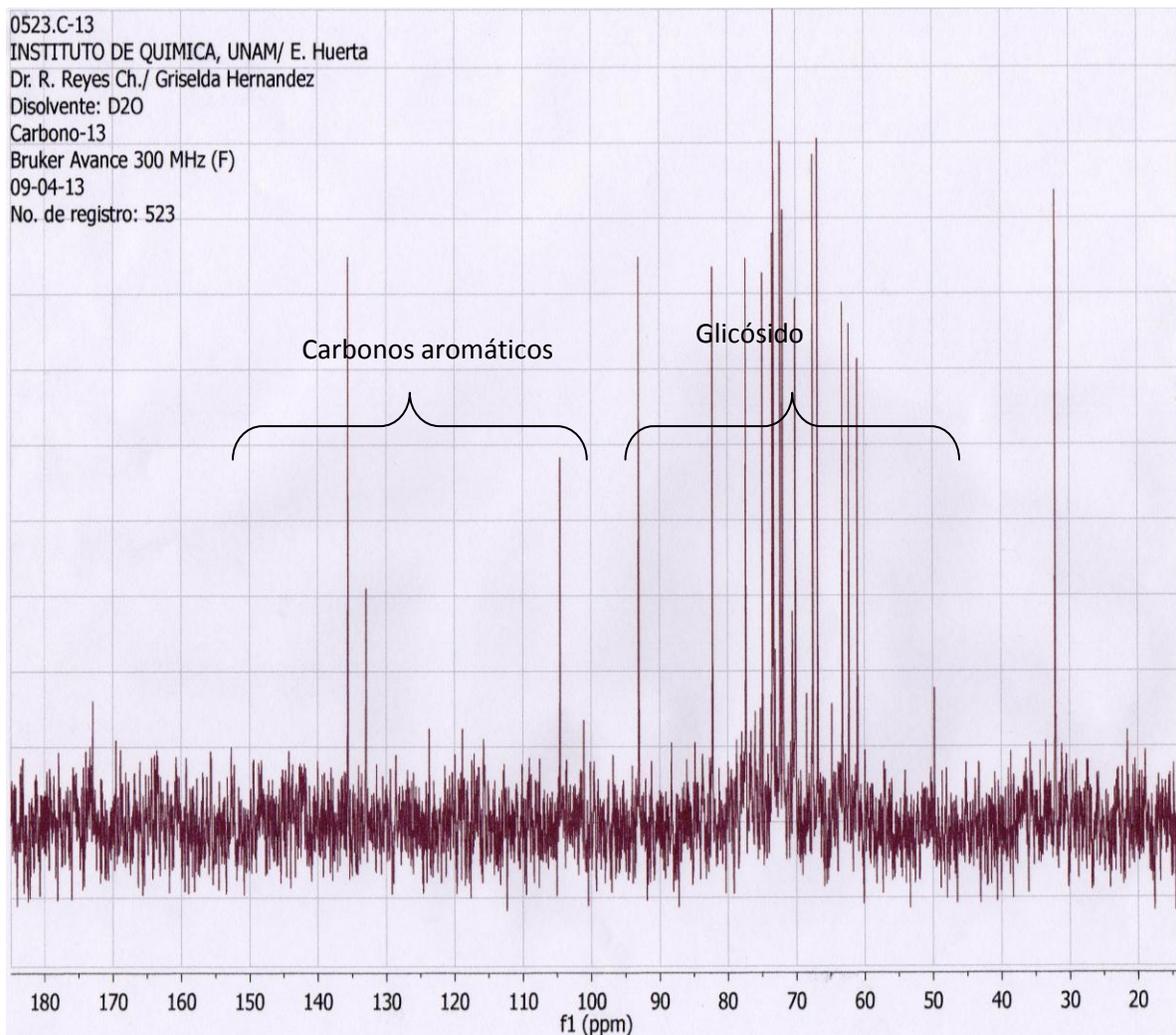
La fracción XIII tuvo reacción positiva para FeCl_3 en CCF fase normal (Fig. 7), al analizarse por RMN^1H . (Fig. 23) se observaron principalmente señales para carbohidratos.

Fig. 23. Espectro de RMN¹H de fracción XIII. D₂O, 300 MHz.



Esta fracción se sometió a RMN¹³C pudiéndose apreciar que presenta señales para carbohidratos principalmente, así como para carbonos aromáticos o vinílicos (Fig. 24).

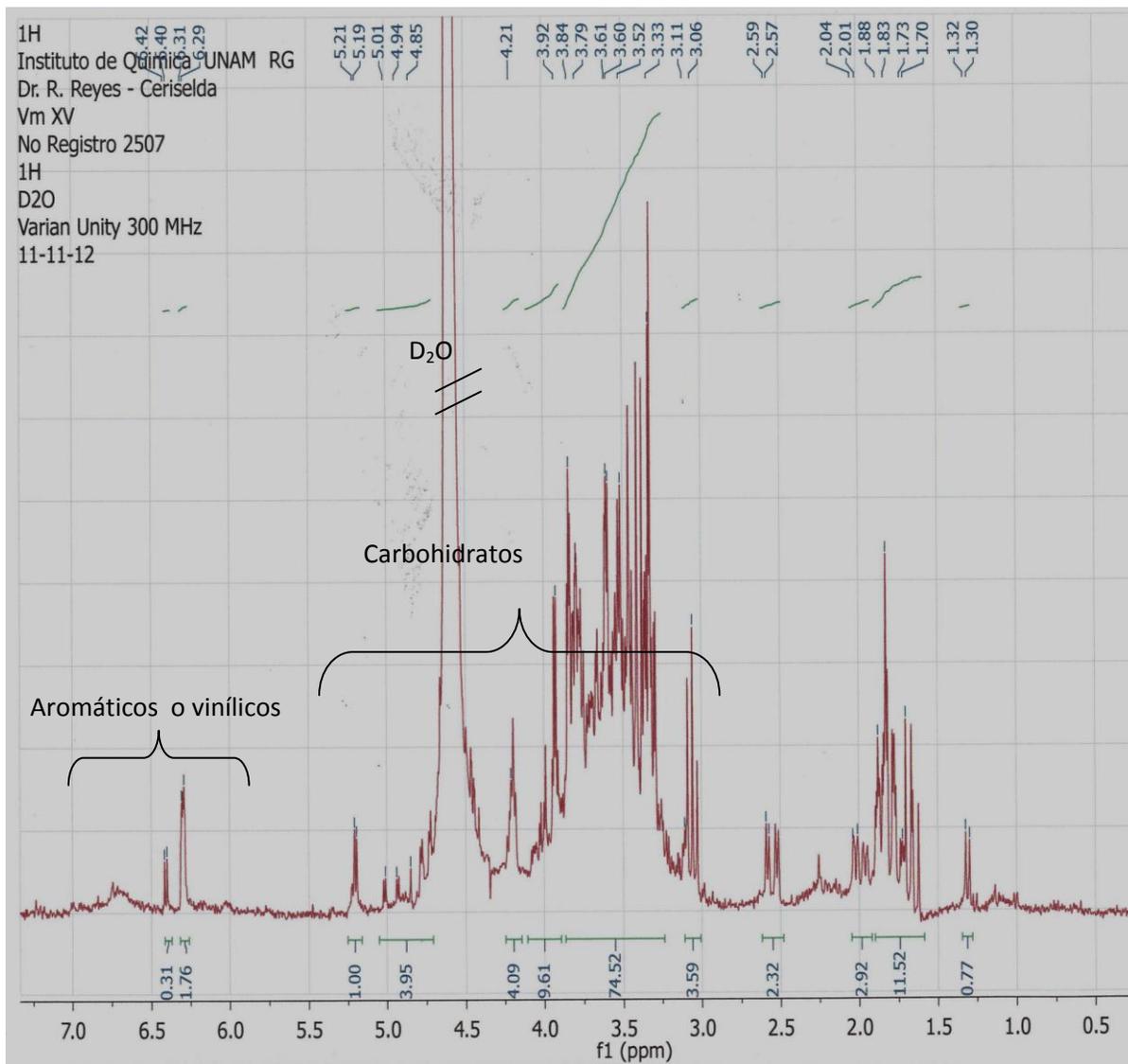
Fig. 24. Espectro de RMN¹³C de la fracción XIII. D₂O, 300 MHz.



