



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

“Aislamiento y caracterización de bioactivos provenientes de la semilla de *Byrsonima crassifolia* responsables de reducir algunas de las sintomatologías diabéticas”.

Tesis que presenta:

ALETHIA MUÑOZ RAMÍREZ

Para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD
DE BIOTECNOLOGÍA**

Directores de tesis

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

Dra. Rosa Martha Pérez Gutiérrez

MÉXICO, D.F.

Diciembre, 2013.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A Dios, por darme la fortaleza y constancia para llegar a cumplir este sueño, gracias por estar con migo y acompañarme en cada momento de mi vida.

Al Dr. Luis Bernardo Flores Coterá, por el apoyo y el tiempo que me dedico para que este trabajo culminara exitosamente, muchas gracias por sus consejos, y amistad.

A la Dra. Rosa Martha Pérez Gutiérrez, mi profundo agradecimiento y cariño por haberme guiado durante la realización de este trabajo, por compartirme sus conocimientos, por brindarme su amistad y apoyo, gracias por confiar en mí y por ayudarme a cumplir esta meta, siempre la llevare en mi corazón gracias.

Al Dr. Ricardo Aguilar, Dr. Rodolfo Marsch, Dr. Frédéric Thalasso, y al Dr. Efrén García por sus observaciones, las cuales contribuyeron al mejoramiento del trabajo realizado.

A Fer Maldonado, gracias por tu apoyo y por tu amistad, te quiero Willis.

A mi mamá, gracias por estar siempre con migo incondicionalmente, te quiero con todo mi corazón y gracias por acompañarme y apoyarme en el camino hacia esta meta.

A Abraham, por su apoyo incondicional y sus palabras de aliento en los momentos difíciles.

Pero sobre todo gracias Dios, por poner en mi camino a estas personas tan maravillosas, las cuales contribuyeron en mi formación personal y profesional, siempre las llevaré con migo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal por el apoyo otorgado.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 7 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 9 |
| RESUMEN..... | 11 |
| ABSTRACT..... | 12 |
| II. ANTECEDENTES..... | 13 |
| II.1. Diabetes mellitus..... | 13 |
| II.2. Prevalencia de diabetes en el mundo..... | 13 |
| II.3. Diagnóstico..... | 16 |
| II.4. Clasificación de la diabetes mellitus..... | 16 |
| II.4.1. Diabetes mellitus tipo 1..... | 17 |
| II.4.2. Diabetes mellitus tipo 2..... | 17 |
| II.5. Algunas complicaciones de la diabetes mellitus..... | 18 |
| 11.5.1. Glicación no enzimática de proteínas..... | 18 |
| 11.5.2. Lesiones tisulares..... | 21 |
| 11.5.3. Inflamación..... | 22 |
| II.6. Hipoglucemiantes orales..... | 24 |
| II.6.1. Sulfonilureas..... | 24 |
| II.6.2. Reacciones adversas..... | 25 |
| II.7. Plantas medicinales..... | 26 |
| II.8. <i>Byrsonima crassifolia</i> | 31 |
| II.8.1. Descripción taxonómica..... | 31 |
| II.8.2. Descripción botánica..... | 32 |
| II.8.3. Usos populares..... | 33 |

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| II.8.4. Estudios realizados..... | 34 |
| II.9. Diabetes experimental..... | 35 |
| II.9.1. Estreptozotocina | 35 |
| III.JUSTIFICACIÓN..... | 36 |
| IV. OBJETIVO GENERAL..... | 37 |
| IV.1. Objetivos específicos..... | 37 |
| V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... | 38 |
| VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL..... | 39 |
| VII. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 40 |
| VII.1. Preparación de la materia prima | 40 |
| VII.2. Preparación de los extractos | 40 |
| VII.3. Animales de experimentación | 40 |
| VII.3.2. Inducción experimental de la diabetes..... | 41 |
| VII.4. Pruebas anti-inflamatorias..... | 41 |
| VII.4.1. Edema inducido en la oreja por TPA | 42 |
| VII.4.2 Edema inducido con formaldehído, carragenina e histamina en pata de rata..... | 43 |
| VII.4.3. Edema inducido por bolitas de algodón..... | 43 |
| VII.4.4. Efecto de la L-arginina y D-arginina en la acción antiinflamatoria de NSH, diclofenaco y L-NAME..... | 44 |
| VII.5. Determinación de la actividad cicatrizante | 45 |
| VII.5.1. Creación de la herida por escisión..... | 45 |
| VII.5.2. Análisis bioquímicos de las heridas por escisión | 45 |
| VII.5.3. Estimación de las actividades antioxidantes..... | 46 |
| VII.5.4. Creación de la herida por incisión..... | 46 |
| VII.5.5. Medición de la resistencia a la tensión | 47 |

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| VII.6. Actividad antimicrobiana..... | 47 |
| VII.7. Determinación de la actividad hipoglucemiante | 48 |
| VII.8. Prueba de inhibición de la glicación no enzimática de proteínas <i>in vitro</i> (AGEs)..... | 48 |
| VII.8.1. Determinación de la actividad Amadorin..... | 48 |
| VII.8.2. Prueba del Metilglioxal-BSA | 49 |
| VII.9. Purificación mediante biofraccionamiento | 49 |
| VII.9.1. Columnas cromatográficas | 49 |
| VII.9.2. Búsqueda de eluyentes para realizar el biofraccionamiento..... | 50 |
| VII.9.3. Obtención de las fracciones mediante biofraccionamiento | 50 |
| VII.10. Análisis por electroforesis capilar de tres especies de <i>Byrsonima</i> | 51 |
| VII.11. Determinación del contenido total de fenoles..... | 52 |
| VIII. Análisis instrumentales..... | 52 |
| VIII.1. Espectroscopia por Infra Rojo..... | 52 |
| VIII.3. Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C | 52 |
| VIII.4. Espectrometría de masas | 52 |
| VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 53 |
| VIII.1. Electroforesis capilar | 53 |
| VIII.2. Fenoles totales | 55 |
| VIII.3. Efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas, del extracto de hexano de diferentes especies de nanche | 56 |
| VIII.4. Actividad antiinflamatoria del extracto de hexano de <i>Byrsonima crassifolia</i> 60 | |
| VIII.4.1. Edema inducido con formaldehído..... | 60 |
| VIII.4.2. Efecto del extracto de hexano de las semillas (NSH) de <i>B. crassifolia</i> en la inflamación inducida con carragenina | 62 |
| VIII.4.3. Edema inducido en pata de rata con histamina | 63 |

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| VIII.4.4. Efecto del extracto de hexano de la semilla de <i>B. crassifolia</i> en el edema inducido con tetradecanoilforbol (TPA) | 65 |
| VIII.4.5. Efecto antiinflamatorio de <i>B. crassifolia</i> (NSH) en la fase proliferativa de la inflamación en ratas | 66 |
| VIII.4.6. Efecto de la L-arginina y D-arginina en la acción antiinflamatoria de NSH, diclofenaco y L-NAME | 68 |
| VIII.5. Biofraccionamiento y purificación del compuesto responsable de la actividad antiinflamatoria | 71 |
| VIII.5.1. Biofraccionamiento de la subfracción NSH1 | 72 |
| VIII.5.2. Biofraccionamiento de la fracción NSH11..... | 72 |
| VIII.5.3. Biofraccionamiento de la fracción NSH111..... | 72 |
| VIII.5.4. Biofraccionamiento de la fracción NSH1114..... | 72 |
| VIII.5.5. Biofraccionamiento de la fracción NSH11142..... | 73 |
| VIII.5.6. Biofraccionamiento de la fracción NSH111423..... | 73 |
| VIII.6. Elucidación estructural del compuesto 1 (birsonimadiol) con actividad antiinflamatoria | 76 |
| VIII.6.1. Actividad antiinflamatoria del compuesto 1, aislado de las semillas de <i>B. crassifolia</i> | 80 |
| VIII.7. Actividad cicatrizante del extracto de hexano de <i>B. crassifolia</i> | 81 |
| VIII.7.1. Efecto del extracto de hexano de la semilla de <i>B. crassifolia</i> en la herida por escisión..... | 82 |
| VIII.7.2. Efecto del extracto de hexano de <i>B. crassifolia</i> en la herida por incisión | 84 |
| VIII.7.3. Análisis bioquímicos de las heridas por escisión | 85 |
| VIII.7.4. Estimación de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y catalasa)..... | 86 |

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| VIII.8. Aislamiento y purificación de las fracciones con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs | 88 |
| VIII.8.1. Biofraccionamiento y purificación de los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante y anti-AGEs | 88 |
| VIII.8.2. Biofraccionamiento de la subfracción NSH1 | 88 |
| VIII.8.3. Biofraccionamiento de la subfracción NSH11 | 89 |
| VIII.8.4. Biofraccionamiento de la subfracción NSH111 | 89 |
| VIII.8.5. Biofraccionamiento de la subfracción NSH1113 | 89 |
| VIII.8.6. Biofraccionamiento de la subfracción NSH11131 | 89 |
| VIII.8.7. Biofraccionamiento de la fracción NSH111312 | 90 |
| VIII.8.8. Biofraccionamiento de la fracción NSH1113123 | 90 |
| VIII.9. Elucidación estructural de los compuestos 2 y 3 (birsonina A y birsonina B) con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs | 93 |
| VIII.9.1. Actividad hipoglucemiante y anti-AGEs de birsonina A y B | 97 |
| VIII.10. Aislamiento y purificación de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana | 101 |
| VIII.10.1. Biofraccionamiento de la subfracción NSH3 | 101 |
| VIII.10.2. Biofraccionamiento de la subfracción NSH34 | 102 |
| VIII.10.3. Biofraccionamiento de la subfracción NSH341 | 102 |
| VIII.10.4. Biofraccionamiento de la subfracción NSH3411 | 102 |
| VIII.11. Elucidación estructural del compuesto 4 con actividad antimicrobiana ... | 105 |
| VIII.12. Actividad antimicrobiana del compuesto 4 aislado de <i>B. crassifolia</i> | 108 |
| CONCLUSIONES | 109 |
| BIBLIOGRAFÍA | 111 |
| ANEXO A. Publicaciones | 119 |

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| A. 1. Anti-inflammatory Activity of the Hexane Extract of <i>Byrsonima crassifolia</i> Seeds in Experimental Animal Models. | 119 |
| A.2. Byrsonima: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. | 131 |
| A.3. Wound healing effect and flavonoid contents of three selected <i>Byrsonima</i> species..... | 144 |
| ANEXO B. Artículo en prensa..... | 162 |
| B.1. Antimicrobial activities of diterpene labdane from seeds of <i>Byrsonima crassifolia</i> | 162 |
| ANEXO C. Espectros de birsonina A..... | 175 |
| ANEXO D. Espectros de birsonina B..... | 192 |
| ANEXO E. Espectros de birsonimadiol..... | 208 |
| E. 1. Fragmentación sugerida para birsonimadiol..... | 225 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Prevalencia de diabetes en diferentes regiones del mundo. | 14 |
| Tabla 2. Diferencias entre diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2. | 16 |
| Tabla 3. Características farmacocinéticas de las sulfonilureas. | 25 |
| Tabla 4. Alcaloides y compuestos nitrogenados. | 27 |
| Tabla 5. Flavonoides (continúa). | 27 |
| Tabla 6. Monoterpenoides, diterpenoides y sesquiterpenoides (continúa)..... | 28 |
| Tabla 7. Fenoles, ligninas, neoligninas y taninos. | 29 |
| Tabla 8. Triterpenos. | 30 |
| Tabla 9. Modelos de inflamación utilizados para evaluar la actividad anti-inflamatoria de <i>B. crassifolia</i> | 42 |
| Tabla 10. Concentración de fenoles totales (FT) de tres especies diferentes de <i>Byrsonima</i> | 55 |
| Tabla 11. Efecto en los niveles de glucosa en sangre de los extractos de hexano de diferentes variedades de <i>Byrsonima</i> | 57 |
| Tabla 12. Efecto del extracto de hexano de la fruta y la semilla de tres especies de <i>Byrsonima</i> en la cicatrización de heridas en ratas tópicamente tratadas durante 14 días. | 58 |
| Tabla 13. Efecto del extracto de hexano de la semilla en el edema inducido con formaldehído en pata de rata. | 60 |
| Tabla 14. Efecto del extracto de hexano de las semillas de <i>B. crassifolia</i> en la inflamación inducida con carragenina. | 62 |
| Tabla 15. Efecto antiinflamatorio del extracto de hexano de las semillas de <i>B. crassifolia</i> en edema inducido en pata de rata con histamina. | 64 |
| Tabla 16. Efecto del extracto de hexano de la semilla de <i>B. crassifolia</i> en el edema inducido en oreja, utilizando tetradecanoilforbol (TPA). | 65 |
| Tabla 17. Efecto del NSH en la fase proliferativa de la inflamación en ratas, usando la prueba de bolitas de algodón. | 67 |
| Tabla 18. Efecto del compuesto 1 en el edema inducido con tetradecanoilforbol (TPA) en oreja. | 81 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 19. Efecto de la aplicación tópica del extracto de hexano de las semillas de <i>B. crassifolia</i> (NSH) en la cicatrización de heridas en ratas durante un periodo de 16 días. | 82 |
| Tabla 20. Efecto del extracto de hexano de las semillas de <i>B. crassifolia</i> (NSH) en las heridas hechas por incisión. | 84 |
| Tabla 21. Contenido de colágeno (hydroxyprolina), proteína total, ácido urónico y hexosamina en la granulación de los tejidos. | 86 |
| Tabla 22. Efecto del tratamiento tópico con NSH en el contenido de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) | 87 |
| Tabla 23. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 2 con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs. | 93 |
| Tabla 24. Efecto de birsonina A y B en los niveles de glucosa sanguínea en ratones con diabetes tipo 1 y tipo 2 (continúa). | 98 |
| Tabla 25. Efecto inhibitorio de birsonina A y B, y de la aminoguanidina en la formación de los productos finales de glicación avanzada (AGEs) <i>in vitro</i> inducidos por glucosa, metilglioxal y ribosa. | 100 |
| Tabla 26. Actividad antimicrobiana del compuesto 4 obtenido de las semillas de <i>Byrsonima crassifolia</i> | 108 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fallecimientos atribuibles a la diabetes por edad (20-79 años). | 15 |
| Figura 2. Esquema de la formación de glucosilación avanzada (AGEs) | 19 |
| Figura 3. Inhibición de la formación de AGEs mediante aminoguanidina. | 20 |
| Figura 4. Fruto de <i>Byrsonima crassifolia</i> | 32 |
| Figura 5. Cromatografía en placa fina. | 50 |
| Figura 6. Ejemplificación de la obtención de las fracciones mediante biofraccionamiento. | 51 |
| Figura 7. Análisis mediante electroforesis capilar; los flavonoides se registraron a 214 nm. Epigalacatequina (Tr = 7,16 ± 0,15 min), kaempferol (Tr = 12,32 ± 0,64 min), apigenina (Tr = 11,37 ± 0.52 min). | 54 |
| Figura 8. Efecto del extracto de hexano de la fruta y la semilla de tres especies de <i>Byrsonima</i> en la cicatrización de heridas en ratas tópicamente tratadas. | 59 |
| Figura 9. Mecanismo de acción propuesto del extracto de hexano de la semilla (NSH) de <i>B. crassifolia</i> en el proceso inflamatorio. | 61 |
| Figura 10. Actividad antiinflamatoria del diclofenaco en edema en pata de rata inducido con carragenina. | 68 |
| Figura 11. Efecto antiinflamatorio de L-NAME en edema en pata de rata inducido con carragenina. | 69 |
| Figura 12 (a) y (b). Efecto de NSH y L-NAME sobre la L-arginina en la inflamación inducida con carragenina. | 71 |
| Figura 13. Diagrama del aislamiento y purificación de las subfracciones con actividad antiinflamatoria (continúa). | 74 |
| Figura 14. Compuesto 1 y sus correlaciones observadas en el experimento HMBC (H-C). | 78 |
| Figura 15 . Efecto de la aplicación tópica del (NSH) en heridas hechas por escisión durante un periodo de 16 días..... | 83 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 16. Diagrama del aislamiento y purificación de las subfracciones con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs (continúa) | 91 |
| Figura 17. Estructura química del compuesto 2 (birsonina A) y 3 (birsonina B), con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs, y la correlación HMBC del compuesto 2 (correlaciones ^1H - ^1H COSY (negrita) y ^1H - ^{13}C HMBC (flecha))..... | 96 |
| Figura 18. Diagrama de aislamiento y purificación de las fracciones con actividad antimicrobiana (continua). | 103 |
| Figura 19. Correlaciones ^1H - ^1H COSY (negrita) y ^1H - ^{13}C HMBC (flecha) del compuesto 4..... | 107 |
| Figura 20. Compuestos 4 y 5 aislados de <i>B. crassifolia</i> con actividad antimicrobiana. | 107 |

RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica, causada por un déficit en la secreción de insulina, o bien en la acción de ésta. Dicha enfermedad es un problema de salud mundial por lo que, con la finalidad de buscar un tratamiento alternativo que ayude a algunas de las complicaciones de la diabetes se decidió estudiar la semilla de *Byrsonima crassifolia*.

En un estudio previo realizado a los extractos de hexano de la fruta y la semilla de *B. crassifolia* se encontró que ambos presentan actividad hipoglucemiante y antiglicación. Por lo que en el presente trabajo se continuó dicho estudio con el fin de elucidar la estructura química de los compuestos que les confieren dichas actividades, mediante técnicas espectroscópicas como IR, RMN (^{13}C , ^1H y 2D) y EM. Además, considerando que las personas con diabetes presentan problemas inflamatorios y una baja cicatrización, se consideró importante aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria y cicatrizante así como su actividad antimicrobiana.