6.4.6- Fracción XV

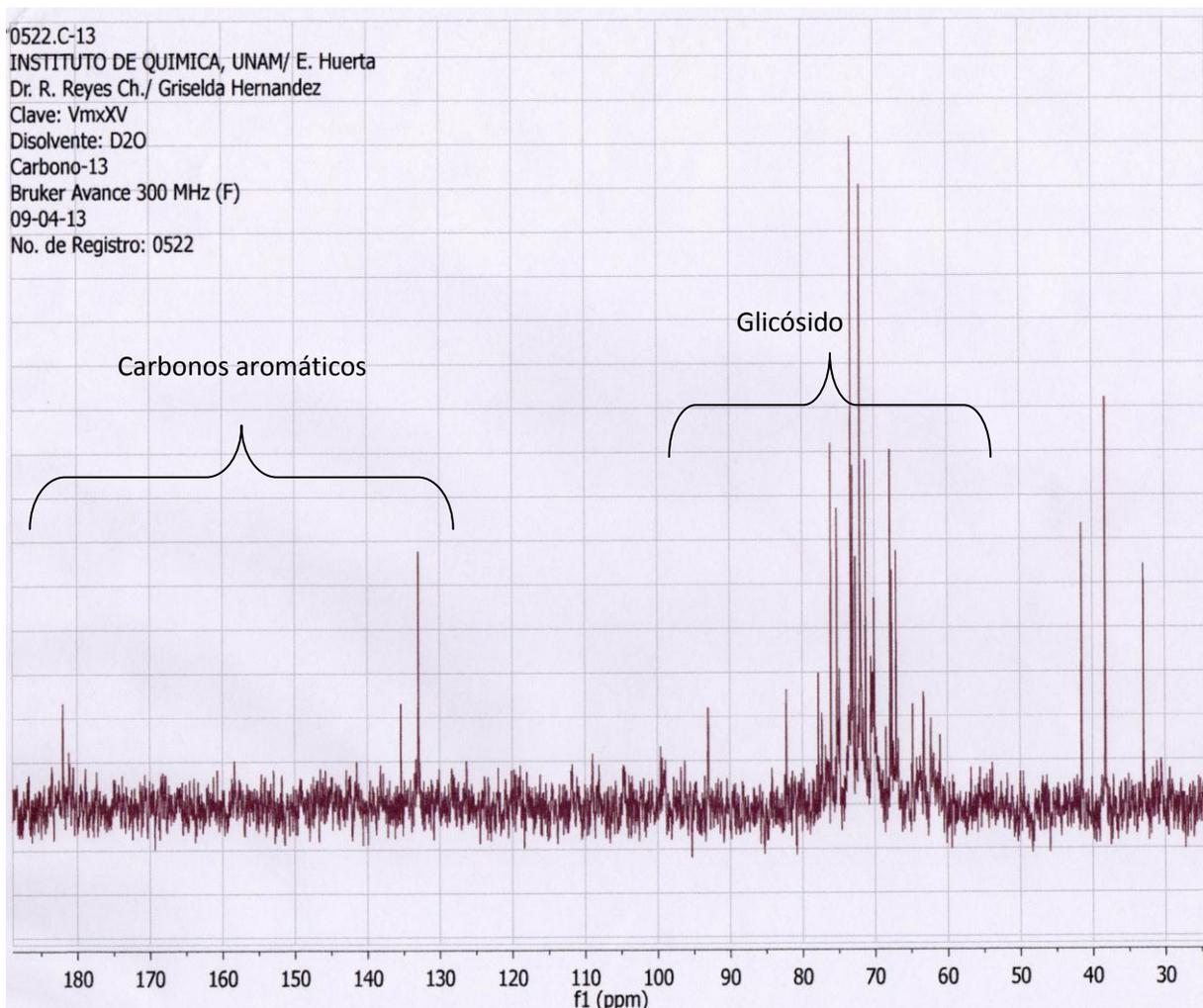
La fracción XV dio reacción positiva para FeCl₃ en CCF fase normal (Fig. 7), al analizarse por RMN¹H. (Fig. 25) se observaron principalmente señales para carbohidratos.

Fig. 25. Espectro de RMN¹H de fracción XV. D₂O, 300 MHz.



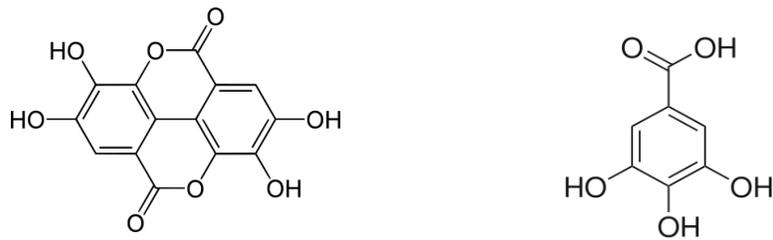
Esta fracción también se analizó por RMN¹³C pudiéndose apreciar que presenta señales para carbohidratos principalmente, así como para carbonos aromáticos o vinílicos (Fig. 26).

Fig. 26. Espectro de RMN¹³C de la fracción XV. D₂O, 300 MHz.



Las fracciones XI, XIII y XV de acuerdo a sus datos de RMN¹H y RMN¹³C contienen señales para carbohidratos y algunas señales en la región vinílica y aromática sugiriendo se tratan posiblemente de taninos hidrolizables con base en el ácido gálico o bien del ácido elágico (dímero del ácido gálico) (Fig. 27), donde los OH estarían substituídos con glucósidos (O-Glic).

Fig. 27. Ácido elágico (izq) y Ácido Gálico (der).