Al finalizar la investigación se lograron identificar los siguientes compuestos de la semilla de *B. crassifolia*; **(1)**: dos con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs, los cuales fueron nombrados birsonina A y birsonina B. Éstos redujeron significativamente la glucosa en sangre, al ser probados en ratones con diabetes tipo 1 y tipo 2. Además, ambos compuestos inhibieron la formación de AGEs en el sistema metilglioxal-BSA, y también pueden actuar mediante la inhibición de dicarbonilos, los cuales son intermediarios en la formación de AGEs. **(2)**: uno con actividad antiinflamatoria (3 β ,23-dihidroxi, 1,27-diacetil-methylbutilano) el cual, al ser aplicado tópicamente en oreja de ratón a una dosis de 0.50 mg/oreja, redujo significativa la inflamación (76%), en comparación con la dexametasona usada como fármaco control, la cual redujo 81% la inflamación **(3)**: dos bioactivos con actividad antimicrobiana, los cuales mostraron actividad frente a diferentes microorganismos patógenos Gram-positivos y negativos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que la semilla de *B. crassifolia* posee compuestos que ayudan a reducir diferentes complicaciones diabéticas.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease caused by a deficiency in insulin secretion. This disease is a global health problem; order to find alternative treatment to help some of the complications of diabetes was decided study to seed of *Byrsonima crassifolia*.

In a previous study of the hexane extracts of the fruit and seed of *B. crassifolia* was found that both extracts have hypoglycemic and anti-glycation activity. So in this paper we continued the study in order to elucidate the chemical structure of the compounds that confer these activities, by spectroscopic techniques such as IR, NMR (¹³C, ¹H and ²D). Moreover, considering that people with diabetes have problems inflammatory and healing low, it was considered important to isolate and identify the compounds responsible for the anti-inflammatory activity, healing and antimicrobial activity.

Upon completion of the investigation, the following compounds were isolated from the seeds of *B. crassifolia*, (1), two with hypoglycemic activity and anti - AGEs, which were named birsonina A and B. They significantly lowered blood glucose, when tested in mice with type 1 diabetes and type 2. Furthermore, both compounds inhibited the formation of AGEs in the system methylglyoxal -BSA, and may also act by inhibiting dicarbonyls, which are intermediates in the formation of AGEs. (2) : one with anti-inflammatory activity (3β ,23- dihydroxy 1,27 -diacetyl- methylbutilanate) which, when applied topically to mouse ear at a dose of 0.50 mg / ear, significantly reduced inflammation (76%) compared with dexamethasone used as control drug, which reduced swelling 81% (3), two compounds with antimicrobial activity, which showed activity against different pathogenic Gram- positive and negative.

Agree with the results obtained, one can conclude that the seeds of *B. crassifolia* has compounds that help reduce different diabetic symptomatology.

II. ANTECEDENTES

II.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades o síndromes metabólicos caracterizados por la aparición de hiperglucemia (elevación de la glucosa en sangre), secundaria a defectos en la secreción de insulina, de la acción de la insulina o de ambas, teniendo presente que la duración de la hiperglucemia y su gravedad son los factores más importantes en la aparición a medio y largo plazo de complicaciones de muy diversa índole (Tebar,2009)

De forma secundaria, la hiperglucemia se acompaña de alteraciones del metabolismo proteico y lipídico, por lo que a pesar de su origen endocrino sus principales manifestaciones son de tipo metabólico. Por su parte, la hiperglucemia crónica se asocia con la aparición de complicaciones a largo plazo. Los procesos patogénicos involucrados en el desarrollo de este padecimiento son diversos: pueden ir desde una destrucción autoinmune de células β pancreáticas hasta una mayor resistencia a la insulina (Gálvez y col.2007).

Cabe señalar que la diabetes mellitus provoca que aumente la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) (Advanced Glycation End-products) y las complicaciones a largo plazo de la diabetes. En particular, el estrés oxidativo y la formación de AGEs tienen influencia en los problemas renales en personas diabéticas. Además, la hiperglucemia crónica resulta en daño irreversible del tejido, debido a la reacción de glucosilación de proteínas, lo que conduce a la formación de proteínas glicosiladas y AGEs (Siddalingaswamy y col.2011).

II.2. Prevalencia de diabetes en el mundo

En el 2012, el número de personas con diabetes en el mundo fue de 371 millones, con una prevalencia de 8.3% de la población mundial, mientras que 50% de las personas no había sido diagnosticada con la enfermedad.

ANTECEDENTES

En la Tabla 1 se muestra la prevalencia de diabetes en diferentes partes del mundo:

Tabla 1. Prevalencia de diabetes en diferentes regiones del mundo.

| Región | Datos generales | Prevalencia de diabetes | Personas no diagnosticadas | Personas con diabetes |
|---------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| América del Norte y el Caribe | Uno de cada diez adultos en esta región tiene diabetes | 10.5% | 29.9% | 38 millones |
| Oriente Medio y Norte de África | Uno de cada 9 adultos tiene diabetes | 10.9% | 52.9% | 34 millones |
| Europa | 21.2 millones tienen diabetes y no han sido diagnosticados | 6.7% | 38.6% | 55 millones |
| Pacífico Occidental | 1 de cada 3 adultos tiene diabetes | 8.0% | 57.9% | 132 millones |
| América Central y del Sur | 1 de cada 11 adultos tiene diabetes | 9.2% | 45.5% | 26 millones |
| África | En los próximos 20 años el número de personas con diabetes se duplicará. Esta región tiene la tasa de mortalidad por diabetes más alta del mundo | 4.3% | 81.2% | 15 millones |

(Diabetes atlas, 2012)

Los primeros 10 países/territorios en número de personas con diabetes (20-79 años) en el año 2012 fueron: (1) China, con 92.3 millones; (2) India, con 63 millones; (3) Estados Unidos de América, con 24.1 millones; (4) Brasil, con 13.4 millones; (5) Federación Rusa, con 12.7 millones; (6) México, con 10.6 millones; (7) Indonesia, con 7.6 millones; (8) Egipto, con 7.5 millones; (9) Japón, con 7.1 millones y (10) Pakistán, con 6.6 millones (Diabetes atlas, 2012).

ANTECEDENTES

La mitad de los fallecimientos atribuibles a la diabetes ocurre en personas con menos de 60 años (Figura 1) (Diabetes atlas, 2012).

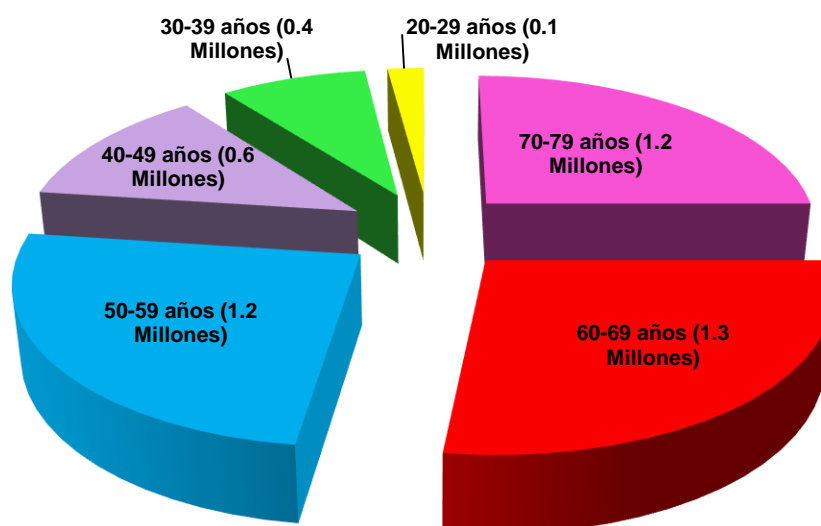


Figura 1. Fallecimientos atribuibles a la diabetes por edad (20-79 años).

En 2012 en México, los casos de diabetes en personas cuya edad estaba entre los 20 y los 79 años fue de 10,603, los fallecimientos por diabetes en este segmento de la población fueron 73,347, los gastos médicos ocasionados por la diabetes por persona afectada fueron de \$815.53 dólares y el número de personas diagnosticadas fue de 3,452 millones (Diabetes atlas, 2012).

En México la diabetes es la primera causa de ceguera adquirida en edad productiva; también es la principal causa de insuficiencia renal crónica y de amputaciones no traumáticas de miembros inferiores.

De cada 100 personas con diabetes, 14 presentan nefropatía (daño en riñón), 10 neuropatía (daño en sistema nervioso), 10 pie diabético (una de cada tres termina con amputación), cinco con ceguera, además, tienen tres veces más riesgo de cardiopatías o enfermedades cerebrovasculares, y presentan trastornos depresivos y cambios de personalidad.

II.3. Diagnóstico

Para determinar si un paciente tiene diabetes, se realiza en ayunas una prueba de glucosa en plasma (GPA) o una prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG). La Asociación Americana de Diabetes recomienda la prueba de GPA, porque es más económica, rápida y fácil de realizar. Si en la prueba se detecta un nivel de glucosa en la sangre de 110 mg / dl a 125 mg / dl, ello significa que la persona no tiene diabetes, mientras que una persona con un nivel de glucosa de 126 mg / dl, o superior, padece diabetes (Bennett, 2007).

II.4. Clasificación de la diabetes mellitus

La característica de todos los tipos de diabetes mellitus es la deficiencia de insulina, ya que en todos los casos las manifestaciones se corrigen con el suministro de esta hormona. Existen dos formas principales de diabetes mellitus: la tipo 1 (insulinodependiente) y la tipo 2 (no insulinodependiente), cuyas principales diferencias se indican en la Tabla 2. El tipo 1 representa 10% de los casos, y el tipo 2, el 88% del total (De Castro y Pérez, 2006).

Tabla 2. Diferencias entre diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2.

| Característica | Tipo 1 | Tipo 2 |
|---------------------------|------------------|-------------------|
| Género | Mujeres=varones | Mujeres>varones |
| Frecuencia relativa | 10% | 90% |
| Edad de inicio | < 30 años | > 40 años |
| Obesidad | No | Sí |
| Anticuerpos antiinsulares | Sí | No |
| Cetoacidosis | Sí | No |
| Historia familiar | Poco frecuente | Frecuente |
| Complexión | Normal a delgado | Obeso |
| Insulina plasmática | Baja a ausente | Normal a alta |
| Complicaciones agudas | Cetoacidosis | Coma hiperosmolar |

(De Castro y Pérez, 2006; Thompson *et al.* 2005).

II.4.1. Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes tipo 1 generalmente se manifiesta en la infancia o en la adolescencia, toda vez que ésta se produce por una destrucción autoinmune de las células β del páncreas, que normalmente producen insulina (Thompson y *col.*2005),

Al no ser reconocidas como propias las células β del islote pancreático, el organismo crea anticuerpos y linfocitos T que las destruyen (Gal y *col.*2007; Argente y Muñoz, 1999).

Como parte de su tratamiento, esta enfermedad conlleva la necesidad de que diariamente le sea suministrada insulina exógena al paciente. Hasta el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, la mayor parte de la insulina disponible se extraía del páncreas del cerdo, la vaca o la oveja. Sin embargo, una vez clonado el gen de la insulina humana, se comenzó a manufacturar por fermentación. Por otro lado los científicos están desarrollando técnicas encaminadas a implantar células β , de modo que el enfermo no precise inyectarse esta hormona de forma periódica (Gal y *col.*2007).

II.4.2. Diabetes mellitus tipo 2

En esta forma de diabetes existe una deficiencia de insulina, en pacientes con diabetes tipo 2 se ha observado una alteración funcional de las células β , cuya liberación de insulina en respuesta a la glucosa es tardía, (De Castro y Pérez, 2006; Thompson y *col.*2005).

Antes de padecer diabetes tipo 2 se desarrolla hiperglucemia e hiperinsulinemia, padecimientos que inician un ciclo que finalmente llevará a la diabetes tipo 2. La hiperglucemia persistente desensibiliza las células β , de manera que éstas liberan menos insulina. De forma similar, los elevados valores basales de insulina crónicos dañan los receptores de insulina, incrementando así la resistencia a ésta (Thompson y *col.*2005).

II.5. Algunas complicaciones de la diabetes mellitus

11.5.1. Glicación no enzimática de proteínas

La glicación no enzimática de proteínas resulta de la formación de un enlace covalente entre la glucosa (u otros monosacáridos) con las proteínas, sin la participación de enzimas, en un proceso que depende exclusivamente de la concentración del monosacárido y del tiempo de contacto con las proteínas.

Por otro lado, se reserva el prefijo “glu-” para el caso de la reacción entre proteínas y glucosa, mientras que el correspondiente “gli-” se utiliza para cualquier azúcar reductor.

En la etapa inicial de la glucosilación se produce la unión no enzimática y reversible del grupo aldehído de la glucosa con grupos amino libres de las proteínas con formación de aldminas o bases de Schiff (Figura 2). Posteriormente, como consecuencia de reordenamientos moleculares se generan los compuestos de Amadori (CA), llamados también fructosaminas, porque el resto glucosil se transforma en fructosil, dado el desplazamiento del grupo carbonilo del carbono 1 al carbono 2 durante el reordenamiento.

En la segunda etapa de la glucosilación, los CA participan en una serie de reacciones irreversibles, colectivamente llamadas “reacciones de Maillard”, dando origen a los productos de glucosilación avanzada o AGEs (Figura 2) (Advanced Glycation End-products) (Actis y Rebolledo, 2000).

ANTECEDENTES

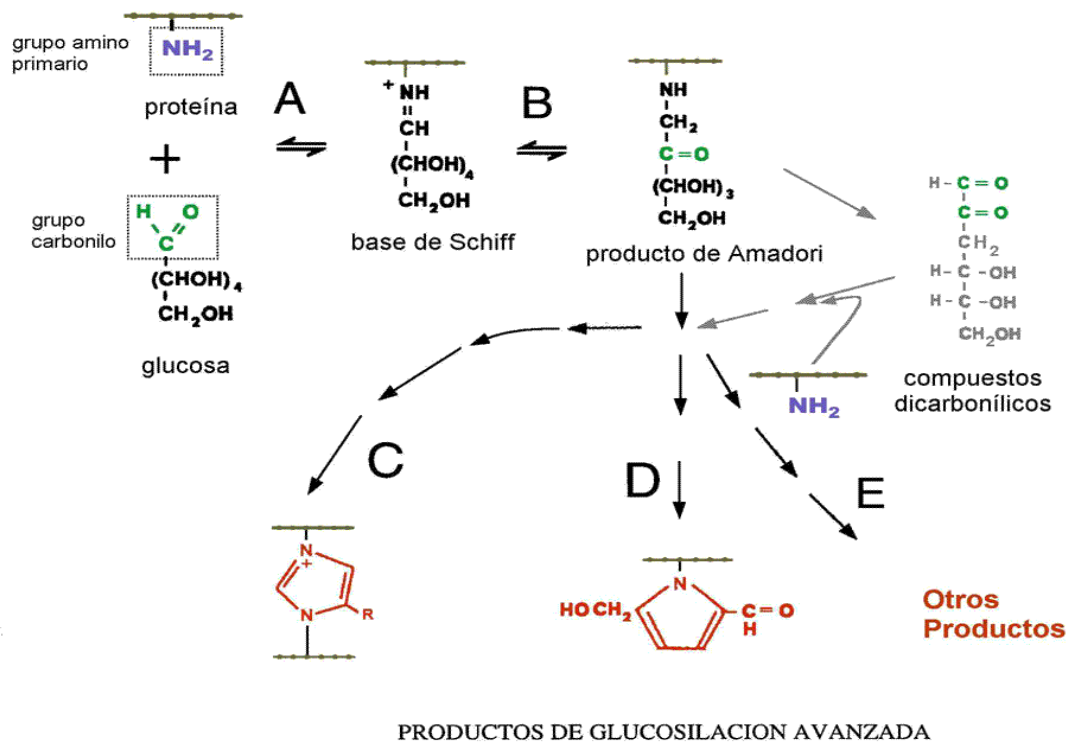


Figura 2. Esquema de la formación de glicosilación avanzada (AGEs)

La glicación trae como consecuencia que las proteínas modifiquen su estructura, sus propiedades fisicoquímicas y funciones biológicas.

Antes de la formación de los AGEs se generan diferentes intermediarios o precursores que también son tóxicos, como el metilglioxal. El metilglioxal es eliminado fisiológicamente por la glioxalasa, pero en la diabetes mellitus la expresión de la glioxalasa se altera, lo que contribuye a la citotoxicidad y complicaciones crónicas originadas por este intermediario (Acosta y *col.* 2011).

Algunas de las complicaciones que se le atribuyen a los AGEs son: la arteriosclerosis (endurecimiento de las arterias) y la hiperlipidemia (exceso de lípidos en la sangre) en personas diabéticas (Smit y Lutgers, 2004), de ahí la importancia de inhibir la formación de estos compuestos.

11.5.1.1 Inhibidores de la glicación no enzimática de proteínas

Para inhibir la reacción de glicación se requiere el bloqueo de los compuestos carbonílicos altamente reactivos (productos de Amadori y compuestos dicarbonílicos) que se formaron durante las primeras etapas de la glicación. En este sentido se han utilizado derivados de la hidrazina, los cuales presentan mayor reactividad que los grupos amino frente a los compuestos carbonílicos; de ellos el que presentó un mejor resultado fue la aminoguanidina. La aminoguanidina se une preferentemente a los compuestos carbonílicos dando lugar a productos que no permiten el avance de la reacción (Figura 3) (González y col.2000).