6.5- Actividad sobre la Transcriptasa Reversa del VIH-1

Se evaluó la posible inhibición de la Transcriptasa Reversa del VIH-1 de diversos extractos empleando la metodología previamente reportada (Cf. Anexo 1, Huerta-Reyes *et al*, 2004). Para el caso del extracto 5 (MeOH, hojas sanas de *Vismia mexicana*), tuvo un $IC_{50} = 9.62 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 28). El extracto 5 fue sometido a CC y se evaluó la actividad inhibitoria de la RT del VIH-1 de las fracciones. Las fracciones I a IX mostraron baja inhibición $< 40\%$ (Tabla 9) y no revelaron con FeCl_3 indicando que no contienen compuestos fenólicos. La fracción X si reveló con FeCl_3 (Fig. 7) y mostró 60% de inhibición (Tabla 9), por lo cual se probaron algunas subfracciones obtenidas por cromatografía en capa fina preparativa. La subfracción X3 esta compuesta por mezcla de flavonoides; entre los cuales se encuentran la astilbin y engeletin; solo mostró 12% de inhibición. La subfracción X4 compuesta por carbohidratos y flavonoides en cantidades traza inhibió en 22% la enzima (Tabla 9). Las fracciones de mayor actividad fueron la X5m, XI, XIII y XV, con 71, 75 y 78 % de inhibición, respectivamente (Tabla 9). Las fracciones XIV, XVI, y XVII no se probaron porque fueron insolubles en DMSO, mientras que las subfracciones X4m y X5 no fueron probadas al ser insuficiente la muestra. Para las fracciones con mayor actividad se realizó el cálculo de la IC_{50} . Las fracciones X, XI, XIII y XV (Fig. 29, 30, 31 y 32) mostraron una $IC_{50} = 9.77, 15.55, 14.2$ y $3.66 \mu\text{g/mL}$, respectivamente siendo la IC_{50} más baja la de la fracción XV con $3.66 \mu\text{g/mL}$. Como previamente se ha mencionado la fracción X contiene flavonoides glicosilados; mientras que las fracciones XI, XIII y XV podrían contener taninos hidrolizables (ácido elágico con glicósidos).

Tabla 9. Inhibición RT VIH-1 (50 µg/ml) de Fracciones del Extracto 5.

Muestras analizadas	% Inhibición
Extracto 5	84.17
Frac. I	25.95
Frac. II	30.84
Frac. III	13.42
Frac. IV	16.00
Frac. V	24.08
Frac. VI	11.70
Frac. VII	25.54
Frac. VIII	24.48
Frac. IX	40.75
Frac. X	60.80
Sub frac. X3. Flavonoides glicosilados (Figs. 8, 9, 11-14)	12.48
Sub frac. X4. Flavonoides glicosilados (Figs. 8, 9 y 16)	22.89
Sub frac. X4m. Taninos hidrolizables mas trazas de flavonoides glicosilados (Figs. 8, 9 y 17)	n.p.
Sub frac. X5. Taninos hidrolizables (Figs. 8, 9 y 18)	n.p.
Sub frac. X5m. Taninos hidrolizables (Figs. 8, 9 y 19)	64.58
Frac. XI Taninos hidrolizables (Figs. 7, 20-22)	71.27
Frac. XII	55.89
Frac. XIII Taninos hidrolizables (Figs. 7, 23 y 24)	75.92
Frac. XIV	No se disolvió
Frac. XV Taninos hidrolizables (Figs. 7, 25 y 26)	78.01
Frac. XVI	No se disolvió
Frac. XVII	No se disolvió

n.p. = no probado por ser insuficiente la muestra.

Fig. 28. Curva de concentración respuesta de la actividad inhibitoria de la RT del extracto 5 de *Vismia mexicana*. IC₅₀= 9.62 µg/mL.

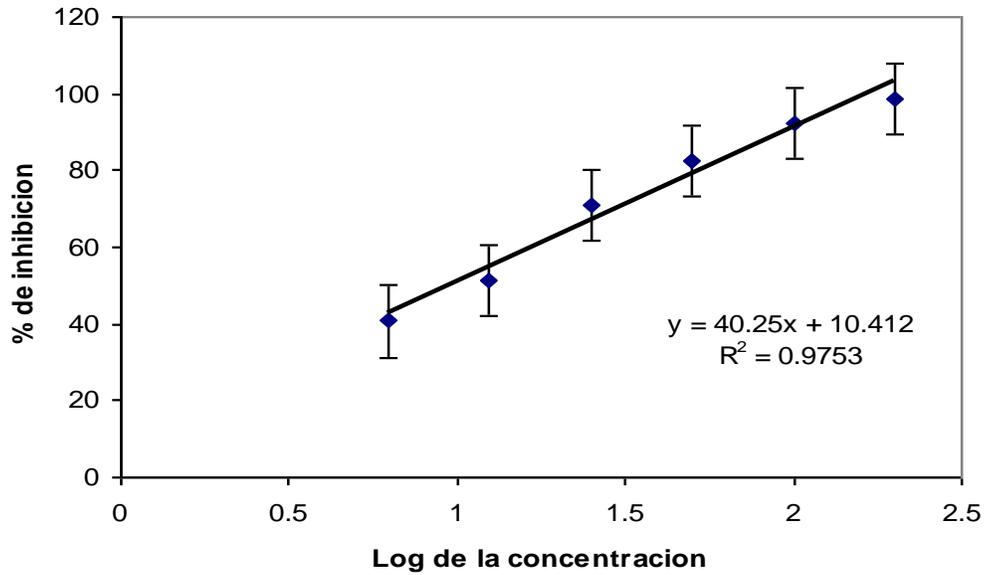


Fig. 29. Curva de concentración respuesta de la actividad inhibitoria de la RT de la Fracción X. IC₅₀= 9.77 µg/mL.

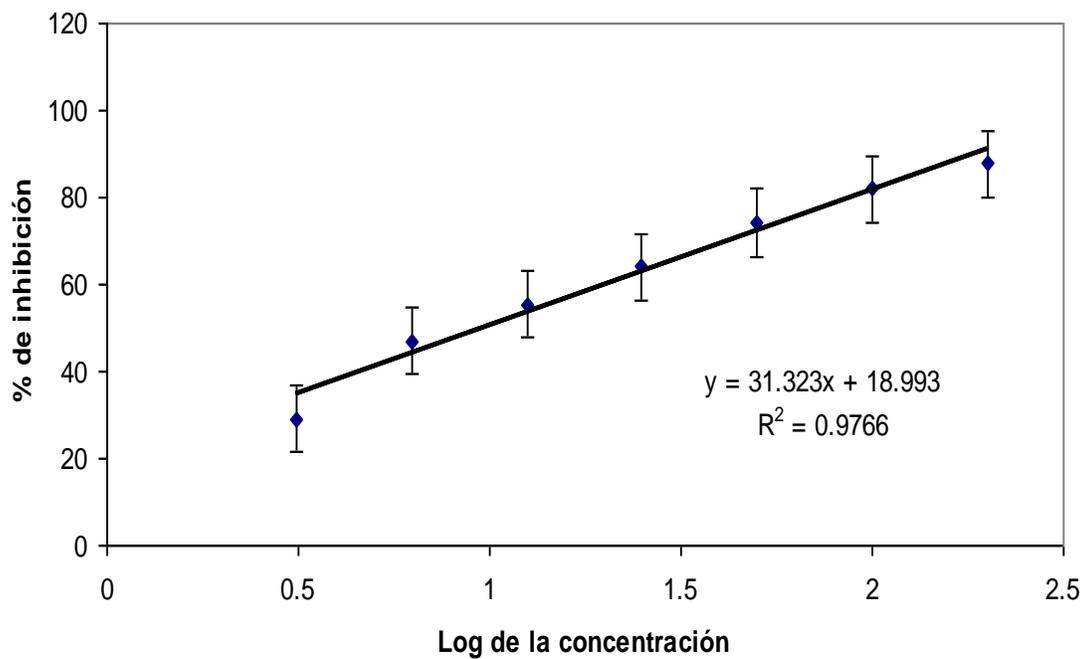


Fig. 30. Curva de concentración respuesta de la actividad inhibitoria de la RT de la Fracción XI. IC₅₀= 15.55 µg/mL.