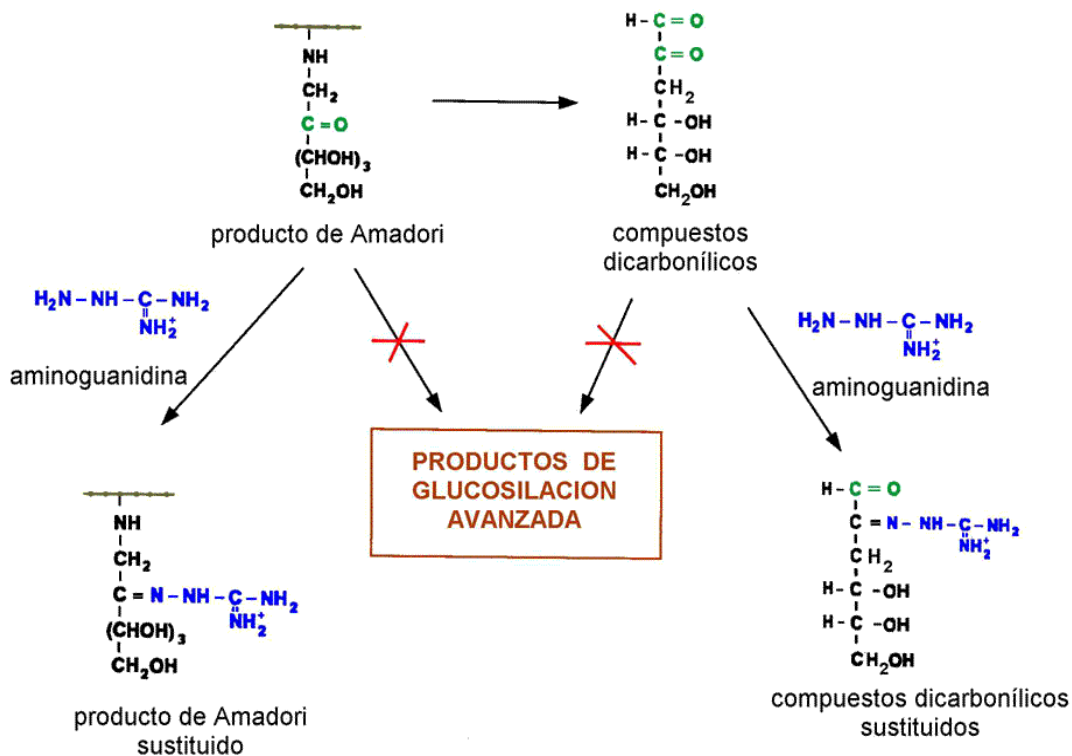


Figura 3. Inhibición de la formación de AGEs mediante aminoguanidina.

11.5.2. Lesiones tisulares

Si la glucemia no se controla durante periodos prolongados, los vasos sanguíneos comienzan a alterarse y experimentan cambios estructurales, con el consiguiente deterioro del aporte de sangre a los tejidos, característico de la diabetes mellitus (Guyton, 2006).

Habitualmente, los enfermos diabéticos que desarrollan lesiones en el pie tienen como primer factor una disminución de la sensibilidad y los pies son altamente susceptibles de iniciar fases de hipoestesia (disminución de la sensibilidad). La neuropatía sensitiva altera inicialmente la sensibilidad profunda —sentido de posición de los dedos del pie, reflejos intrínsecos de los mismos— y posteriormente a la sensibilidad superficial —táctil, térmica y dolorosa.

A nivel cutáneo y subcutáneo, y debido a la formación de AGEs, las fibras de la piel se engrosan y aumentan su entre cruzamiento, dando lugar a una piel gruesa y firme, y a una disminución en la movilidad articular.

La afectación del sistema nervioso autónomo contribuye a la disminución de la sudoración local, constituyéndose una piel seca, donde con facilidad se producen fisuras que pueden ser el inicio de úlceras e infecciones. Las úlceras son consecuencia de estímulos no percibidos debido a la pérdida de la sensibilidad dolorosa.

Debido a ello, los enfermos diabéticos con neuropatía diabética (daño en los nervios del cuerpo) pierden, de forma total o parcial, la capacidad de percibir los mínimos traumatismos mecánicos, la presión inadecuada ejercida por zapatos mal ajustados o cualquier otro tipo de traumatismo, lo que da lugar a la formación de callosidades y deformidades.

También existe un aumento en la presión plantar, que es el factor más importante en la formación de úlceras, produciendo una disminución del flujo sanguíneo impidiendo con ello, que la sangre alcance los órganos y tejidos del cuerpo (isquemia).

La isquemia, asimismo, provoca una disminución de la capacidad de cicatrización y por lo tanto al no haber una correcta cicatrización se favorece la aparición de infección. (Blanes y col.2002). Las infecciones son causadas en su mayoría por *S. aureus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *E. coli*) y eventualmente *Pseudomonas*.

11.5.3. Inflamación

La inflamación (del latín *inflammatio*: encender, hacer fuego) es una forma de respuesta del organismo ante una agresión del medio. Los signos de inflamación son:

- **Tumefacción:** aumento del líquido intersticial (líquido contenido entre las células) y formación de edema (hinchazón causada por la acumulación de líquido en los tejidos del cuerpo).
- **Rubor:** enrojecimiento, que se debe principalmente a los fenómenos de vasodilatación.
- **Calor:** aumento de la temperatura de la zona inflamada, debido a la vasodilatación

La inflamación puede dividirse en aguda y crónica, según el tipo de estímulo y la efectividad en la respuesta inicial para eliminarla. Mientras que la inflamación aguda es de instalación inmediata y de corta duración, la inflamación crónica es de duración prolongada y está relacionada con la respuesta dada por los linfocitos y los macrófagos así como por la destrucción tisular. La inflamación crónica se presenta cuando la inflamación aguda no ha logrado mitigar el estímulo nocivo (González y col. 2011)

En la inflamación participan las células endoteliales del tejido dañado o próximo a la lesión, así como las células de la respuesta inmune (leucocitos) cuya actividad es regulada por citosinas y por otros mediadores (Rosado y Mendoza, 2007).

ANTECEDENTES

Una vez que se ha generado la lesión tisular se produce vasodilatación como respuesta a la acción de mediadores pre-sintetizados que son liberados por las células del tejido implicado, esta vasodilatación aumenta el volumen de sangre en la zona y disminuye su flujo, esto explica el calor y el rubor en la lesión.

Los mediadores de la inflamación son moléculas de bajo peso molecular y de origen plasmático o celular, ejemplo de ellos son los metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos), aminas (histamina y serotonina) proteínas (citoquinas, interleuquinas, factores de crecimiento, factores de necrosis, neuropéptidos) y otros (óxido nítrico, radicales libres de oxígeno, factor activador de plaquetas). Estos son los encargados de producir todas las reacciones físicas y químicas que se producen en el proceso inflamatorio, así como activar las células implicadas y mediar el control regulador de inicio e interrupción del proceso inflamatorio. De ellas las más importantes son las citoquinas. Todas estas células y pequeñas moléculas son activadas por determinados estímulos denominados señales activadoras de la inflamación (Piñon y Casky, 2006).

Estas señales pueden presentarse intra y/o extracelularmente, activando el proceso inflamatorio. Dichos estímulos pueden provenir de agentes biológicos (bacterias, virus, hongos, parásitos) agentes físicos (frío, calor, rayos UV, radiaciones) agentes químicos (venenos, toxinas) alteraciones vasculares o inmunitarias, traumatismos, cuerpos extraños y estrés (Sánchez y Kaski, 2001).

La primera molécula que asoció inflamación y obesidad fue el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Hotamisligil y Spiegelman, 1993). El TNF α es una citosina inflamatoria que se produce fundamentalmente en los macrófagos y en otras células. El TNF y la interleucina-1 (IL1) son dos de las principales citosinas; sus acciones más importantes en la inflamación se derivan de sus efectos sobre el endotelio, leucocitos y fibroblastos e incluyen la inducción de respuestas sistémicas de fase aguda. La diabetes y la obesidad se caracterizan por concentraciones elevadas de marcadores de fase aguda.

Varios estudios confirman la idea de que en la diabetes mellitus tipo 2 hay un estado de inflamación (Shmidt, 1999; Freeman y *col.*2002). Por otro lado, se ha señalado que los AGEs pueden contribuir al proceso inflamatorio crónico. Ya que estimulan la producción de citosinas inflamatorias, y se ha demostrado que inducen la liberación de IL-1 y de TNF (Miranda y Reza, 2007).

II.6. Hipoglucemiantes orales

Los hipoglucemiantes orales desempeñan un papel primordial en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Se incluyen en este tipo de fármacos las biguanidinas, las tiazolidinedionas, y como grupo destacado, las sulfonilureas.

II.6.1. Sulfonilureas

Son derivados de las sulfamidas, en las cuales la estructura sulfonilurea constituye el grupo esencial de la actividad hipoglucemiante. Diversas sustituciones en el anillo bencénico y en el grupo urea han originado compuestos cuya potencia y propiedades farmacocinéticas difieren notablemente (véase Tabla 3) (Flores, 2004).

II.6.1.1. Mecanismo de acción

Las sulfonilureas estimulan la liberación de insulina por las células β pancreáticas, y aumentan la sensibilidad de los tejidos periféricos a esta hormona. Todas las sulfonilureas se absorben muy bien por vía oral; asimismo, se fijan fuertemente a proteínas, pero en particular a la albumina (entre 88 y 99% de éstas) y su eliminación (Flores, 2004).

ANTECEDENTES

Tabla 3. Características farmacocinéticas de las sulfonilureas.

| Fármaco | Vida media (h) | Eliminación renal (% de dosis) | Duración del efecto (h) | Dosis diaria (mg) | Número de dosis al día |
|---------------|----------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|
| Acetohexamida | 3.5-11 | 60 | 12-18 | 500-1.500 | 2 |
| Tolbutamida | 4.0-25 | 100 ^a | 6-12 | 500-3.000 | 2-3 |
| Tolazamida | 7 | 95 | 12-18 | 100-1.000 | 1-2 |
| Clorpropamida | 24-48 | 6-60 | 20-60 | 100-500 | 1 |
| Glibenclamida | 10-16 | 50 | 10-24 | 1.5-20 | 1-2 |
| Glibornurida | 5-12 | 65 | 12-24 | 4.0-50 | 1-2 |
| Gliclazida | 12 | 60-70 | 6-24 | 80-240 | 1-2 |
| Glimepirida | 9.2 | 60 | 16-24 | 2-8 | 1 |
| Glipentida | 4 | 60 | 6-12 | 2.5-20 | 2 |
| Glipzida | 3-7 | 68 ^a | 6-12 | 2.5-30 | 1-2 |
| Gliquidona | 1.5 | <5 | 6-12 | 15 | 2-3 |

^a Se excretan principalmente como metabolitos inactivos.

II.6.2. Reacciones adversas

Hay evidencias que indican que estos fármacos actualmente producen una amplia gama de efectos secundarios, de los cuales el principal corresponde a la hipoglucemia, que en muchos casos llega a ser severa y prolongada, siendo mayor el riesgo con las sulfonilureas de acción prolongada (clorpropamida). Otros efectos secundarios menos frecuentes suelen aparecer en los primeros meses de tratamiento, por ejemplo reacciones cutáneas, alteraciones hematológicas, hepáticas y gastrointestinales.

Por lo que a la fecha, ninguna de las actuales posibilidades de tratamiento para la diabetes es completamente satisfactoria, por lo que se precisan nuevas opciones terapéuticas para mejorar el control metabólico, prevenir las manifestaciones crónicas de la enfermedad, así como disminuir los efectos secundarios que se producen al ingerir los diferentes medicamentos.

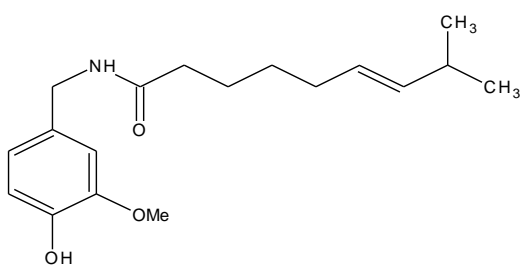
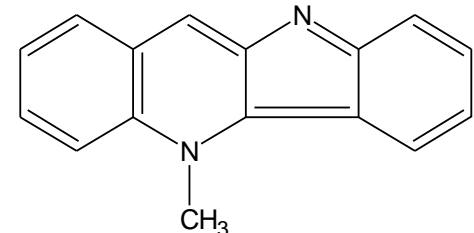
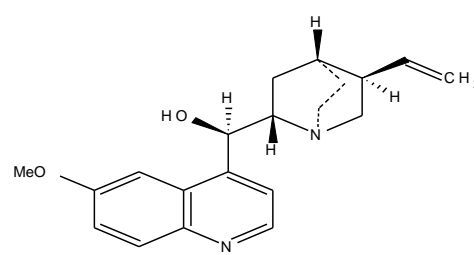
Es esto lo que induce al enfermo diabético a buscar, a través de la medicina popular o tradicional, el uso de fármacos de origen natural para el tratamiento de su patología.

II.7. Plantas medicinales

Se sabe que la medicina tradicional sirve para atender una gran variedad de enfermedades utilizando una flora medicinal muy extensa. Si se tiene en cuenta la gran diversidad de plantas, éstas son una excelente alternativa para el desarrollo de nuevos medicamentos. Existen alrededor de 800 plantas de las que se han aislado e identificado compuestos con actividad hipoglucemiante. En las Tablas de la 4 a la 8 se muestran algunos de los compuestos aislados e identificados como hipoglucemiantes (Pérez, 2008).

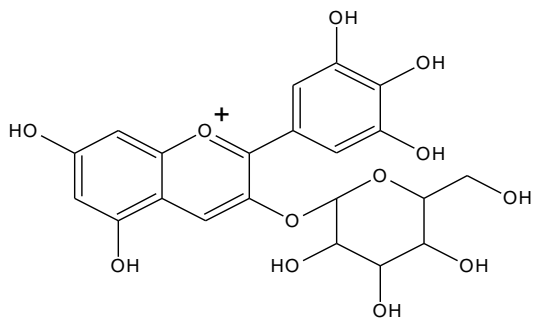
ANTECEDENTES

Tabla 4. Alcaloides y compuestos nitrogenados.

| Planta | Compuesto aislado | Estructura |
|---|-------------------|---|
| <i>Capsicum annuum</i> L. (Solanaceae) (Chile verde) | Capsaicina |  |
| <i>Castanospermum australe</i> A. Cunn. (Fabaceae) (Castaño de Australia) | Criptolepina |  |
| <i>Cinchona officinalis</i> (Rubeaceae) (Quina) | Quinina |  |

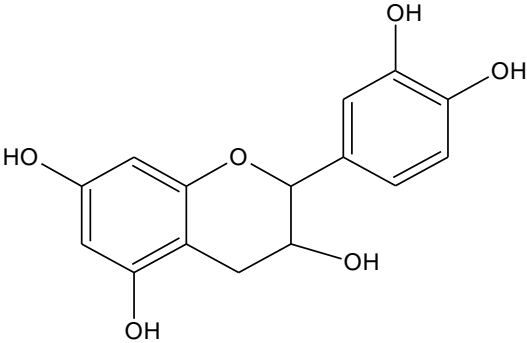
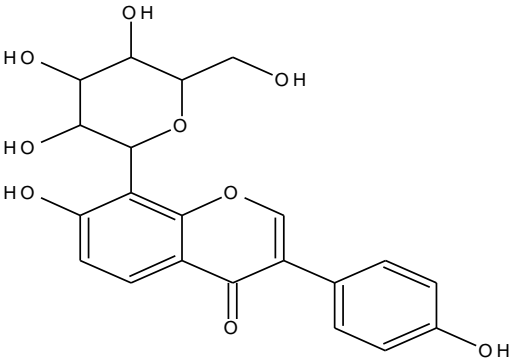
(Pérez, 2008).

Tabla 5. Flavonoides (continúa).

| Planta | Compuesto aislado | Estructura |
|--|-------------------|--|
| <i>Eucalyptus citriodora</i> (Mirtaceae) Eucalipto | Mitillina |  |

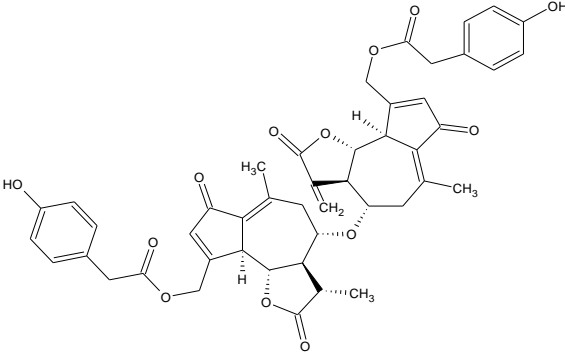
ANTECEDENTES

Tabla 5. Flavonoides (continuación)

| | | |
|--|---------------------|--|
| <p><i>Camellia sinensis</i> L. (Kuntze, Theaceae) Árbol del té</p> | <p>Epicatequina</p> |  <p>The structure shows a flavan-3-ol core. It consists of a chromane ring system with a hydroxyl group at the 5-position and a catechol group at the 2-position. The 3-position is substituted with a 2,4,6-trihydroxyphenyl group.</p> |
| <p><i>Pueraria lobata</i> Kudzu</p> | <p>Puerarina</p> |  <p>The structure shows a flavone core. It has a 7-hydroxyflavone skeleton with a 4-hydroxyphenyl group at the 3-position. The 5-position is substituted with a 2,3,4,6-tetrahydroxyheptan-2-yl group.</p> |

(Pérez, 2008).

Tabla 6. Monoterpenoides, diterpenoides y sesquiterpenoides (continúa).

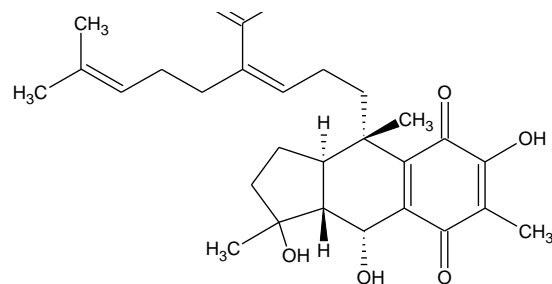
| Planta | Compuesto aislado | Estructura |
|---|--------------------|--|
| <p><i>Lactuca indica</i> Lechuga espinaca</p> | <p>Lactuaina C</p> |  <p>The structure is a complex polycyclic sesquiterpene. It features a decalin core with multiple methyl groups, a lactone ring, and a side chain containing a 4-hydroxyphenyl group. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p> |

ANTECEDENTES

Tabla 6. Monoterpenoides, diterpenoides y sesquiterpenoides (continuación).