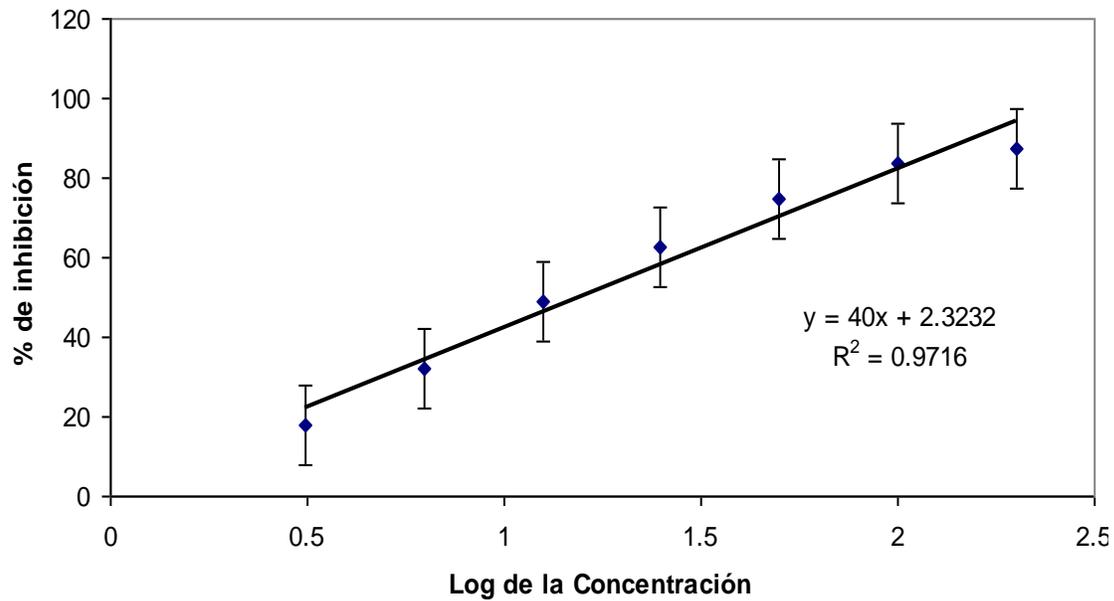


Fig. 31. Curva de concentración respuesta de la actividad inhibitoria de la RT de la Fracción XIII. IC₅₀= 14.2 µg/mL.

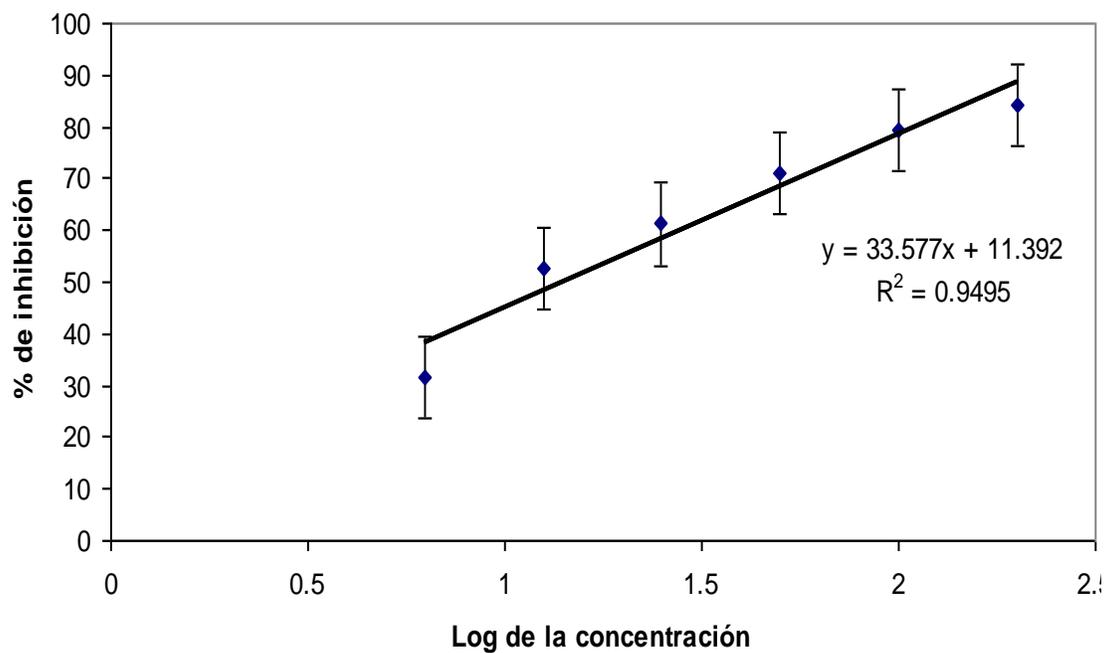
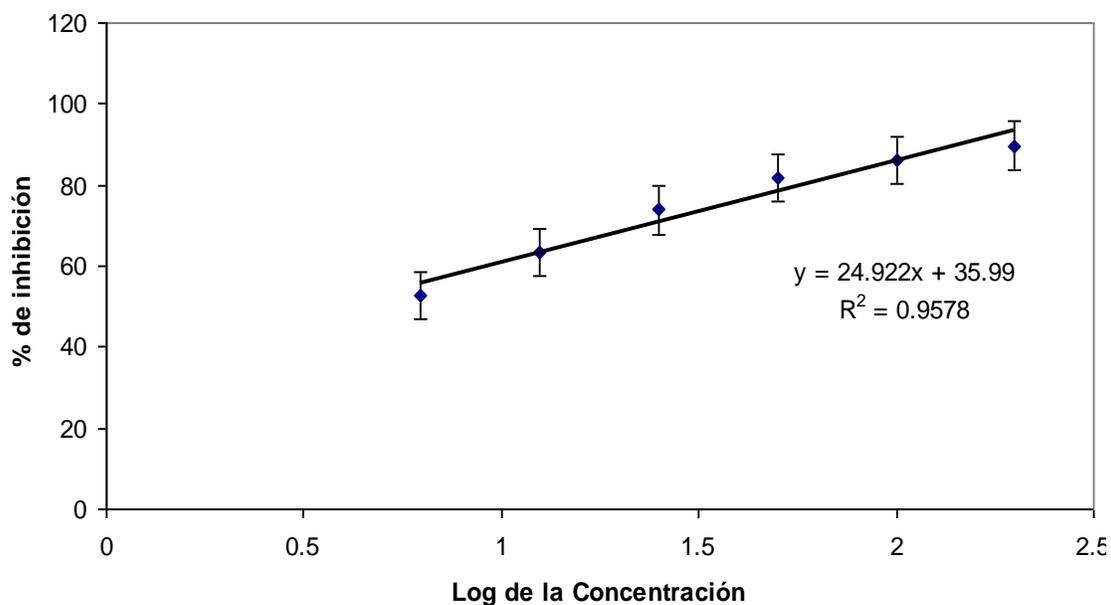
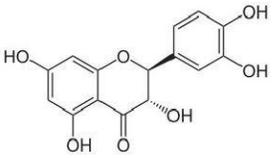
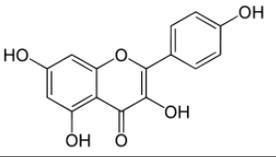
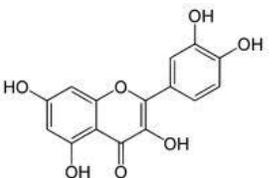
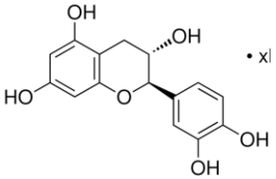
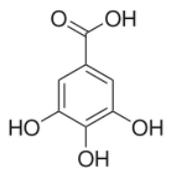
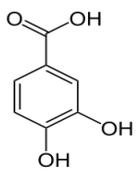


Fig. 32. Curva de concentración respuesta de la actividad inhibitoria de la RT de la Fracción XV. $IC_{50}= 3.66 \mu\text{g/mL}$.



También se examinó la actividad de cinco flavonoides adquiridos de manera comercial (Tabla 10), dos de ellos constituyen la aglicona de la estilbin (taxifolin) y engeletin (kaempferol). Se encontró que la catequina, el kaempferol y la quercetina ($50 \mu\text{g/ml}$) inhibieron 40, 49 y 55%, respectivamente. Además se probaron dos ácidos fenólicos el ácido gálico y el ácido protocatechuico teniendo el primero un 42% de inhibición mientras que el segundo solo 10% de inhibición. Para el caso del taxifolin no tuvo actividad inhibitoria de la RT del VIH-1.

Tabla 10. Inhibición de flavonoides y ácidos fenólicos sobre la RT VIH-1

Flavonoides	% de Inhibición (50 µg/ml)
Taxifolin hidratado	Sin Actividad
Taxifolin 	Sin Actividad
Kaempferol 	49.73
Quercetina 	55.37
(+)-Catequina 	40.16
Ácidos fenólicos	
Ácido gálico 	42.87
Ácido protocatechuico 	10.93

7- DISCUSION

Algunos autores han propuesto que una $IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$ de la RT-VIH-1 *in vitro* es considerada significativa para proseguir los estudios de aislamiento de los principios activos (El-Mekkawy *et al.*, 1995; Min *et al.*, 2001); por lo que se puede decir que el extracto metanolico (5) de *Vismia mexicana* es potente al inhibir (50 $\mu\text{g/ml}$) el 84% de la enzima de la RT- VIH-1 y obteniendo una $IC_{50} = 9.62 \mu\text{g/ml}$. Este valor es incluso superior al extracto metanólico de *Calophyllum brasiliense* que es un extracto potente al inhibir la enzima de la RT-VIH-1 en un 83% (50 $\mu\text{g/ml}$) y tener una $IC_{50} = 29.6 \mu\text{g/ml}$ (Huerta-Reyes *et al.*, 2004a).

Al fraccionar el extracto metanolico, se observó que las fracciones menos polares (I a la IX) inhiben la RT VIH-1 (50 $\mu\text{g/ml}$) en <40% y no revelan con FeCl_3 por lo que no contienen fenoles, mientras que las fracciones más polares (X, X5m, XI, XIII y XV) fueron las más activas (50 $\mu\text{g/ml}$) al presentar 60, 64, 71, 75 y 78% de inhibición de dicha enzima y dan reacción positiva para fenoles. La composición química de estas fracciones indica que contiene flavonoides glicosilados (X y X5m), así como posiblemente taninos hidrolizables (XI, XIII y XV) pudiendo ser estos los responsables de tal actividad, ya que los taninos presentan afinidad por las proteínas afectando el número de reacciones bioquímicas, por lo que se les considera como inhibidores selectivos (Au T. K. *et al.*, 2001).

Los extractos polares contienen taninos y otros polifenoles que inhiben la RT-VIH-1 (Tan G. *et al.*, 1991; Nishizawa M. *et al.*, 1989), ADN polimerasa (Nakane H. *et al.*, 1990), ADN topoisomerasas I y II (Kashiwada Y. *et al.*, 1993) así como a las células receptoras de VIH-1 gp120/CD4+ (Tan G. *et al.*, 1991; Collins R. A. *et al.*, 1997). En cuanto a los flavonoides glicosilados, se sabe que la astilbin y la engeletina han sido aislados de *Smilax corbularia*, una planta usada en el tratamiento tradicional del SIDA en Tailandia. Estos compuestos inhiben la integrasa del VIH-1 con valores de 30.2 y 75.7 $\mu\text{g/mL}$ (Itharat *et al.*, 2007).

8- CONCLUSIONES

El extracto metanolico (5) de *Vismia Mexicana* inhibió el 84% de la enzima de la Transcriptasa Reversa del VIH-1 y obtuvo una IC_{50} = 9.62 μ g/mL.

Al fraccionar dicho extracto, se observó que las fracciones más polares (X, X5m, XI, XIII y XV) fueron las más activas al presentar 60, 64, 71, 75 y 78% de inhibición de la RT del VIH-1. La composición química de estas fracciones indica que contienen flavonoides glicosilados (X y X5m), así como posiblemente taninos hidrolizables (XI, XIII y XV).

Con base en los resultados aquí obtenidos se puede decir que *Vismia mexicana* es una planta que puede ser útil en el tratamiento del VIH-1 al mostrar una potente actividad inhibitoria de la RT, tanto por parte del extracto como de sus fracciones mas polares; sin embargo es necesario seguir trabajando para identificar y purificar los compuestos activos presentes en las ultimas fracciones, (principalmente la XV al ser la más activa). Una vez concluida esta etapa dar el siguiente paso hacia la investigación clínica con pacientes VIH-1 positivos y posteriormente podría convertirse en un fitofármaco, es decir un extracto de una especie vegetal estandarizado química y farmacológicamente aprobado para los enfermos de VIH, o bien sintetizar los compuestos activos.

9- BIBLIOGRAFIA

- Adams M, Gmünder F, Hamburger M. 2007. "Plants traditionally used in age related brain disorders-A survey of ethnobotanical literature". *J Ethnopharmacol* 113: 363 - 381.
- Ahmed A. Hussein, Berena Bozzi, Mireya Correa, Todd L. Capson, Thomas A. Kursar, Phyllis D. Coley, Pablo N. Solis y Mahabir P. Gupta. 2003. "Bioactive constituents from three *Vismia* species". *J. Nat. Prod.* 66, 858-960
- Albuquerque U, Monteiro J, Ramos M, Cavalcanti E. 2007. "Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil". *J Ethnopharmacol* 110: 76 - 91.
- Álvarez E, Jiménez O, Posada C, Rojano B, Gil J, García C, Durango D. 2008. "Actividad Antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae)". *VITAE* (Medellín, Colombia). 15: 165 - 172.
- APG II. 2003. "An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants". *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141, 399-436.
- Au T. K., Lam T. L., Ng T. B., Fong W. P., Wan D. C. C., 2001. "A comparison of HIV-1 integrase inhibition by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbal". *Life Sci.*, 68,1687—1694.
- Berman PW, Nunes WM, Haffar OK. 1988. "Expression of membrane-associated and secreted variants of gp160 of human immunodeficiency virus type *in vitro* and in continuous cell lines". *J. Virol.* 62: 3135-3142.
- Bonte F, Meybeck, A. 1997. "Composición cosmética o farmacéutica, particularmente dermatológica que contiene un extracto de *Vismia*". *Oficina española de patentes y marcas*. N° 2102818. Madrid – España.
- Broussalis A, Ferraro G, Martino V, Pizon R, Coussion J, Alvarez J. 1999. "Argentine plants as potencial source of insecticide compounds". *J Ethnopharmacol* 67: 219 - 223.