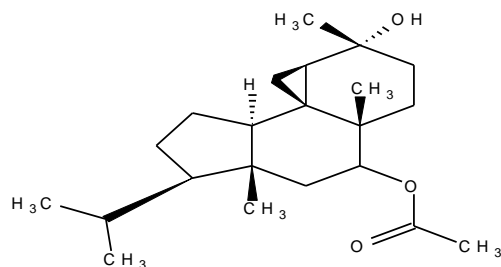
Pycnanthus angolensis
Calabó

Picantuquinona



Azorella compacta
Kunkuma

Azoreyanol



(Pérez, 2008).

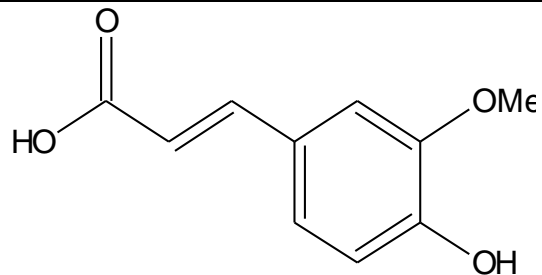
Tabla 7. Fenoles, ligninas, neoligninas y taninos.

| Planta | Compuesto aislado | Estructura |
|---|-------------------|------------|
| <i>Xanthium strumarium</i> Cadillo | Ácido caféico | |
| <i>Cecropia obtusifolia</i> Guarumbo | Ácido clorogénico | |

ANTECEDENTES

Avena sativa L.

Ácido ferúlico



(Pérez, 2008).

Tabla 8. Triterpenos.

| Planta | Compuesto aislado | Estructura |
|----------------------------------|-------------------|---|
| <i>Ginseng meyer</i> | Ginsenocide C | <p>The structure is a complex pentacyclic triterpene. It features a central ring system with several methyl groups (CH₃) and hydroxyl groups (OH) attached. A long side chain is present, ending in a branched alkene group.</p> |
| <i>Polygala senega</i> Senega | Senegina III | <p>The structure is a highly complex polycyclic triterpene. It consists of multiple fused rings with numerous hydroxyl groups (OH) and a methoxy group (OMe) attached. The structure is highly branched and complex.</p> |

(Pérez, 2008).

En México existe una variedad muy amplia de plantas utilizadas en la medicina popular para el tratamiento de la diabetes, de las que se tienen registradas 306 especies. Sin embargo, en su mayoría se desconoce la farmacocinética de sus componentes activos, así como su metabolismo (Andrade y Heinrich, 2005).

Algunas plantas que se pueden encontrar en México, reportadas como hipoglucemiantes son: ajenojo, betabel, cebolla, sábila, piña, guanábana, cacahuate, boldo, papaya, calabaza, zanahoria, nopal, aguacate, perejil, tomate, verdolaga, guayaba, rábano, chayote, nanche etc. (Andrade y Heinrich, 2005).

II.8. *Byrsonima crassifolia*

Byrsonima crassifolia (L) Kunth, conocida comúnmente en México como Changunga, Changungo, Chengua (Mich.); Chi (l. maya, Yuc.); Huizaa (l. zapoteca, Oax.; Mami-hña (l. chinanteca, Oax.); Nance, Nanche, Nanchi, Nanantze (Gro.); Nance agrio (Gro. Tab.); Nancis; Nanche amarillo (Pue.); Nanche dulce (Oax.); Nandzin (l. zoque, Chis.); Nantzincuhuitl, Nanzinxócotl (l. náhuatl), es una especie que tiene gran importancia silvícola y ecológica, al restaurar la capacidad regenerativa del bosque, ya que crece a pleno sol y produce fruto rápidamente después de haber sido plantada, lo que atrae a animales que contribuyen a la dispersión de semillas (Garriz, 1986).

B. crassifolia tiene una amplia distribución desde México, Centroamérica y hasta Paraguay. Es un árbol muy común en la sabana venezolana y también en áreas costeras del noreste de Brasil; asimismo, se cultiva en el sur de California y la costa occidental de México.

En este último país, se encuentra principalmente en los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Garriz, 1986).

II.8.1. Descripción taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Embryobionta

División: Magnoliophyta

ANTECEDENTES

Clase: Magnoliopsida

Origen: Polygalales

Familia: Malphigiaceae

Género: *Byrsonima*

Especie: *Byrsonima crassifolia*

Nombre científico: *Byrsonima crassifolia* L.

Nombre común: nanche (Argueta *et al.*, 1994)

En la Figura 4 se muestra el fruto de *Byrsonima crassifolia*.



Figura 4. Fruto de *Byrsonima crassifolia*

II.8.2. Descripción botánica

Es un árbol perenne, comúnmente adaptable a condiciones secas dadas las características de sus hojas, copa abierta, tronco y ramas tortuosos. El tronco principal es cilíndrico, normalmente de 30 a 40 cm. Sus hojas son simples y opuestas, con una longitud de 7 a 15 cm; con un peciolo corto y agrupadas en el

extremo de las ramillas, sus hojas se distinguen porque el envés está cubierto por pelos grisáceos o rojizos en forma de “T”.

Entre los meses de noviembre y junio produce flores, las cuales se agrupan en racimos de hasta 12 cm de largo, son amarillas y se vuelven rojizas al madurar, tienen 1.5 cm de diámetro y su corola tiene cinco pétalos (Bejar y Malone, 1993).

El fruto es una drupa globosa, carnososa y amarilla de 1.5 a 2 cm, es ligeramente ácido y contiene de 1 a 3 semillas, además, es rico en vitamina C (90-240 mg/100 g) y el 40% de éste puede estar constituido por el mesocarpio (parte comestible) (Bejar y Malone 1993).

Tiene sabor y aroma muy característicos: ligeramente agridulce, sin duda muy agradable para los que se han acostumbrado a consumirlo. Por su elevado contenido en vitamina C es un importante recurso alimenticio. En calidad de frutas pueden preservarse hasta por 15 días en agua y 40 días con azúcar; es una especie muy apta para mejorar la producción por medio de la propagación de árboles seleccionados por la buena calidad y tamaño de su fruto (Garriz, 1986).

En México hay un periodo máximo de floración desde marzo hasta junio, y los frutos se producen principalmente desde mayo hasta septiembre. No existe un método particular de recolección ni almacenamiento de su semilla.

II.8.3. Usos populares

Se consume crudo, en dulces, refrescos, jaleas, confituras, almíbares, vinos y como saborizante para helados. En la Amazonía, por ejemplo, se consume en puré o con harina de yuca. En Guatemala la cáscara del fruto se utiliza para pigmentar tejidos de algodón, debido a que produce un tinte de color castaño. (España y col.1994).

La madera es de color amarillo, sin olor ni sabor, de textura fina, fuerte, de lustre mediano e hilo recto. Se emplea en muebles, gabinetes, pisos, torneados, puertas, marcos para puertas y ventanas, molduras, marcos de cuadros. La corteza es rica en

taninos (28.6 %) y se emplea en la curtiduría; a su vez, las hojas se utilizan como forraje para cerdos y otros animales domésticos y silvestres.

La parte que más se usa en la medicina popular es la corteza, ya que por sus propiedades astringentes se emplea como antidiarreico (se toma como agua de uso); también se utiliza para infecciones en la matriz e inflamación en los ovarios, así como en otros tipos de desórdenes digestivos como disentería y dolor de estómago. Son muy conocidas las propiedades del nanche para curar afecciones de la piel como sarna, salpullido y heridas, mediante el uso de la cocción hecha con éste y trozos de corteza de cedro; asimismo, ha resultado eficaz para afianzar las encías, aliviar el dolor de la cintura, quitar el resfriado y contrarrestar el efecto de las mordeduras de víbora (España y col.1994). Además, es útil en las afecciones renales y el control de la diabetes (Argueta y col.1994).

El tallo y la raíz hervidos se utilizan para aliviar enfermedades producidas por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *S. pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* y *Bacillus subtilis*

En general, todas las partes de la planta son utilizadas como antimicrobianas, antibacterianas, antifúngicas, desinflamantes, y para aliviar la disentería, el asma y la diarrea (España y col.1994).

II.8.4. Estudios realizados

En estudios previos (Pérez y col.2010) se evaluó el efecto hipoglucemiante, así como la capacidad de inhibir la formación de AGEs mediante la administración oral de los extractos de hexano, cloroformo y metanol de la fruta y la semilla de *Byrsonima crassifolia*, a ratas normoglucémicas y ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina.

Obteniéndose que los extractos de hexano de la fruta y la semilla de *B. crassifolia* poseen propiedades hipoglucemiantes, después de cuatro horas de haberlos administrado oralmente a ratas diabéticas.

Además, ambos extractos mostraron actividad inhibitoria significativa contra la formación de AGEs con valores de CI50 de 94.3 a 138.7 g / ml (Pérez y col.2010).

II.9. Diabetes experimental

La inducción de diabetes experimental en animales de laboratorio se lleva a cabo usando químicos, los cuales destruyen las células β pancreáticas. Los más utilizados son la aloxana y la estreptozotocina (STZ) (Szkudelski, 2001).

II.9.1. Estreptozotocina

La estreptozotocina (STZ), es una nitrosourea sintetizada por el microorganismo *Streptomyces achromogenes*, a la cual se le han atribuido propiedades antineoplásticas y antibióticas, y es comúnmente utilizada en la inducción de la diabetes mellitus debido a su efecto tóxico específico en las células β del páncreas. Esta sustancia causa diabetes permanente en animales y en el caso de ratas, la dosis única utilizada se encuentra entre 40 y 60 mg / kg de peso. (Ramos y Domingo, 1994).

Existen evidencias que indican que la toxicidad de la estreptozotocina está mediada por el reconocimiento específico de algunos receptores sobre las células beta. Además, provoca un decremento en los niveles del nucleótido de nicotinamida y adenina, ya que tanto puede disminuir su síntesis, como puede incrementar su hidrólisis (Szkudelski, 2001).

III. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus incluye un grupo heterogéneo de patologías, cuya característica común es la elevación de la glucosa en sangre (hiperglucemia), causada por un déficit en la secreción de insulina o de su acción, afectando la captación y entrada de glucosa en el músculo y las células grasas, siendo la diabetes tipo 2 la de mayor incidencia en el mundo, con prevalencia del 90%.

El crecimiento de la enfermedad a nivel mundial es especialmente alarmante, ya que la diabetes se está convirtiendo en una pandemia global relacionada con el rápido aumento del sobrepeso, la obesidad y la inactividad física. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo existen 346 millones de personas con diabetes y, de no hacer algo para combatirla, hacia 2030 este número se habrá, al menos, duplicado.

A la fecha, ninguno de los tratamientos para la diabetes es completamente satisfactorio, por lo que se precisan nuevas opciones terapéuticas para, prevenir las manifestaciones crónicas de la enfermedad, así como disminuir los efectos secundarios que se producen con la ingesta y suministro de los diferentes medicamentos.

Debido a esto, en los últimos años la atención se ha dirigido hacia la fotoquímica de las plantas, ya que existe una necesidad de aislar y caracterizar nuevos metabolitos secundarios presentes en las plantas, los cuales pueden presentar propiedades farmacológicas y ser fuentes de nuevos fármacos.

El aislamiento de los compuestos antidiabéticos de *B. crassifolia* representará a futuro una fuente de materia prima natural para tratar o prevenir, la diabetes en pacientes o personas susceptibles de desarrollar la enfermedad.

IV. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar compuestos a partir de la semilla de *Byrsonima crassifolia* que ayuden a reducir algunas de las sintomatologías de la diabetes, como son la hiperglucemia, la formación de AGEs, la cicatrización y la inflamación, además de identificar compuestos con actividad antimicrobiana.

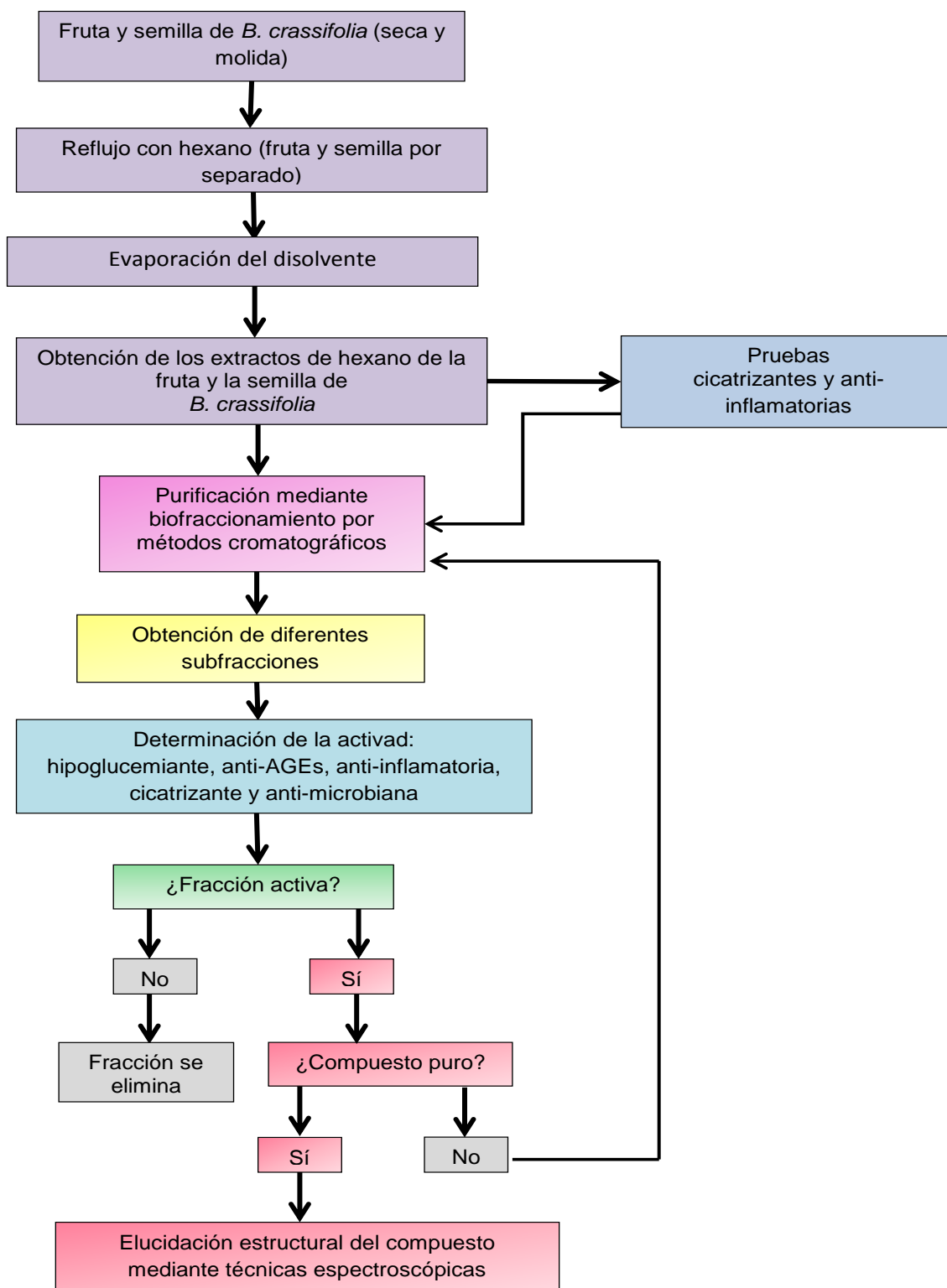
IV.1. Objetivos específicos

- Obtener a partir de la fruta y la semilla de *B. crassifolia* extractos crudos de hexano.
- Evaluar si dichos extractos presentan actividad cicatrizante y anti-inflamatoria.
- Purificar los compuestos con actividad hipoglucemiante, anti-AGEs, antiinflamatoria y antimicrobiana, utilizando métodos cromatográficos.
- Elucidar las estructuras de los compuestos puros, por medio de técnicas instrumentales como IR, RMN (^{13}C , ^1H y 2D) y EM.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El fruto de *B. crassifolia* se recolectó en el mes de octubre de 2011, en el estado de Morelos, y éste fue autenticado taxonómicamente en el Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, al cual se le otorgó el número de referencia 8976.

VII.1. Preparación de la materia prima

A las frutas se les extrajo de forma manual las semillas, posteriormente, se secaron en una estufa de corriente de aire a 32 °C. Finalmente, las frutas y las semillas secas se molieron por separado en un molino mecánico.

VII.2. Preparación de los extractos

Las frutas y las semillas molidas se extrajeron con hexano, utilizando un aparato Soxhlet. Los extractos se filtraron y se concentraron hasta sequedad en un evaporador rotatorio al vacío para la eliminación completa del disolvente.

VII.3. Animales de experimentación

El estudio fue realizado en ratas Winstar con un peso de 150 a 200 g y ratones CD1 con un peso de 20-25 g, los cuales fueron proporcionadas por el bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Las ratas se colocaron en cajas de acrílico en un ambiente con temperatura controlada (25 ± 2 °C); fueron alimentadas con una dieta estándar y con agua *ad libitum*. Los animales se aclimataron a su nuevo entorno durante un periodo de tres días, antes de iniciar los experimentos. Las cajas de acrílico fueron limpiadas cada tercer día para así mantener la higiene y el máximo confort en los animales, los cuales fueron tratados siguiendo la ética y manejo de animales (NIH publicación No. 85-23 de 1985).

VII.3.2. Inducción experimental de la diabetes

VII.3.2.1. diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus no dependiente de insulina se indujo en ayunas a los animales (ratas y ratones) mediante una sola inyección intraperitoneal de estreptozotocina, a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal disuelta en un amortiguador frío de citratos (Zhou *y col.* 2012). El aumento de la glucosa en sangre se midió a las 72 horas y posteriormente al día 7 después de la inyección, esto para confirmar la hiperglucemia (niveles de glucosa en sangre en ayunas mayores de 300 mg / dl).

VII.3.2.2. diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 fue inducida en ayunas a las ratas y ratones mediante una sola inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ), a una dosis de 60 mg/kg de peso corporal disuelta en un amortiguador de citratos (pH 4.5), 15 min, después de la administración intraperitoneal de 120 mg / kg de nicotinamida (Li *y col.* 2011). A los animales tratados con STZ se les permitió beber 5% de solución de glucosa durante la noche para superar la hipoglucemia inducida por STZ+nicotinamida. Después de 10 días, los ratones con diabetes moderada (glucemia > 250 mg /dl) fueron utilizados para experimentación.