- Butler MS. 2005. **"Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials"**. *Nat. Prod. Rep.* 22: 162-195.
- Camara D, Lemos V, Santos M, Nagem T, Cortes S. 2010. **"Mechanism of the vasodilator effect of Euxanthone in rat small mesenteric arteries"**. *Phytomedicine* 17: 690 - 692.
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, Weiss R. 1986. **"Human immunodeficiency viruses"**. *Science* 232 :697.
- Collins R. A., Ng T. B., Fong W. P., Wan C. C., Yeung H. W.,. 1997. **"A comparison of human immunodeficiency virus type 1 inhibition by partially purified aqueous extracts of Chinese medicinal herbs."** *Life Sci.*, 60, 345—351.
- Cos, P., L. Maes., D. Vanden Berghe., N. Hermans., L. Pieters y A. Vlietinck. 2004. **"Plant substances as anti-HIV agents selected according to their putative mechanism of action"**. *J. Nat. Prod.* 67: 284-293.
- Dalgleish AG, Beverly PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. 1984. **"The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus"**. *Nature* 312: 763-767.
- Davis Charles C., Webb Campbell O., Wurdack Kenneth J., Jaramillo Carlos A., Donoghue Michael J. 2005. **"Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-Cretaceous origin of modern tropical rain forest"**. *The American Naturalist*. Vol. 165, No. 3.
- Delle Monache F, Delle Monache G, Bettolo M, Lyra D, Lwande W, 1984. **"Two benzophenones with lavandulyl side Chain from Tovomita mangle G. mariz (Guttiferae)"**. *Gazz Chim Ital* 114: 55 – 60.
- El-Mekkawy S., Meselhy M. R., Kusumoto I. T., Kadota S., Hattori M., Namba T., 1995. *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 641—648.
- Esparza, J. 2005. **"The global VIH vaccine enterprise"**. *Int. Microb.* 8: 93-101
- Estévez Y, Castillo D, Pisango M, Arévalo J, Rojas R, Alban J, Deharo E, Bourdy G, Sauvain M. 2007. **"Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group"**. *J Ethnopharmacol* 114: 254 - 259.

- Evans LA, Levy JA. 1993. "The heterogeneity and pathogenicity of HIV". En Morrow WJW, Haigwood NL (Eds.) *HIV. Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment*. Elsevier. Holanda. pp. 29-74.
- Ewan J. 1962. "The South American Species of *Vismia* (Guttiferae)". *US Nat Muss Contribution from de National Herbarium* 35: 293 - 361.
- Fauci AS. 1996. "Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease". *Nature* 384: 529- 533.
- Ferrari F, Bettolo M, Maxfield P, Cerrini S, Fedeli W, Gavuzzo E, Vaciago A. 1979. "Vismiones from *Vismia baccifera* var. *dealbata*". *Gazz Chim Ital* 109: 301 – 310.
- Freed EO, Martin MA. 2001. "HIVs and Their Replication". En Knipe DM, Howley PM, (Comps.) *Fields Virology*. 4a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Filadelfia, EEUU. pp.1971-2041.
- Gustafsson Mats H. G., Bittrich Volker, Stevens Peter F. 2002. "Phylogeny of *Clusia* based on *rbdL* sequences". *Int. J. Plant Sci.* 163 (6):1045-1054.
- Goff SP. 2001. "Retroviridae: the Retroviruses and their replication". En Knipe DM, Howley PM *Fields Virology*. 4a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Filadelfia, PA. EEUU. pp. 1987-1939.
- Haiqiu Huang, Zhihang Cheng, Haiming Shi, Wenbo Xin, Thomas T. Y. Wang y Liangli (Lucy) Yu. 2011. "Isolation and characterization of two flavonoides leaves of *Engelhardia roxburghiana* and their potencial anti-inflammatory properties". *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 59, 4562-4569.
- Hirsch, M. S. y J. Curran. 1996. "Human Immunodeficiency Viruses". *Virology* (eds. B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley), Vol. Two. USA: Lippincott-Raven Publishers.
- Huerta-Reyes M., Basualdo M. C., Lozada L., Jiménez Estrada M., Soler C. y Reyes-Chilpa R. 2004a. "HIV-1 Inhibition by Extracts of Clusiaceae Species from Mexico". *Biol. Pharm. Bull.* 27(6) 916-920.
- Hupfeld J, Efferth T. 2009. "Drug resistance of human immunodeficiency virus and overcoming it by natural products". *In vivo* 23: 1-6.

- Hu WS, Temin HM. 1990. **"Retroviral recombination and reverse transcription"**. *Science* 250: 1227-1233.
- Itharat, A., Kejik, R., Tewtrakul, S., and Watanaperomskul, C. (2007). **Antioxidant and anti-HIV-integrase compounds from *Smilax corbularia* Kunth**. *Planta Medica*. 73, 559.
- Jassim, S.A. y M.A. Najj. 2003. **"Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective"**. *J. Appl. Microbiol.* 95: 412-27.
- Kashiwada Y., Nonaka G., Nishioka I., Lee K. J., Bori I., Fukushima Y., Bastow K. F., Lee K. H.,. 1993. **"Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II *in vitro*"**. *J. Pharm. Sci.*, 82, 487—492.
- Kashman Y, Gustafson KR, Fuller RW, Cardellina JHII, McMahon JB, Currens MJ, Buckheit RWJr, Hughes SH, Cragg GM, Boyd MR. 1992. **"The Calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivates from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*"**. *J. Med. Chem.* 35: 2735-2743.
- Katoh I, Yoshinaka Y, Rein A, Shibuya M, Odaka T, Oroszlan S. 1985. **"Murine leukemia virus maturation: protease region required for conversion from "immature" to "mature" core form and for virus infectivity"**. *Virology* 145: 280-292.
- Kearns DM, Berry PE, Stevens PF, Cuello NL, Pipoly JJIII, Robson NKB, Holst BK, Kubitzki K, Weitzman AL. 1998. Vol.4. **"Caesalpinaceae- Ericaceae"**. En Steyermark JA, Berry PE, Holst BK. *Flora of the Venezuelan Guayana*. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, MI, EEUU. 799 pp.
- Khan M, Ather A, Thompson K, Gambari R. 2005. **"Extracts and moléculas from medicinal plants against herpes simplex viruses"**. *Antiviral Res* 67: 107 - 119.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. 1984. **"T-lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV"**. *Nature* 312: 767-771.
- Kuete V, Ngueméving J, Beng V, Azebaze A, Etoa F, Meyer M, Bodo B, Nkengfack A. 2007. **"Antimicrobial activity of the methanolic extracts and**

- compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae)". *J Ethnopharmacol* 109: 372 - 379.
- Lizcano L, Bakkali F, Ruiz-Larrea M, Ruiz-Sanz J. 2010. "Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use". *Food Chem* 119: 1565 - 1570.
- Lopez A, Hudson J, Towers G. 2001. "Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants". *J Ethnopharmacol* 77: 189 - 196.
- Martínez y Pérez J.L., Castillo-Campos G. 2008. "Flora de Veracruz-Hypericaceae" Fascículo 148. Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Veracruz.
- Mélan H, Banzouzi J, Hocquette A, Pélissier Y, Koné M, Mallié M, Assi L, Valentin A. 2006. "Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in west african traditional medicine for the treatment of malaria". *J Ethnopharmacol* 105: 131 - 136.
- Min B. S., Kim Y. H., Tomiyama M., Nakamura N., Miyashiro H., Otake T., Hattori M., 2001. "Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities" *Phytother. Res.*, 15, 481—486.
- Monacelli B, Pasqua G, Cuteri A, Vitali A. 1999. "In Vitro plants regeneration of *Vismia guianensis* through organogenesis". *Plant Cell Tiss Organ Cult* 58: 81 - 85.
- Mullin S.M., C. M. Jamjian, S. L. Spruance. 2000. "Antiretroviral adverse effects and interactions: clinical recognition and management". *The medical management of AIDS*. (eds. M. A. Sande y P. A. Volderbing). USA: W.B. Saunders Company.
- Nakane H., Fukushima M., Ono K., (1990). *J. Nat. Prod.*, 53, 1234—1240.
- Nishizawa M., Yamagishi T., Dutschman G. E., Parker W. B., Bodner A. J., Kilkuskie R. E., Cheng Y. C., Lee K. H., (1989). *J. Nat. Prod.*, 52, 762—768.
- Peres A. 1978. "Plantas útiles de Colombia". 4th ed. Litografía Arco. Bogota, Colombia.
- Peres V, Nagem T. 1997. "Trioxxygenated naturally occurring xanthones". *Phytochemistry* 44: 191 - 214.

- Pullen KA, Champoux JJ. 1990. "Plus-strand origin for human immunodeficiency virus type 1: implications for integration". *J. Virol.* 64: 6274-6277.
- Reyes-Chilpa y M. Huerta-Reyes M. 2009. "Compuestos Naturales de Plantas de la Familia Clusiaceae. Inhibidores del Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1". *Interciencia* (Venezuela) 34(6):385-392.
- Robson Norman K. B., Robert E. Woodson Jr., Robert W. Schery. 1978. "Flora de Panama. Part VI. Family 123^a. Hypericaceae". *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 65, No. 1. pp. 9-26.
- Rodríguez Jiménez Concepción. 1996. "Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes-Guttiferae". Fascículo 45. Instituto de Ecología, A..C. CONABIO
- Ruysschaert S, Andel T, Van de Putte K, Van Damme P. 2009. "Bathe the baby to make it Strong and healthy: Plant use and child care among saramaccan maroons in Suriname". *J Ethnopharmacol* 121: 148 - 170.
- Salas F, Velasco J, Rojas, J, Morales A.; 2006. "Antibacterial activity of the crude extract and constituents of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) Collected in Venezuela". *Nat Prod Comm* 2: 185 - 188.
- Salas F, Ciangherotti C, Salazar-Bookaman M, Rojas J, Morales A. 2007. "Toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso de hojas de *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) en animales de experimentación". *Rev Fac Farm Univ de los Andes* (Mérida, Venezuela). 49: 5 - 9.
- Salas F, Rojas J, Morales A, Ramos-Nino M. 2008. "In vitro Cytotoxic Activity of Sesamin Isolated from *Vismia baccifera* var. *dealbata* Triana & Planch (Guttiferae) Collected from Venezuela". *Nat Prod Comm* 3: 1705 - 1708.
- Sanz-Biset J, Campo de la Cruz J, Epiquien M, Cañigüeral S. 2009. "A First Surrey on the medicinal Plants of the chazuta valley (Peruvian –Amazonan)". *J Ethnopharmacol* 122: 333 - 362.
- Sarawak. 2008. www.aidsmeds.com/drugs/calanolide-A.htm. Sarawak MediChem Pharmaceuticals Inc. Lemont, IL, EEUU. (Cons. 23/05/2008).

- Schultes R. 1993. **"Plants in treating senile dementia in the northwest Amazon"**. *J Ethnopharmacol* 38: 139 - 135.
- Sierra, S., B. Kupfer., R. Kaiser. 2005. **"Basics of the virology of HIV-1 and its replication"**. *J. Clin. Virol.* 34: 233-244.
- Simmonds M, Blaney W, Delle Monache M, Mac-quae M, Bettolo M. 1985. **"Insect antifeedant propiertis of anthanoids from the genus *Vismia*"**. *J Chem Ecol* 11: 1593.
- Singh IP, Bharate S, Bhutani KK. 2005. **"Anti-HIV natural products"**. *Curr. Sci.* 89: 269-290.
- Suffredini I, Paciencia M, Varela A, Younes R. 2007. **"*In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung colon and CNS solid cancers and leukemia"**. *Fitoterapia* 78: 223 - 226.
- Tan G. T., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D., Hughes S. H.,. 1991. **"Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase."** *J. Nat. Prod.*, 54, 143—154.
- Tokuoka Toru, Tobe Hiroshi. 2006. **"Phylogenetic analyces of Malpighiales using plastid and nuclear DNA sequences, with particular reference to the embryology of Euphorbiaceae sens. str."**. *J. Plant Res.* 119:299-616.
- Valadeau C, Pabón A, Deharo E, Albán J, Estévez Y, Lores F, Rojas R, Gamboa D, Sauvain M, Castillo D, Bourdy G. 2009. **"Medicinal Plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts"**. *J Ethnopharmacol* 123: 413 - 422.
- Valadeau C, Castillo J, Sauvain M, Lores A, Bourdy G. 2010. **"The rainbow hurts my skin: Medicinal Concepts and plants uses among the Yanasha (Amuesha), and Amazonian Peruvian ethnic group"**. *J Ethnopharmacol* 127: 175 - 192.
- Valencia Ortiz Ciria. 1995. **"Fundamentos de Fitoquímica"**. Primera Edicion. Editorial Trillas S. A. de C. V. México D.F
- Vizcaya Marieta, Morales Antonio, Rojas Janne, Núñez Richard. 2012. **"Revisión bibliografica sobre la composición química y actividad farmacológicas del"**

genero Vismia (Guttiferae)". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*. 11 (1): 12 -34.

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

Weiss, R.A. 2000. **"Getting to know HIV"**. *Trop. Med. Int. Health*. 5: 10-15.

Zacaria H, Apers S, Moshi M, Kapingu M, Van Miert S, Claeys M, Brun R, Cos P, Pieters L, Vlietinck A. 2004. **"Anthranoids compounds with antiprotozoal activity from *Vismia orientalis*"**. *Planta Medica* 70: 706 - 710.