VII.4. Pruebas antiinflamatorias

En la Tabla 9 se muestran los diferentes modelos de inflamación que se probaron, así como las sustancias inductoras de la inflamación y el fármaco de referencia utilizado en cada ensayo.

Tabla 9. Modelos de inflamación utilizados para evaluar la actividad anti-inflamatoria de *B. crassifolia*.

| Ensayo | Animales de experimentación | Extracto (NSH) | Fármaco de referencia |
|--|-----------------------------|----------------|-----------------------|
| Tetradecanoil forbol (TPA), (induce edema en oreja) | ratón | NSH-Hexano | Dexametasona |
| Formaldehido-induce edema en pata | rata | NSH-Hexano | Indometacina |
| Carragenina-induce edema en pata | rata | NSH-Hexano | Indometacina |
| Bolitas de algodón | rata | NSH-Hexano | Indometacina |
| Histamina-induce Edema en pata | rata | NSH-Hexano | Diclofenaco de sodio |
| Edema inducido con carragenina utilizando L y D arginina | rata | NSH-Hexano | Diclofenaco y L-Name |

VII.4.1. Edema inducido en la oreja por TPA

Un µg de TPA (12-O-tetradecanoil forbol -13-acetato) disuelto en acetona (20µl) fue inyectado en la oreja derecha de los ratones. A su vez, un volumen de 10 µl se aplicó a la superficie interna y externa de la oreja. Los extractos (0.12, 0.25, 0.5 mg/oreja) y el control (agua) se aplicaron tópicamente 30 minutos antes del tratamiento con TPA. Para las determinaciones del espesor de la oreja se utilizó un espesómetro de bolsillo con límites de 0 a 9 mm. El espesor de la oreja se midió antes del tratamiento con TPA y seis horas después de éste (Godo y col. 2003). El porcentaje de inhibición de la inflamación se calculó como sigue:

$$\% \text{ de inhibición} = [(edema A - edema B) / edema A] \times 100$$

Dónde:

A = TPA

B = TPA + extracto

VII.4.2 Edema inducido con formaldehído, carragenina e histamina en pata de rata

Para realizar estas pruebas se utilizaron ratas Winstar (150-200 g), que se dividieron en 24 grupos (n=6). Estos animales fueron privados de agua únicamente durante la duración del experimento, con el fin de uniformizar la hidratación y minimizar la variabilidad en la respuesta edematosa. La inflamación de la pata fue inducida inyectando 0.2 ml de formaldehído (1% p / v) (Dai y col.2002), 0.1 ml de carragenina (1% p / v) (Winter y col.1962) o 1 mg/ml de histamina (Patil y col.2009), según la prueba por hacerse, éstos se disolvieron en solución salina isotónica. Al grupo control se le administró por vía oral 0.1 ml de solución salina y, como fármaco control, se administró indometacina (10 mg/ kg de peso corporal de la rata) (Saneja y col. 2009) o diclofenaco de sodio por vía oral. Los grupos tratados con los extractos de hexano, cloroformo y metanol de la semilla de *B. crassiflolia* recibieron dosis de 50, 100 y 200 mg / kg, por vía oral (v.o.) Todos los tratamientos fueron suministrados una hora antes de la inducción de la inflamación. El volumen de la pata se midió con un pletismómetro digital (Ugo Basile, 7140) antes y después de la inyección inflamatoria (0.5, 2, 4 y 6 horas) (Winter y col.1962).

El edema fue expresado como el incremento en el volumen de la pata, el cual se calculó utilizando la siguiente ecuación (Patil y col. 2009):

$$\% \text{ aumento del edema} = [Vt - Vc/Vc] \times 100$$

Dónde: Vt = Volumen de la pata al tiempo t

Vc = Volumen de la pata al tiempo 0

VII.4.3. Edema inducido por bolitas de algodón

En esta prueba se estudiaron los efectos del extracto de hexano de la semilla de *B. crassiflolia* (NSH) y la indometacina en la fase proliferativa de la inflamación. Para ello se administró una dosis de 200 mg / kg de NSH y como control de referencia, una dosis de 10 mg/kg de indometacina; al grupo control, por su parte, se le suministró únicamente agua.

Después de 30 minutos de haber sido suministrados los diferentes tratamientos, los animales fueron anestesiados con 25 mg / kg de tiopental sódico por vía intraperitoneal. Se implantaron debajo de la piel en condiciones estériles bolitas de algodón con un peso de 7 mg cada una. Durante siete días las mismas dosis de NSH e indometacina se suministraron una vez al día. Transcurrido ese tiempo, las ratas fueron sacrificadas mediante una dosis elevada de anestesia. Las bolitas húmedas fueron pesadas y secadas a 70 °C durante una hora (Vane y Booting, 1987). El efecto antiproliferativo de NSH se comparó con el control y el grupo al que se le suministró indometacina.

VII.4.4. Efecto de la L-arginina y D-arginina en la acción antiinflamatoria de NSH, diclofenaco y L-NAME

Se aplicó una inyección intraplantar de 30 µl de carragenina al 2%, que produjo un edema después de 30 minutos en los ratones del grupo control tratados por vía oral con el vehículo (0.45% de etanol). El mayor incremento en el edema se observó después de seis horas de haber sido aplicada la inyección de carragenina.

A los ratones tratados con el extracto NSH se les suministró una dosis de 1:1000 o 1:100 equivalente a 18.5 mg por cada 100 µl de NSH (Crunkhorn y Meacock, 1971). El efecto antiinflamatorio de NSH fue evaluado durante un periodo de 30 minutos, seis horas después de la inyección de carragenina (Belmont *et al.* 1977). Una dosis de L-arginina o D-arginina se administró por vía intraperitoneal dos horas antes de que se observara el mayor efecto anti-inflamatorio. Como fármacos de referencia se utilizaron diclofenaco (3.1 a 50 mg/kg, v.o, que es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo y L-NAME (1-100 mg / kg, sc); un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS).

VII.5. Determinación de la actividad cicatrizante

VII.5.1. Creación de la herida por escisión

Bajo anestesia, con nembutal (35 mg/kg, ip), el lomo de cada rata se afeitó para posteriormente hacer heridas abiertas circulares (270 mm²) por escisión en la piel. El área de la herida se midió inmediatamente después; los animales heridos fueron alojados por separado en jaulas diferentes (Palu y col.2010). Después de herirlos, los animales se dividieron en grupos de doce, según el orden siguiente: Grupo I: control normal tratado tópicamente con ungüento simple, Grupo II: control diabético tratado tópicamente con ungüento simple, Grupo III: diabético tratado tópicamente con nitrofurazona (fármaco de referencia), Grupo IV: diabético tratado tópicamente con extracto de hexano de las semillas de *B. crassifolia* (NSH). La tasa de contracción de la herida se calculó mediante la medición del área lacerada, los días 3, 6, 9, 12, 14 y 16 después de la creación de la herida. El área lastimada se calculó mediante el uso de un planímetro; se calculó también el porcentaje de contracción de la herida. El número de días necesarios para la curación de la cicatriz, sin ningún residual de carne viva determinó el periodo de epitelización.

VII.5.2. Análisis bioquímicos de las heridas por escisión

Los animales (6 de cada grupo) se sacrificaron los días 4, 8, 12 y 16 después de la creación de la herida, posteriormente, la herida de cada uno se cortó y almacenó a -70 °C hasta su análisis. Para las estimaciones de colágeno, los tejidos se pesaron desengrasándolos, primero en una mezcla de cloroformo/metanol (2:1v / v) e hidrolizando los tejidos en HCl 6.0 N durante 18 horas a 110 °C, posteriormente se evaporaron los solventes a sequedad para, finalmente, colocarlos en un volumen conocido de agua. El contenido de colágeno en los tejidos se estimó mediante la determinación de la hidroxiprolina, utilizando el método descrito por Woessner (1961). Para las estimaciones de la hexosamina, los tejidos de la herida se trataron como se describió anteriormente, excepto que las muestras se liofilizaron antes de la hidrólisis.

El contenido de hexosamina en los tejidos se determinó mediante el método de Elson y Morgan (1933). A su vez, el contenido de ácido urónico fue estimado por el método de Schiller y otros (1961).

Los tejidos húmedos, primero, se homogeneizaron en TCA al 5%, seguido de una centrifugación, tal como lo describe Schneider (1957). Por su parte, el sobrenadante se utilizó para la determinación del contenido de DNA por el método de Burton (1956). Las proteínas precipitadas se suspendieron en Tris-HCl 0.1 M a pH 7.4, y el contenido de proteína se estimó por el método de Lowry *y col.* (1951).

VII.5.3. Estimación de las actividades antioxidantes

Para la estimación de las actividades superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), los tejidos de la herida fueron homogeneizados utilizando un amortiguador de fosfato de potasio 0.02 M pH 7.6 y centrifugados a 6000 rpm. El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar las diferentes enzimas mediante kits comerciales tales como el kit de ensayo Bioxytech SOD-525 para la actividad de SOD (Oxis International) y el kit de ensayo de catalasa para la actividad de la catalasa (CAT) (Cayman Chemical).

VII.5.4. Creación de la herida por incisión

Para llevar a cabo el modelo de herida por incisión, las ratas fueron anestesiadas con nembutal (35 mg/kg, ip), para posteriormente hacerles incisiones de 6 cm de largo a cada lado de su columna vertebral, con cuidado de que la incisión quedara al menos a un 1 cm de la columna vertebral. Las heridas se cerraron con suturas interrumpidas de 1 cm de separación, utilizando un hilo quirúrgico y una aguja curva. Se aplicaron los fármacos a la herida por vía tópica en dosis de un suministro por día, hasta su curación completa.

Para la realización de esta prueba los animales se dividieron en grupos de seis de la siguiente manera: Grupo I: control normal tratado con ungüento simple, Grupo II: control diabético tratado con ungüento simple, Grupo III: diabético tratado tópicamente con 0.2% de nitrofurazona (fármaco de referencia), Grupo IV: diabético tratado tópicamente con extracto de hexano de las semillas de *B. crassifolia* (NSH).

VII.5.5. Medición de la resistencia a la tensión

La resistencia a la tensión equivale, en sí, a la resistencia a la rotura bajo tensión. Esta prueba muestra si el tejido reparado resiste a la rotura bajo tensión, pero también puede indicar, en parte, la calidad del tejido reparado. Las suturas (realizadas en la prueba de herida por incisión) se eliminaron el día 9, después de hacerse la herida, donde se midió también la resistencia a la tracción del tejido. Para este fin, el tejido recién formado —incluyendo la cicatriz— se extrajo; la resistencia a la tracción se midió con la ayuda de un tensiómetro (Kuвано y col. (1994).

VII.6. Actividad antimicrobiana

Para la realización de esta prueba se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

Gram-positivas: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *B. megaterium* ATCC 12872, *B. subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Sarcina lutea* ATCC 9341.

Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella paratyphi* ATCC 6539, *S. typhi* ATCC 43971, *Shigella boydii* ATCC 9207, *S. dysenteriae* ATCC 13313, *Vibrio mimicus* ATCC 33654 y *V. parahemolyticus* ATCC 43996.

Se prepararon cajas de Petri con agar Mueller-Hinton, cada una se inoculó con 100 µl de cada uno de los cultivos bacterianos antes mencionados, realizando diluciones decimales para que éstos tuvieran 10^8 UFC / ml. Cada inóculo se extendió en la placa con una varilla de vidrio acodada; posteriormente, el extracto de hexano de la semilla de *B. crassifolia* (NSH) se diluyó en dimetil sulfóxido (DMSO) para hacer diluciones decimales; a continuación, se sumergieron discos estériles de papel filtro Whatman (6 mm) en cada una de las diluciones realizadas. Finalmente, los discos se colocaron sobre las placas inoculadas (por triplicado) y éstas se incubaron a 37 °C durante 24 horas (Gaydos, 1982).

Después del periodo de incubación, el halo de inhibición se midió como describe Elgayyar y col. (2000). Los controles negativos se realizaron mediante el uso de discos estériles empapados únicamente en 10 ml de dimetil sulfóxido.

VII.7. Determinación de la actividad hipoglucemiante

Para determinar la actividad hipoglucemiante (reducción de los niveles de glucosa en sangre), se utilizaron ratones CD-1 diabéticos con un peso de entre 20 y 25 gramos, los cuales se mantuvieron en ayunas durante el experimento. Las fracciones obtenidas del extracto se suministraron por vía oral en dosis de 250 mg / kg de peso, utilizando Tween-40 como vehículo. Transcurridas tres horas, luego del suministro de las fracciones, se midieron los niveles de glucosa con un glucómetro.

VII.8. Prueba de inhibición de la glicación no enzimática de proteínas *in vitro* (AGEs)

Para evaluar la actividad inhibitoria de la glicación no enzimática de proteínas se utilizó el modelo BSA-glucosa descrito por Nobecourt *y col.* (2008). Para ello, se agregaron 10 mg de albumina sérica bovina (BSA), 50 mg de la fracción obtenida por biofraccionamiento (posible inhibidor) disuelta en 1 ml de DMSO, 500 mM de glucosa, regulador de fosfato salino (5 ml de volumen total, pH 7.4) y 0.02% de azida sódica, que se incubó a 37 °C. La incubación se llevó a cabo durante 15 días, por triplicado, y como control positivo, se utilizó aminoguanidina.

La formación de AGEs se evaluó por fluorescencia (excitación con longitud de onda de 370 nm y de emisión de longitud de onda de 440 nm).

El porcentaje de inhibición se determinó de la manera siguiente:

$$\text{Porcentaje de inhibición de AGEs} = \frac{\text{Fluorescencia del problema}}{1 - \text{Fluorescencia del control}} \times 100$$

VII.8.1. Determinación de la actividad Amadorin

La actividad Amadorin se determinó usando la prueba de Amadori (Liu y Gu, 2012). La lisozima (10 mg / ml) se incubó con ribosa 0.5 M en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4, el cual contenía 3 mM de azida sódica a 37 °C, en un periodo de

24 h. La ribosa que no reaccionó se eliminó mediante diálisis en de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M a un pH de 7.4 a 4 °C durante 48 h, realizando de 5 a 6 cambios. Después de la diálisis, la concentración de proteína se determinó utilizando el kit Bio-Rad (Bradford, 1976). A su vez, la ribosa-lisozima (10 mg / ml) se incubó con 10 mg / ml del compuesto aislado y aminoguanidina en un amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.4, que contenía 3 mM de azida sódica a 37 °C, en una incubación que tomó 15 días.

VII.8.2. Prueba del Metilgloxal-BSA

Esta prueba fue modificada con base en el método descrito por Peng y otros (2008). Esta prueba evalúa la etapa media de la glicación de proteínas. La albumina sérica bovina (BSA) y el metilgloxal se disolvieron en un amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 7.4) a una concentración de 20 mg / ml y 60 mM, respectivamente. El compuesto obtenido mediante cromatografía en columna se disolvió en el mismo amortiguador de fosfatos. Un mililitro de la solución de BSA se mezcló con 1 ml de solución de metilgloxal y 1 ml del compuesto. La mezcla se incubó a 37 °C. Se utilizó azida sódica (0.2 g / l) como conservador, y el amortiguador de fosfatos se utilizó como blanco. Se utilizaron como controles positivos aminoguanidina y fluoroglucinol. Después de siete días de incubación, la fluorescencia de las muestras se midió utilizando una excitación a 340 nm y una emisión de 420 nm. El porcentaje de inhibición de AGEs se calculó de la siguiente manera:

Porcentaje de inhibición:

$$[1 - (\text{fluorescencia de la muestra}) / (\text{fluorescencia del control})] \times 100.$$

VII.9. Purificación mediante biofraccionamiento

VII.9.1. Columnas cromatográficas

Para realizar el biofraccionamiento se utilizaron columnas para cromatografía de diferentes dimensiones, las cuales fueron empacadas con sílica gel. Asimismo, se emplearon columnas de vidrio empacadas con Sephadex LH-20.

VII.9.2. Búsqueda de eluyentes para realizar el biofraccionamiento

El eluyente utilizado en el biofraccionamiento debe permitir una buena separación. Por ello, se tomó una pequeña muestra de la fracción problema, se disolvió y se realizaron diferentes cromatografías en capa fina, utilizando distintos eluyentes; posteriormente, las placas cromatográficas se revelaron en yodo y, finalmente, se observaron bajo luz UV, con la finalidad de observar la separación que éstas presentaban con cada uno de los eluyentes utilizados, y así elegir el que presentó una mejor separación (Figura 5).

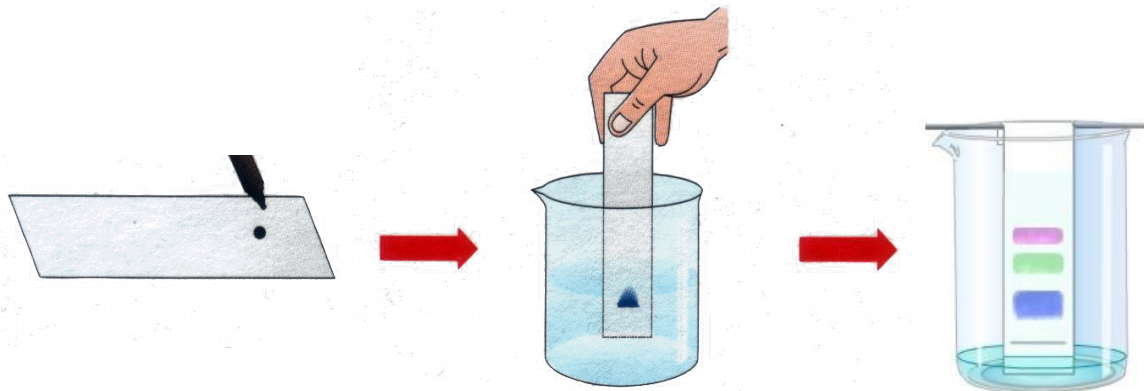


Figura 5. Cromatografía en placa fina.