10- ANEXO

Lenti RT Activity Assay, Cavid Tech. Determinación de la actividad sobre la enzima reversa transcriptasa (RT)

Para la determinación de dicha actividad se empleó el ensayo de actividad Lenti-RT. Dicho ensayo es un método colorimétrico no radiactivo y se ha empleado para la búsqueda de compuestos inhibidores de la RT VIH-1. Este método consiste en determinar la incorporación de bromo-desoxiuridina (BrdUTP) a un molde de poliadenina (poli A) inmovilizado en microplacas de 96 pozos. La BrdUTP es reconocida posteriormente por un anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina. La adición del reactivo paranitrofenilfosfato ocasiona que la fosfatasa alcalina hidrolize el grupo fosfato a paranitrofenil. Esta reacción es colorida y puede registrarse en un Lector de ELISA a 405 nm.

Para la evaluación de la actividad sobre la RT se realizaron dos ensayos, las sustancias se probaron a tres concentraciones molares (2.5, 25.0 y 250 μ M.) cuando se desconocía el peso molecular se emplearon las concentraciones: 1.11, 11.5, 111.5 μ g/ml, como disolvente se empleó DMSO a una concentración máxima de L 10% v/v. Como control positivo se usó nevirapine, inhibidor de la RT, bajo las mismas concentraciones de molaridad.

Para determinar las condiciones bajo las cuales la actividad de la RT eran optimas, se realizaron ensayos de prueba en los cuales se varió la temperatura y se observó que a temperatura ambiente (28 °C) la reacción procedía lentamente, mientras que a 33 °C es más rápida, alcanzando valores de absorbancia máximos de 2.5 a las 4 horas de haber agregado el paranitrofenil fosfato, no así a temperaturas inferiores. Por lo que se decidió que la temperatura optima era 33 °C. Cabe señalar que aún variando la temperatura el control de nevirapine siempre inhibió la actividad de la RT en función de la dosis. Lo anterior fue un dato que permito determinar que la enzima se encontraba en optimas condiciones.

A continuación se describe brevemente en que consistió el protocolo para determinar actividad sobre la RT de los metabolitos de *V. mexicana*

Este kit consiste de varios elementos:

2 Placas de Poli A

1 Frasco con: amortiguador de dilución (B)

2 Frasco con: componentes de reacción de la RT (C1)

1 Frasco con: amortiguador de reconstitución (C2)

1 Frasco con: Rtr-VIH estándar

2 Frasco con: amortiguador de lavado concentrado (E)

2 Frasco con: Anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (O)

1 Frasco con: tabletas del substrato de la FA (P1)

1 Frasco con: amortiguador del substrato de la FA (P2)

Piezas de plástico adhesivo.

Dilución del amortiguador de dilución.

- Adicionar 30 ml del frasco B en un vaso de precipitado y adicionar 30 ml de agua destilada.

Dilución de las sustancias.

- Las sustancias se evaluaron en 3 concentraciones molares (2.5, 25.0 y 250 μ M.) cuando se desconocía el peso molecular se emplearon las concentraciones 1.11, 11.1, y 111.5 μ g/ml. Cada sustancia se evaluó por triplicado y se realizó un segundo ensayo solo en aquellas sustancias que mostraron algún grado de actividad sobre la RT (>50 %) para obtener la IC₅₀, para ello se tomaron 5 concentraciones dentro del rango de 3.125 a 200 μ g/ml con incrementos de 0.3 en base logarítmica con tres replicas cada uno.
 - Adicionar 135 μ l de la solución diluida B en cada pozo de las dos placas de preparación de muestras (cada placa contiene 96 pozos).
 - Adicionar 15 μ l de la sustancia por analizar en el pozo A1.

- Adicionar 15 μ l de la segunda sustancia por ser analizada en el pozo A2 y así continuar con las demás sustancias hasta completar A12.
- Transferir 15 μ l desde los pozos A1-A12 a los correspondientes pozos de la fila B.
- Transferir 15 μ l desde los pozos B1-B12 a los correspondientes pozos de la fila C y así continuar hasta la fila G (Esto se realiza en ambas placas).
- La fila H se usa para referencias y controles.
- Preparación de la mezcla de reacción.
 - Adicionar 2 ml de amortiguador de reconstitución (C2) al frasco que contiene los componentes de reacción de la TR (C1).
- Preparación de las placas de poli A con las muestras.
 - Tomar las dos placas y adicionar 100 μ l de la mezcla de reacción que se preparó en el 3er. punto.
 - Transferir 50 μ l de cada pozo de las placas de preparación de muestras.
 - Cubrir las placas con el plástico adhesivo e incubar por 30 minutos a 33 °C.
- Dilución de la rTR-VIH estándar (D).
 - Adicionar 1.5 ml del amortiguador de dilución preparado en el punto 1 al frasco que contiene el liofilizado la rTR-VIH estándar (D) mezclar vigorosamente.
 - Tomar un vaso de precipitado y etiquetarlo con el número 2, adicionar 12 ml del amortiguador de dilución preparado en el punto 1 y verter 1 ml de la rTR-VIH estándar diluida, mezclar vigorosamente.
- Inicio de la reacción de la TR.
 - Tomar las placas de poli A de la incubadora y adicionar 50 μ l de la enzima estándar en todos los pozos excepto H8-H12.
 - Adicionar 50 μ l del amortiguador de dilución en los pozos de H8-H12.
 - Sellar las placas con el plástico adhesivo e incubar durante 3 hrs. a 33 °C con agitación constante.
- Preparación de la solución de lavado.

- Adicionar 150 μ l de tritón X-100 en un litro de agua destilada y agitar por 10 minutos.
- Tomar del Kit el amortiguador de lavado concentrado (E) y adicionar 50 ml a un contenedor de 20 litros.
- Adicionar el tritón X-100 disuelto al contenedor y ajustar el volumen a 20 litros con agua destilada y mezclar vigorosamente.
- Fin de la reacción de TR.
 - Tomar las placas de poli A de la incubadora y lavarlas 4 veces. Eliminar el exceso de agua colocándolas hacia abajo sobre un papel absorbente.
- Reconstitución del anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina.
 - Tomar los dos frascos de que contienen el anticuerpo (O) y adicionar 12 ml de agua destilada conteniendo 1 % v/v de tritón X-100 a cada una, mezclar vigorosamente en un vortex durante 10 a 15 minutos.
 - Tomar las placas recién lavadas y adicionar 100 μ l a cada pozo de ambas placas de poli A, posteriormente cubrirlas con el plástico adhesivo e incubarlas durante 90 minutos a 33 °C y con agitación constante.
- Preparación del sustrato de la fosfatasa alcalina (FA).
 - Adicionar las tabletas de FA (P1) al amortiguador (P2) agitar aproximadamente por 20 minutos, mantener en oscuridad y a temperatura ambiente.
- Eliminar el exceso de anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina.
 - Después de 90 minutos de incubación remover de las placas de poli A los excesos de anticuerpo lavando 20 veces. Eliminar el exceso de agua colocándolas hacia abajo sobre un papel absorbente.
- Inicio de la reacción de la fosfatasa alcalina.
 - Adicionar 200 μ l de la sustancia preparada en el punto 10 a cada uno de los pozos de ambas placas de poli A.
- Cubrir las placas con el plástico adhesivo e incubar a temperatura ambiente y en oscuridad y con agitación constante.

Lectura de las placas (Para tal fin emplear un lector de placas).

- Leer la absorbancia de ambas placas después de 30 minutos de incubación. Repetir la lectura en intervalos de tiempo hasta que la lectura de los pozos H1-H7 den valores de aproximadamente el 75 % del valor máximo de actividad.
- Procesar datos.