VII.9.3. Obtención de las fracciones mediante biofraccionamiento

Una vez colocada la muestra en la columna empacada con sílica gel, se agregó el eluyente seleccionado para realizar el biofraccionamiento, tomando alícuotas de 20 o 100 ml, dependiendo el tamaño de la columna y obteniendo así “n” alícuotas (Figura 6). Posteriormente, se realizaron diferentes cromatografías en capa fina de cada una de las alícuotas obtenidas, con la finalidad de determinar si las fracciones obtenidas eran iguales o diferentes.

Fracciones

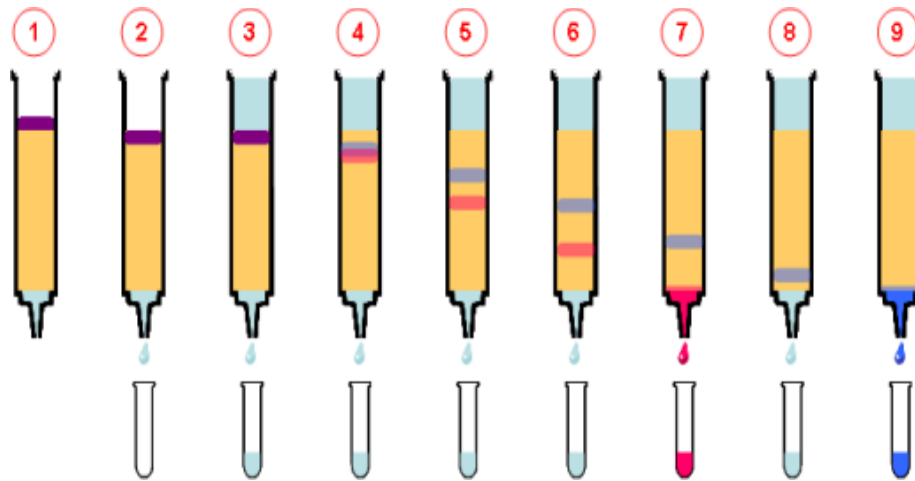


Figura 6. Ejemplificación de la obtención de las fracciones mediante biofraccionamiento.

VII.10. Análisis por electroforesis capilar de tres especies de *Byrsonima*

La determinación de los flavonoides de *B. crassifolia* se llevó a cabo mediante electroforesis capilar Beckman PACE / MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EE. UU.). El equipo de electroforesis capilar se armó con una columna de diodos de detección (DAD) a 214 nm y un dispositivo de control de temperatura fijado en 25 °C. El *software* 32 Karat TM v 7.0 se utilizó para la integración de los picos y el análisis de los datos. Las muestras se introdujeron en el capilar a través de un inyector hidrodinámico y mediante la aplicación de 0.5 psi durante 10 s. Se utilizó una tensión constante de 15 kV. Estas condiciones se utilizaron en todos los experimentos.

Para este análisis se usaron capilares sin recubrimiento de sílice fundida (PAC capilar tubo Beckman Coulter) con un diámetro interior de 75 μm y una longitud total de 60 cm.

Entre cada experimento el capilar se enjuagó durante dos minutos con 1 mol de NaOH, seguido de agua. El extracto se disolvió en metanol/agua (1:1 v/v) y se filtró (tamaño de poro 0.45 micras; Millipore).

La identificación en las muestras de apigenina, apigalacatequina y kaempferol se realizó mediante la comparación de sus tiempos de retención con los estándares, y por comparación de sus espectros de UV-Vis.

VII.11. Determinación del contenido total de fenoles

El contenido total de fenoles de los extractos de metanol se realizó utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Sahgal y *col.*2009).

VIII. Análisis instrumentales

VIII.1. Espectroscopia por Infra Rojo

El equipo que se utilizó fue un equipo dual FT-NIR y FT-IR-MIR por Transformada de Fourier para el rango Infrarrojo medio y cercano (MIR y NIR) (FTIR Spectrum 400, PerkinElmer). Con un rango de 14.700 a 350 cm^{-1} . Las muestras se colocaron directamente en el equipo.

VIII.3. Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C

Los espectros de ^1H y ^{13}C se registraron a 300 (^1H , 300.08; ^{13}C , 75.46 MHz), utilizando cloroformo deuterado /dimetilsulfóxido perdeuterado ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$), como disolventes, y SiMe_4 como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ), se presentan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

VIII.4. Espectrometría de masas

El equipo utilizado dispone de fuente interface directa GC/MS y detección de iones negativos. Dispone además de un sistema de vacío con bombeo diferencial con bombas difusoras y válvulas de aislamiento. La introducción de la muestra se realizó a través de un cromatógrafo de gases modelo HP6890.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1. Electroforesis capilar

Se colectaron tres diferentes especies de *Byrsonima*: *Byrsonima crassifolia* (colectada en Cuautla, Morelos), *B. bucidaefolia* (colectada en Alarcón, Guerrero) y *B. bahiana* (colectada en Tlacomulco, Estado de México). Posteriormente los extractos metanólicos de la fruta y la semilla se analizaron mediante electroforesis capilar con el fin de determinar su composición química.

El diámetro del fruto varió de 0.7 a 1.5 cm, mientras que el contenido de polifenoles totales determinado por el método de Folin-Ciocalteu I fue de 0.037 a 0.048 mg equivalentes de ácido gálico (GAE) / g en las frutas, y de 0.046 a 0.068 mg de GAE / g p en las semillas.

A los diferentes extractos se les realizaron una serie de experimentos preliminares, empleando electroforesis capilar con el fin de establecer las condiciones óptimas para el análisis de apigenina, kaempferol y apigalacatequina (Figura 7). Se observó presencia de kaempferol, en los extractos metanólicos de la fruta y la semilla de *Byrsonima crassifolia* (NFC, NSC); la fruta de *B. bucidaefolia* (NFG); y en la semilla de *B. bahiana* (NST).

La presencia de apigenina se detectó en los extractos metanólicos de la semilla de *Byrsonima crassifolia* (NSC), y la fruta de *B. bucidaefolia* (NFG). También se detectó epigalacatequina en los extractos metanólicos de las semillas de *B. bucidaefolia* (NSG), y en las semillas de *B. bahiana* (NST) (Figura 7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

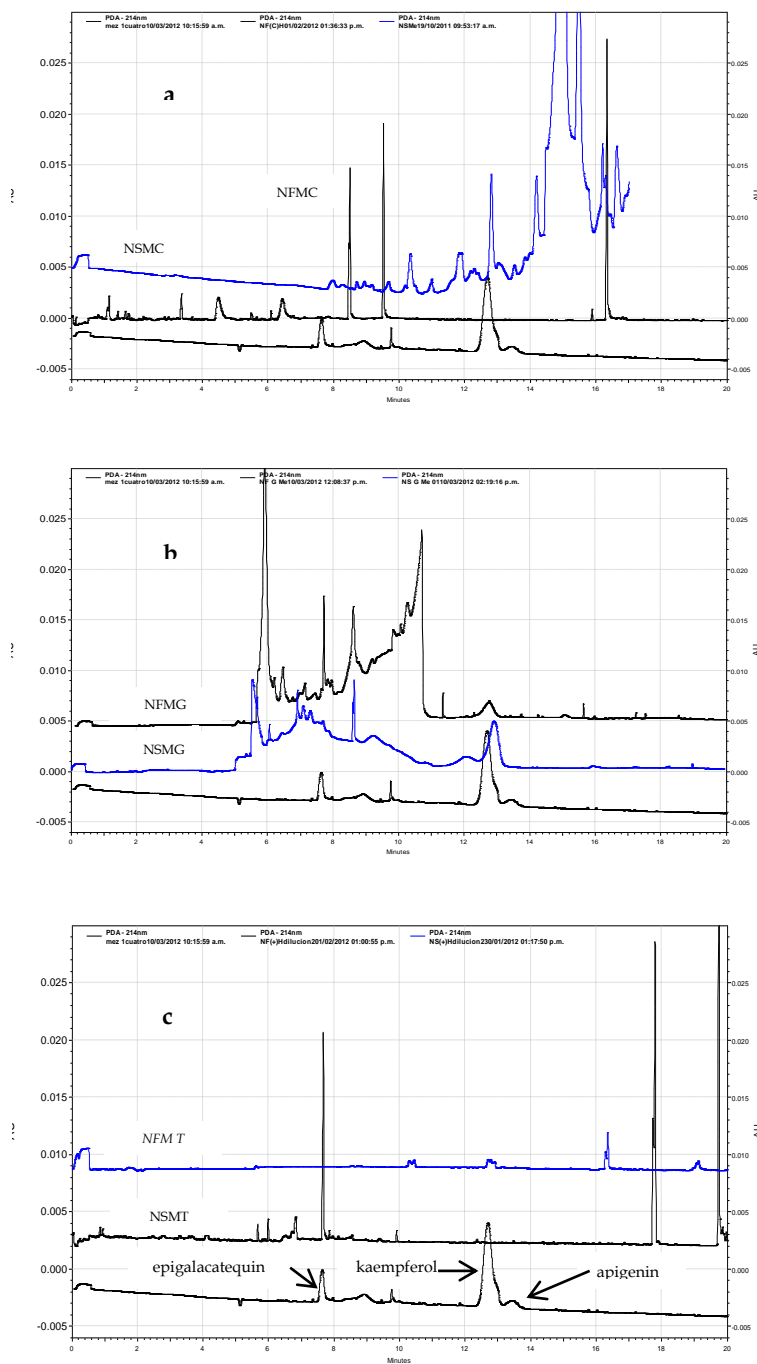


Figura 7. Análisis mediante electroforesis capilar; los flavonoides se registraron a 214 nm. Epigalacatequina ($Tr = 7,16 \pm 0,15$ min), kaempferol ($Tr = 12,32 \pm 0,64$ min), apigenina ($Tr = 11,37 \pm 0,52$ min).

VIII.2. Fenoles totales

En la Tabla 10 se muestra el contenido de fenoles totales (FT). El extracto de metanol de las frutas mostró poco contenido de fenoles, los cuales se expresaron en equivalentes de ácido gálico (GAE) ($0.481 \pm 0,66$ a $0,372 \pm 0.091$ mg GAE / g), si se comparan estos resultados con los de otros frutos ricos en estos compuestos. También, se puede observar que el extracto de metanol de las semillas presenta bajos contenidos de FT con valores de 0.683 ± 0.007 a 0.468 ± 0.025 mg GAE / g extracto. Por lo anterior, el contenido de compuestos fenólicos no mostró diferencias significativas cuando se les comparó con los frutos y las semillas de tres especies diferentes de *Byrsonimas*.

Tabla 10. Concentración de fenoles totales (FT) de tres especies diferentes de *Byrsonima*

| Muestra | FT (mg GAE/g extracto) |
|--|------------------------------|
| Extracto de la fruta colectada en Guerrero (NFG) | 0.481 ± 0.66 |
| Extracto de la semilla colectada en Guerrero (NSG) | 0.516 ± 0.033 |
| Extracto de la fruta colectada en Estado de México (NFT) | 0.430 ± 0.012 |
| Extracto de la semilla colectada en Estado de México (NST) | 0.683 ± 0.007 |
| Extracto de la fruta colectada en Morelos (NFC) | 0.372 ± 0.091 |
| Extracto de la semilla colectada en Morelos (NSC) | 0.468 ± 0.025 |

Nota: los resultados se muestran como las medias de los datos.

VIII.3. Efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas, del extracto de hexano de diferentes especies de nanche

La Tabla 11 presenta el efecto de los extractos de hexano de *B. crassifolia*, *B. bucidaefolia* y *B. bahiana* sobre los niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) a diferentes intervalos de tiempo. La administración del extracto de hexano de los frutos de *B. crassifolia* (NFHC) a dosis de 250 mg / kg, así como la tolbutamida (40 mg / kg) y la glibenclamida (4.0 mg / kg), disminuyeron significativamente la glucosa en sangre en ratas diabéticas. Después de seis horas de haber sido suministrados los diferentes tratamientos, el porcentaje de reducción de la glucosa fue de 45, 40.2 y 35.3%, respectivamente. Por otro lado, el extracto de hexano del fruto de *B. Bucidaefolia* y el de *B. bahiana* en las mismas dosis, no produjeron ningún efecto hipoglucemiante. A su vez, el porcentaje máximo de reducción de glucosa en sangre en ratas diabéticas después de seis horas a dosis de 250 mg/kg de los extractos de hexano de las semillas de las tres especies (NSHT, NSHG y la NSHC), fue de 22, 34 y 45%, respectivamente. Por lo que el extracto de hexano de la fruta y la semilla de *B. crassifolia* fue más eficaz como hipoglucemiante en comparación con las otras dos especies de *Byrsonima* analizadas (*B. bucidaefolia* y *B. bahiana*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11. Efecto en los niveles de glucosa en sangre de los extractos de hexano de diferentes variedades de *Byrsonima*

| Niveles de glucosa en sangre (mg/dl) a diferentes intervalos de tiempo (horas) | | | | | | | |
|--|-------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Grupo | Sitios de colecta | 0 h | 2 h | 4 h | 6 h | 8 h | 12 h |
| Control normal | - | 101.28 ± 1.34 | 100.5 ± 0.95 | 100.34 ± 1.38 | 103.02 ± 0.98 | 99.19 ± 1.75 | 100.21 ± 0.85 |
| Control diabético | - | 373.49 ± 3.67 | 368.92 ± 4.17 | 358.08 ± 4.10 | 356.05 ± 5.16 | 351.91 ± 4.47 | 349.78 ± 5.33 |
| Diabético + NFH | T | 355.17 ± 3.28 | 354.43 ± 4.38 | 356.67 ± 4.80 | 357.12 ± 3.55 | 358.08 ± 2.76 | 359.34 ± 2.56 |
| | G | 370.25 ± 2.87 | 371.45 ± 3.43 | 369.68 ± 2.68 | 370.81 ± 5.89 | 375.47 ± 3.49 | 373.59 ± 4.24 |
| | C | 374.13 ± 4.23 | 302.28 ± 5.17 ^b | 212.48 ± 3.36 ^b | 186.03 ± 4.19 ^b | 214.38 ± 1.87 ^b | 240.36 ± 3.98 ^b |
| Diabético + NSH | T | 350.16 ± 4.19 ^a | 335.13 ± 4.46 ^a | 309.67 ± 4.75 ^a | 274.31 ± 4.36 ^a | 296.15 ± 4.29 ^a | 308.24 ± 3.19 ^a |
| | G | 343.69 ± 3.81 ^a | 327.62 ± 2.98 ^b | 239.38 ± 2.58 ^c | 228.19 ± 4.21 ^b | 234.29 ± 1.39 ^c | 251.25 ± 4.12 ^b |
| | C | 307.49 ± 2.80 ^a | 285.39 ± 5.53 ^b | 218.71 ± 2.52 ^a | 169.20 ± 2.34 ^c | 186.90 ± 1.78 ^a | 217.76 ± 3.57 ^b |
| Diabético +TB (40 mg/kg) | 40 | 329.73 ± 5.72 ^a | 234.10 ± 6.36 ^c | 182.35 ± 4.23 ^a | 197.31 ± 2.09 ^c | 221.54 ± 2.19 ^a | 253.75 ± 5.26 ^b |
| Diabético + GB (4 mg/kg) | 4.0 | 335.90 ± 4.29 ^a | 273.46 ± 2.87 ^c | 231.70 ± 3.69 ^a | 217.19 ± 4.04 ^c | 198.52 ± 2.29 ^a | 114.67 ± 1.83 ^b |

Las medias y los errores estándar de las medias fueron calculados para grupos de seis ratones. Las columnas con subíndices indican que existe diferencia significativa entre sí (a, b, c) $p > 0.05$. Los datos que tienen el mismo subíndice no mostraron diferencias significativas entre sí $p > 0.05$. (TB): Tolbutamina, (GB): Glibenclamida. Los sitios de recolección se abreviaron como: (T): Tlacomulco, Estado de México, (G): Cuautla, Guerrero, (C): Cuautla, Morelos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar la actividad cicatrizante de los extractos de hexano de diferentes especies de *Byrsonima* en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, se observó que la aplicación tópica de los extractos NFHT, , NFHG y NSHG, aceleró el proceso de cicatrización, observándose el cierre completo de la herida en el día 12 en comparación con el control diabético el cual en el mismo intervalo de tiempo solamente había cerrado la herida un 70%. Además al observar el grupo tratado con nitrofurazona (NT), al día doce se observó un cierre de la herida del 90% (Tabla 12 y Figura 8) Por lo anterior, el extracto de hexano aceleró la cicatrización de la herida y el tiempo de epitelización (Wang y Li, 2009).

Tabla 12. Efecto del extracto de hexano de la fruta y la semilla de tres especies de *Byrsonima* en la cicatrización de heridas en ratas tópicamente tratadas durante 14 días.

| Días | Cierre de la herida (mm ²) | | | | | | | | |
|------|--|-------------------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|
| | Control normal | Control diabético | NT | NFHT | NSHT | NFHG | NSHG | NFHC | NSHC |
| 3 | 130.6 ± | 59.7 ± | 165.4 ± | 130.6 ± | 130.0 | 120.8 ± | 140.8 ± | 150.2 ± | 147.8 ± |
| | 2.14 | 7.18 | 5.15 | 4.87 | ± 1.18 | 4.85 | 4.25 | 7.21 | 2.54 |
| | (48%) | (22%) | (51%) | (48%) | (48%) | (45%) | (52%) | (55%) | (55%) |
| 5 | 138.6 ± | 75.1 ± | 168.2 ± | 160.0 ± | 144.5 | 135.2 ± | 153.2 ± | 193.6 ± | 166.2 ± |
| | 4.66 | 3.46 | 1.45 | 5.41 | ± 4.58 | 5.01 | 5.85 | 5.46 | 7.54 |
| | (51%) | (28%) | (63%) | (59%) | (53%) | (50%) | (57%) | (72%) | (61.5%) |
| 7 | 144.4 ± | 115.8 ± | 204.0 ± | 220.5 ± | 218.1 | 259.5 ± | 242.7 ± | 234.1 ± | 190.5 ± |
| | 3.70 | 2.87 | 4.65 | 2.14 | ± 7.58 | 7.12 | 3.06 | 3.04 | 2.44 |
| | (53%) | (43%) | (75%) | (59%) | (81%) | (96%) | (90%) | (87%) | (70.5%) |
| 9 | 158.0 ± | 156.5 ± | 215.5 ± | 242.7 ± | 222.4 | 266.5 ± | 264.5 ± | 258.2 ± | 220.5 ± |
| | 3.25 | 5.64 | 4.96 | 6.41 | ± 4.96 | 5.07 | 7.41 | 1.07 | 6.35 |
| | (55%) | (58%) | (80%) | (91%) | (82%) | (99%) | (98%) | (95%) | (82%) |
| 12 | 182.0 ± | 190.3± | 248.2± | 270.0± | 260.7 | 270.0 ± | 270.0 ± | 262.6 ± | 260.0 ± |
| | 5.41 | 4.57 | 3.16 | 1.28 | ± 3.25 | 4.15 | 3.07 | 5.06 | 2.44 |
| | (67%) | (70%) | (90%) | (100%) | (96%) | (100%) | (100%) | (97%) | (96%) |
| 14 | 242.4 ± | 234.2± | 270.0± | - | - | - | - | 270.0 ± | 270 ± |
| | 8.63 | 4.12 | 5.22 | | | | | 6.08 | 2.41 |
| | (90%) | (86%) | (100%) | | | | | (100%) | (100%) |

Área de la herida original 270 mm². Las medias y los errores estándar de las medias fueron calculados para grupos de n = 6 animales en cada grupo. Se utilizó una p <0.05 en comparación con el grupo control. () Porcentaje de cierre de la herida, el cual se calculó respecto al área de la herida al día cero. (NT): Nitrofurazona utilizada como control positivo. Los extractos de hexano de las diferentes variedades de *Byrsonima* se abrevian como: NFHT y NSHT: fruta y semilla de *B. bahiana* (Tlacomulco, Estado de México) respectivamente, NFHG y NSHG: fruta y semilla *B. bucidaeifolia* (Alarcón, Guerrero) respectivamente, NFHC y NSHC: fruta y semilla de *B. crassifolia* (Cuautla, Morelos), respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

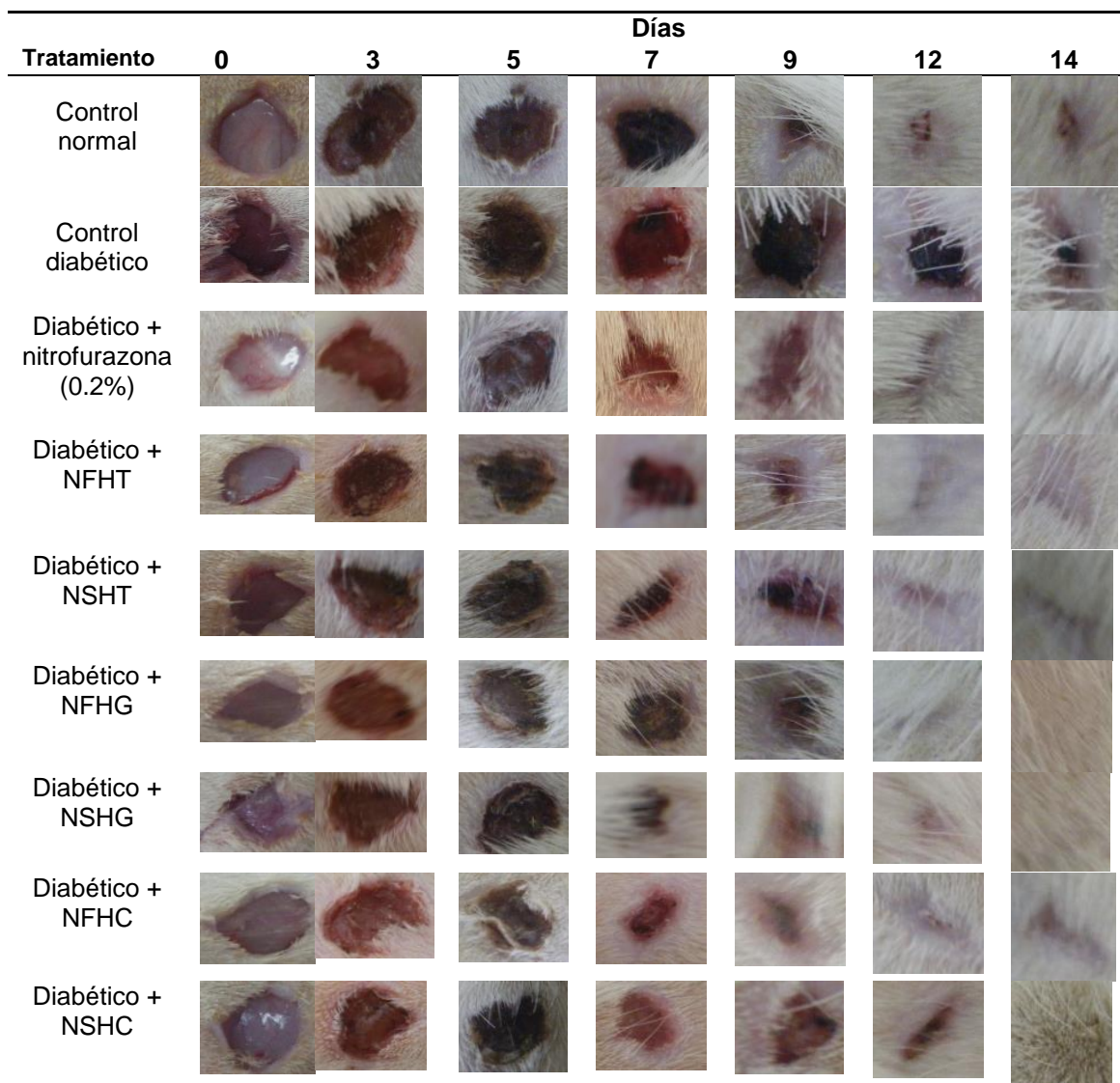


Figura 8. Efecto del extracto de hexano de la fruta y la semilla de tres especies de *Byrsonima* en la cicatrización de heridas en ratas tópicamente tratadas.

Los extractos de hexano de las diferentes variedades de *Byrsonima* se abrevian como: NFHT y NSHT: fruta y semilla de *B. bahiana* (Tlacomulco, Estado de México), respectivamente: NFHG y NSHG: fruta y semilla *B. bucidaefolia* (Alarcón, Guerrero), respectivamente: NFHC y NSHC: fruta y semilla de *B. crassifolia* (Cuautla, Morelos), respectivamente.

VIII.4. Actividad antiinflamatoria del extracto de hexano de *Byrsonima crassifolia*

VIII.4.1. Edema inducido con formaldehído

El extracto de hexano de la semilla de *B. Crassifolia*, administrado por vía oral durante seis días, en dosis de 50, 100 y 200 mg / kg, disminuyó el edema inducido por formaldehído en 35, 46 y 66%, respectivamente. La administración de 10 mg / kg de indometacina produjo una disminución en el edema de 73% (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto del extracto de hexano de la semilla en el edema inducido con formaldehído en pata de rata.

| Valores medios de los volúmenes de las patas | | | | |
|--|---------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| Tratamiento | Dosis (mg/kg) | Antes de la inflamación | Después de la inflamación (6 días) | Efecto anti-inflamatorio (%) |
| Control | - | 0.89±0.65 | 1.64±2.34 | - |
| | 50 | 0.86±0.38 | 1.42±1.38 ^a | 35 |
| NSH | 100 | 0.88±0.57 | 1.34±1.45 ^a | 46 |
| | 200 | 0.89±0.73 | 1.19±1.32 ^a | 66 |
| Indometacina | 10 | 0.90±0.19 | 1.14±1.63 ^a | 73 |

Las medias y los errores estándar de las medias fueron calculados para grupos de seis ratas. NSH: extracto de hexano de la semilla. ^ap<0.005, comparado con el control.

El edema en pata inducido con formaldehído es uno de los métodos de ensayo más usados para la evaluación de agentes antiinflamatorios (Morris, 2003). La histamina, serotonina, prostaglandina, bradiquinina y la sustancia P juegan papeles en el edema inducido con formaldehído (Figura 9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

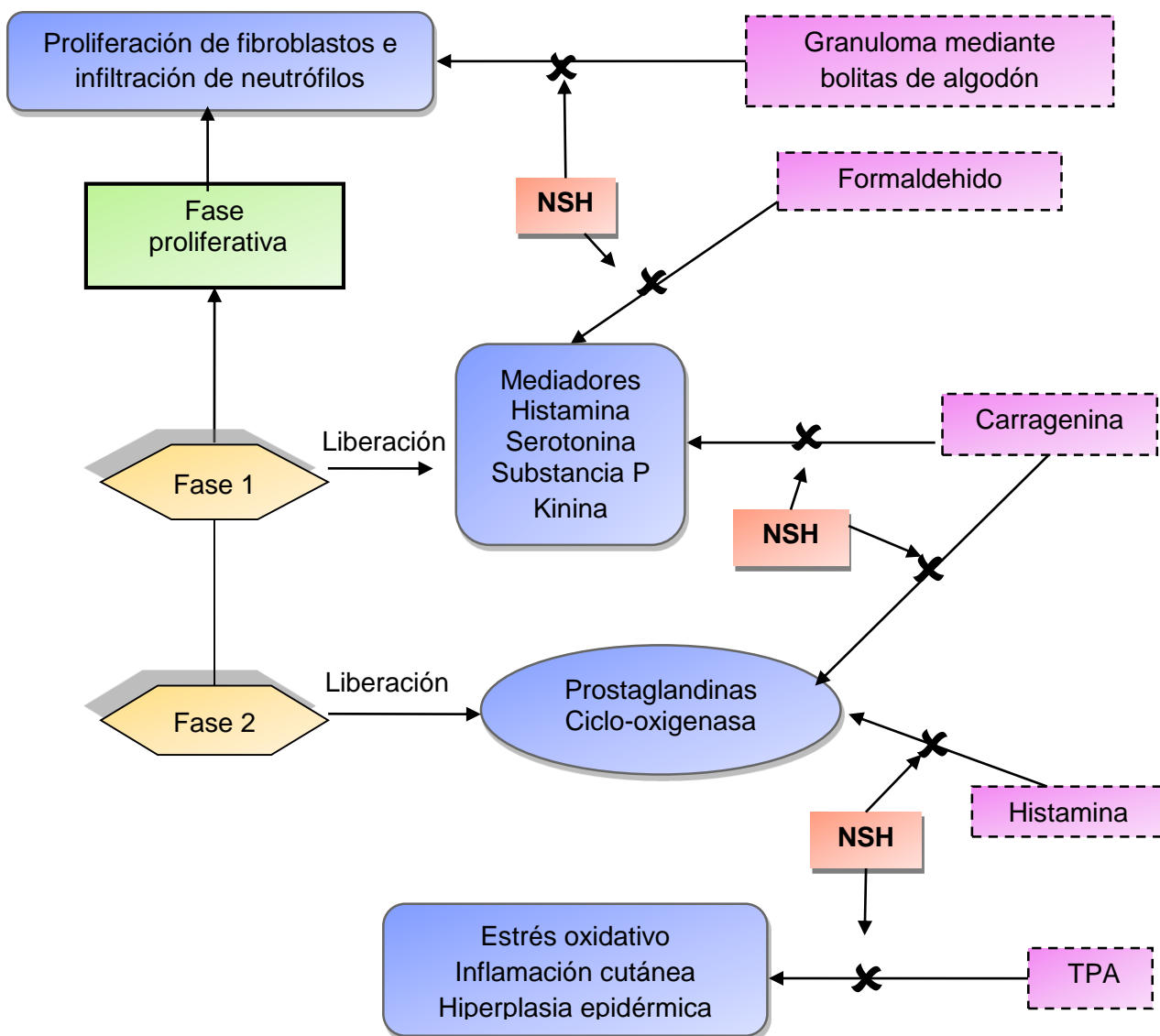


Figura 9. Mecanismo de acción propuesto del extracto de hexano de la semilla (NSH) de *B. crassifolia* en el proceso inflamatorio.

La inflamación inducida con formaldehído implica, generalmente, dos fases distintas; los investigadores sugieren que la primera de éstas se refiere a la estimulación directa de los nociceptores y la segunda puede estar asociada con la actividad de mediadores de la inflamación (Gepdiremen y col. 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunos estudios han demostrado que el receptor antagonista llamado sustancia-P puede disminuir la progresión de la segunda fase de la inflamación inducida con formaldehído.

El edema inducido con formaldehído se hace evidente después de un corto periodo, da síntomas de inflamación aguda (tumor, enrojecimiento y color) y alcanza su máximo en un tiempo que va de 3 a 6 horas.

Debido a que el extracto de hexano de la fruta de *B. crassifolia* presentó menor actividad anti-inflamatoria respecto al extracto de hexano de la semilla, en este estudio no se presentan los resultados de la actividad anti-inflamatoria de la fruta.

VIII.4.2. Efecto del extracto de hexano de las semillas (NSH) de *B. crassifolia* en la inflamación inducida con carragenina

Al suministrar el NSH en una dosis de 200 mg / kg se observó un incremento en el edema de 24% después de transcurridas 6 horas de su suministro, en comparación con el grupo control, el cual presentó un incremento de 35% en el mismo periodo (Tabla 14). Transcurridas 6 horas, el grupo tratado con indometacina (fármaco de referencia) mostró un incremento de 21% en el edema.

Tabla 14. Efecto del extracto de hexano de las semillas de *B. crassifolia* en la inflamación inducida con carragenina.

| Incremento en el tamaño del edema (%) | | | | |
|---------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Dosis (mg/kg) | 0.5 h | 2 h | 4 h | 6 h |
| Control | 13 ± 0.16 | 19 ± 0.21 | 29 ± 1.50 | 35 ± 1.45 |
| 50 | 11 ± 0.89 ^a | 16 ± 1.34 ^a | 23 ± 1.96 ^a | 29 ± 1.57 ^a |
| 100 | 10 ± 1.54 ^a | 15 ± 2.46 ^a | 20 ± 2.01 ^a | 27 ± 2.25 ^a |
| 200 | 9 ± 3.76 ^a | 13 ± 0.72 ^a | 19 ± 2.84 ^a | 24 ± 3.71 ^a |
| Indometacina (10 mg/kg) | 8 ± 3.51 ^a | 11 ± 2.68 ^a | 17 ± 2.43 ^a | 21 ± 3.65 ^a |

Los resultados se expresan durante el periodo comprendido entre 30 min a 6 h después de la inyección de carragenina. Las medias y los errores estándar de las medias fueron calculados para grupos de seis ratas, con una $p < 0.01$ cuando se comparan con los el grupo control.

Los investigadores han utilizado ampliamente inducir el edema con carragenina en las patas traseras de las ratas, con el fin de evaluar nuevos fármacos (Perianayagam y col.2006). La inyección intraplantar de carragenina en ratas conduce a un edema de la pata en dos fases (véase Figura 9).

La primera fase se produce dentro de la primera hora después de la inyección, y es el resultado de la liberación de histamina, serotonina y quininas; la segunda fase se asocia con una elevada producción de prostaglandinas, radicales libres de oxígeno, ciclo-oxigenasa (COX-2) y la activación de neutrófilos (Swingle y Shideman, 1972; Gay y col.1993).

Las prostaglandinas desempeñan un papel importante en el desarrollo de la segunda fase, la cual ocurre generalmente después de tres horas.

A su vez, el aumento en el tamaño de la pata pone de manifiesto la respuesta inflamatoria (Morris, 2003). Por su parte, el extracto de hexano de las semillas de *B. crassifolia* disminuyó significativamente el tamaño del edema durante las cuatro primeras horas después del tratamiento, en comparación con las ratas control.

El extracto probablemente disminuyó el edema de la pata actuando en ambas fases de la inflamación inducida por carragenina, y se observó un efecto similar al de la indometacina. Así, en la fase aguda de la inflamación el extracto NSH puede inhibir la síntesis o liberación de los principales mediadores como la histamina, serotonina u otros mediadores proinflamatorios, que normalmente aparecen en la fase temprana de la inflamación (Figura 9). Además, el efecto en la segunda fase de inflamación puede deberse a la inhibición de la COX-2, que conduce a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

VIII.4.3. Edema inducido en pata de rata con histamina

En este estudio se evaluó la actividad antiinflamatoria del NSH frente a la histamina. La Tabla 15 muestra que el edema en la pata de las ratas alcanzó su máximo a las dos horas de haber sido aplicada la inyección de histamina; a su vez, al transcurrir tres horas, se observó una disminución en el edema.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 15. Efecto antiinflamatorio del extracto de hexano de las semillas de *B. crassifolia* en edema inducido en pata de rata con histamina.

| Tratamiento | Dosis (mg/kg) | Incremento en el edema (%) | | |
|-------------------------------|------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| | | 1h Media ± SEM | 2h Media ± SEM | 3h Media ± SEM |
| Control | - | 46±2.78 | 70±6.43 | 66±5.72 |
| | 50 | 33±5.15 ^b | 27±3.69 ^b | 23±1.27 ^b |
| NSH | 100 | 28±3.46 | 22±3.54 ^b | 19±2.89 ^b |
| | 200 | 24±3.38 ^b | 19±2.70 ^b | 11±2.23 ^b |
| Diclofenaco sódico | 10 | 17±4.12 | 14±2.89 ^b | 9±3.62 ^b |

^a Los resultados se expresaron como el porcentaje en el incremento del edema antes y después de suministrar el tratamiento. Los resultados se expresaron en un periodo de 1 a 3 horas después de la inyección con histamina. Las medias y los errores estándar de las medias fueron calculados para grupos de seis ratas.

^b p<0.01 cuando se compararon con el control tratado con agua.

Al administrar el extracto de hexano de la semilla en dosis diferentes (50, 100 y 200 mg/kg), se observó una inhibición significativa en el edema transcurridas 1, 2 y 3 horas a partir de la inyección. Estos datos indican que el efecto antiinflamatorio de NSH es dependiente del tiempo y la dosis suministrada.

El NSH mostró una significativa inhibición del edema en la etapa temprana de la inflamación (una hora después de la inyección de histamina). Sin embargo, en la fase tardía (dos horas después de aplicada ésta) el NSH disminuyó su efecto. Una hora después de la inyección de histamina el diclofenaco sódico causó una inhibición significativa del edema.

La histamina es probablemente uno de los mediadores más importantes de la inflamación, ya que ésta puede aumentar la permeabilidad vascular y actuar con las prostaglandinas para inducir edema (Figura 9). Tubaro y col. (1985), así como Silva y col. (2007) proponen que las prostaglandinas actúan a través de receptores específicos en la vascularización para inducir la salida de plasma (Greenwald, 1991). El extracto de hexano de la semilla de *B. crassifolia* y el diclofenaco utilizado como fármaco de referencia disminuyeron, de manera significativa, la inflamación una hora después de la inyección con histamina.

VIII.4.4. Efecto del extracto de hexano de la semilla de *B. crassifolia* en el edema inducido con tetradecanoilforbol (TPA)

Para realizar esta prueba se utilizó TPA para inducir un edema en la oreja del ratón y así poder evaluar la actividad antiinflamatoria del NSH. El éster de forbol (TPA) ocasiona una inflamación en la piel, por lo que esta prueba es adecuada para la evaluación de tópicos y agentes sistémicos antiinflamatorios; a su vez, la prueba ha sido ampliamente utilizada para determinar la actividad antiinflamatoria de un producto. En la Tabla 16 se puede observar que la aplicación tópica de NSH redujo significativamente la inflamación en 38, 51 y 62%, al administrar dosis de 0.125, 0.25 y 0.50 mg/oreja, respectivamente, en comparación con la dexametasona, la cual causó una reducción del edema del 80%, al administrar una dosis de (0.05 mg/oreja).

Tabla 16. Efecto del extracto de hexano de la semilla de *B. crassifolia* en el edema inducido en oreja, utilizando tetradecanoilforbol (TPA).

| Tratamiento | Dosis (mg/oreja) | Espesor de la oreja (mm) |
|--------------|------------------|---------------------------------|
| Control | - | 0.091±0.12 |
| NSH | 0.125 | 0.056±0.30 ^b (38) |
| NSH | 0.25 | 0.044±0.42 ^a (62) |
| NSH | 0.50 | 0.034±0.42 ^b (62) |
| Dexametasona | 0.05 mg/oreja | 0.072±0.98 ^a (80) |

Las medias y los errores estándar de las medias fueron calculados para grupos de seis ratones.
^ap<0.005, ^bp<0.001 comparado con el control. () Porcentaje de reducción del edema.

La aplicación tópica de TPA, es un modelo adecuado para seleccionar compuestos tópicos con potencial antiinflamatorio. Una sola aplicación de TPA induce estrés oxidativo, inflamación cutánea e hiperplasia epidérmica, debido a la proliferación de queratinocitos (Figura 9) (Perianayagam y col. 2006).

Los investigadores han utilizado esta prueba para identificar alérgenos potenciales, para lo cual, se basaron en el aumento del grosor de la oreja en los animales sensibilizados. La inhibición de esta reacción dérmica se puede expresar como la disminución del edema de la oreja o del grosor de la oreja, en comparación con un grupo control. La aplicación de NSH suprimió de manera marcada el engrosamiento de la oreja y la hiperplasia epidérmica. La dexametasona, un glucocorticoide agonista, presenta una acción antiinflamatoria que se cree implica a la fosfolipasa A2 y a lipocortinas, proteínas inhibitoras que controlan la biosíntesis de potentes mediadores de la inflamación tales como las prostaglandinas y los leucotrienos. La dexametasona no unida atraviesa las membranas celulares y se une por su alta afinidad a receptores citoplasmáticos específicos (Dunne, 1990).

VIII.4.5. Efecto antiinflamatorio de *B. crassifolia* (NSH) en la fase proliferativa de la inflamación en ratas

En este ensayo se calculó el efecto antiinflamatorio de la indometacina y del NSH en la fase proliferativa de la inflamación, mediante bolitas de algodón colocadas subcutáneamente en el lomo de ratas. El peso medio del algodón mojado extraído del grupo control fue de 205 mg \pm 30.3 mg. En contraste, los pesos medios del algodón húmedo en el grupo de ratas que recibieron 200 mg / kg de NSH y la indometacina fueron de 85 mg \pm 15.4 mg y 75 mg \pm 26 mg, respectivamente (Tabla 17). De acuerdo con los datos obtenidos, el efecto antiproliferativo del NSH y la indometacina fue de 57.7 y 62.7%, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 17. Efecto del NSH en la fase proliferativa de la inflamación en ratas, usando la prueba de bolitas de algodón.

| Tratamiento | Dosis (mg/kg) | Bolita húmeda (mg) | Efecto antiproliferativo (% peso húmedo) | Bolita seca (mg) | Efecto antiproliferativo (% peso seco) |
|--------------|---------------|--------------------|--|------------------|--|
| Control | - | 205 ± 30.3 | - | 51 ± 2.87 | - |
| NSH | 200 | 85 ± 15.4 | 57.7 | 21.3 ± 1.45 | 58.2 |
| Indometacina | 10 | 75 ± 26 | 62.7 | 22.4 ± 1.76 | 56 |

Las medias y los errores estándar de éstas fueron calculados para grupos de seis ratas.

El peso seco de las bolitas de algodón fue de 21.3 mg y 22.4 mg en los grupos de ratas tratadas con NSH e Indometacina, respectivamente. Al evaluar el peso seco de las bolitas, tanto el NSH como la indometacina inhibieron la inflamación en 58.2 y 56%, respectivamente.

El granuloma inflamatorio es una característica típica establecida de un proceso inflamatorio crónico (Figura 9). Cabe decir que los investigadores han empleado el granuloma con bolitas de algodón como un método para evaluar los componentes proliferativos de dicha inflamación.

Generalmente, los pesos secos de las bolitas de algodón se correlacionan bien con la cantidad de tejido granulomatoso (Tazaki y *col.* 2011). La administración del NSH disminuyó el peso seco de las bolitas de algodón implantadas en el lomo de las ratas, lo que indica que inhibe la fase proliferativa de la inflamación.

La inflamación crónica es una reacción que se produce cuando la respuesta a la inflamación aguda se muestra insuficiente para eliminar agentes proinflamatorios, e incluye la proliferación de fibroblastos, así como la infiltración de neutrófilos y exudación.

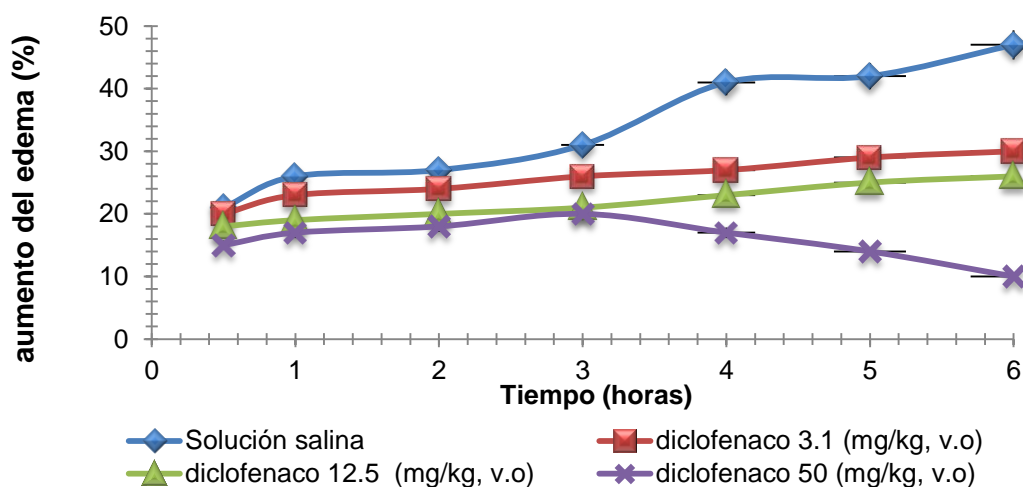
La inflamación crónica se produce a partir del desarrollo de células proliferativas. Éstas pueden ser, tanto de propagación del granuloma, como de formación de éste (Zhang y *col.* 2011).

El NSH fue más eficaz sobre la inflamación crónica en comparación con su resultado en la inflamación aguda. Por su parte, el suministro de NSH o de indometacina impidieron el crecimiento del tejido granulomatoso inducido por las bolitas de algodón. A su vez, la indometacina redujo el tejido granulomatoso a partir de la respuesta celular, inhibiendo la infiltración de granulocitos en el cuerpo extraño implantado (Fracasso y col.1996).

VIII.4.6. Efecto de la L-arginina y D-arginina en la acción antiinflamatoria de NSH, diclofenaco y L-NAME

La administración de la L-arginina se hizo dos horas antes de la hora pico de la inflamación en cada caso; las horas pico se determinaron utilizando los datos obtenidos de la prueba con carragenina.

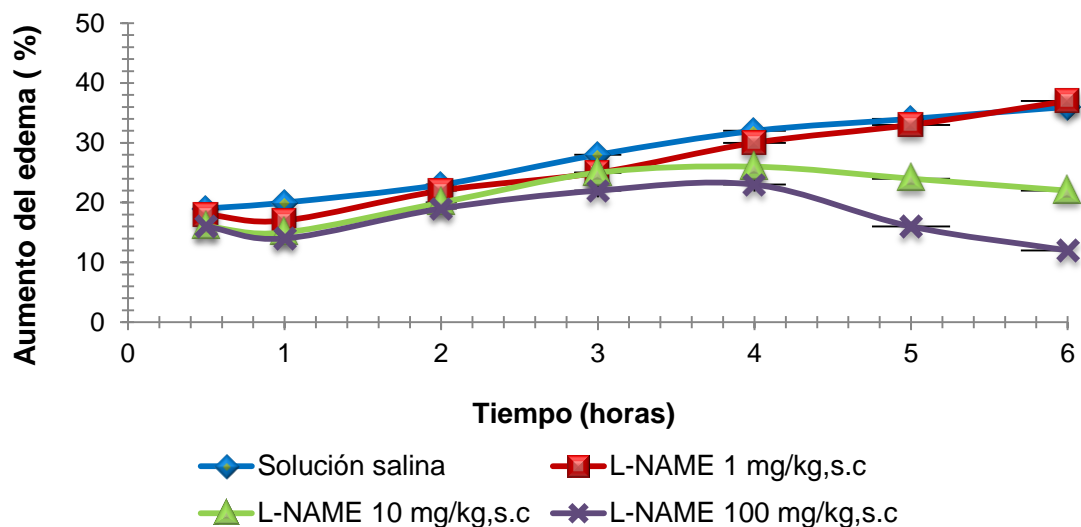
Las Figuras 10 y 11 muestran, respectivamente, el crecimiento del edema en pata de rata inducido por la inyección de carragenina, así como el efecto del diclofenaco (3.1-50 mg / kg, v.o.) y del metil éster de N-nitro-L-arginina (L-NAME) (1-100 mg / kg sc) en el proceso inflamatorio. En ambos casos, los fármacos se administraron 10 minutos antes de la inyección de carragenina.



Los resultados se expresan como porcentaje del aumento en el volumen de la pata antes y después de administrar el tratamiento $p < 0.01$.

Figura 10. Actividad antiinflamatoria del diclofenaco en edema en pata de rata inducido con carragenina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Los resultados se expresan como porcentaje del aumento en el volumen de la pata antes y después de administrar el tratamiento $p < 0.01$.

Figura 11. Efecto antiinflamatorio de L-NAME en edema en pata de ratona inducido con carragenina.

El óxido nítrico (NO) participa en las fases vasculares (vasodilatación) y celulares de la respuesta inflamatoria, donde el aminoácido L-arginina es el precursor de su síntesis. Esta reacción puede ser inhibida por derivados estructurales de la L-arginina como la N-mono-metil-L-arginina (L-NMMA) y el metilester de N-nitro-L-arginina (L-NAME), entre otros.

Debido a las características del NO, esta molécula no puede ser almacenada; por lo que la regulación de la enzima que cataliza su síntesis es muy importante: se conoce como sintasa del NO (NOS).

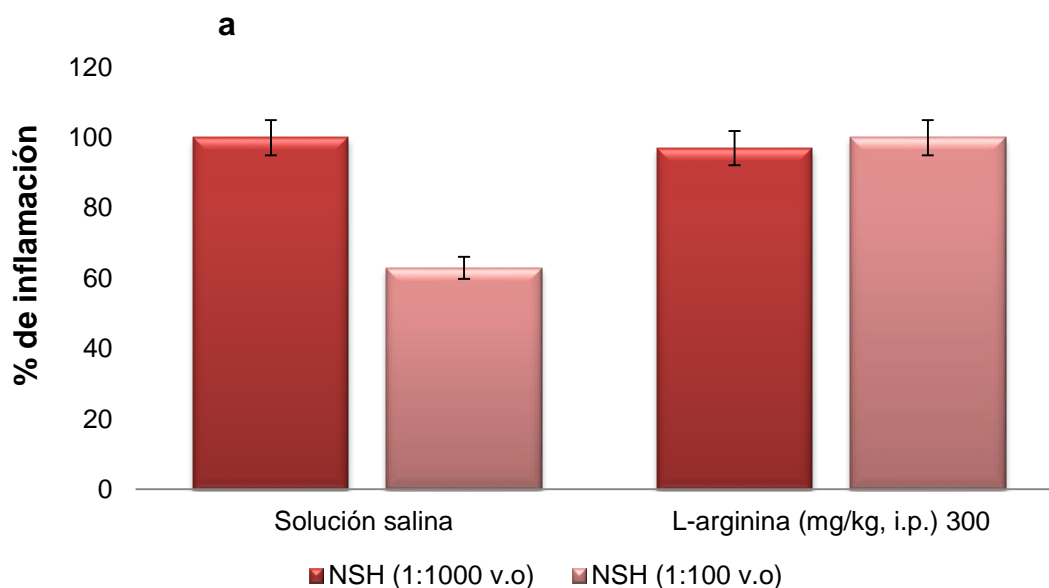
Hasta el momento se han identificado tres isoformas de la NOS: dos isoformas constitutivas (cNOS), ambas dependientes de calcio; la isoforma endotelial (eNOS), también conocida como tipo III (NOS3); y la isoforma neuronal (nNOS), también denominada tipo I (NOS1). Dichas isoformas median la producción de NO en cantidades bajas y fisiológicas, para actuar como señalizador molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

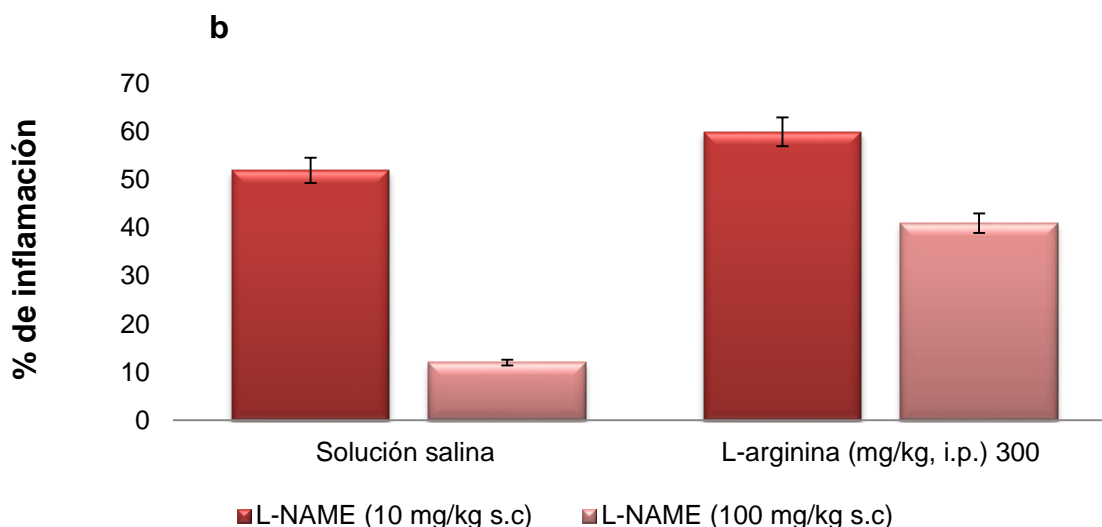
Por último, una forma inducible (iNOS), independiente de calcio, también denominada de tipo II (NOS2), cataliza la producción de gran cantidad de NO (Vasudevan y Parle, 2007), además de que muchas respuestas patológicas agudas y crónicas se asocian con un exceso en la producción de NO catalizado por la iNOS.

En las Figuras 10 y 11 se observa que la máxima disminución del edema en pata de rata fue seis horas después de haber suministrado el diclofenaco de forma oral a una dosis de 50 mg / kg y el L-NAME a una dosis de 100 mg / kg de forma subcutánea respectivamente. Lo cual nos indica que tanto el diclofenaco, un antiinflamatorio no esteroideo, y el L-NAME, inhibieron la producción de NOS, reduciendo las fases tempranas y tardías de la inflamación.

Las Figuras 12(a) y 12(b) muestra el efecto del NSH y el L-NAME sobre la L-arginina, al ser suministrados en ratas con edema inducido en pata por carragenina, respectivamente. La arginina fue suministrada intraperitonealmente 1 h después de la inyección con carragenina. El NSH y el L-NAME fueron administrados 10 minutos antes de la inyección de carragenina.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Los resultados se expresan como porcentaje del aumento en el volumen de la pata antes y después de suministrar el tratamiento $p < 0.01$.

Figura 12 (a) y (b). Efecto de NSH y L-NAME sobre la L-arginina en la inflamación inducida con carragenina.

En las Figuras 12(a) y 12(b) se observa que la L-arginina, un sustrato de la NOS, inhibió el efecto antiinflamatorio del NSH y L-NAME. Estos resultados sugieren que el mecanismo antiinflamatorio de NSH puede estar relacionado con la inhibición de iNOS (Silva y col.2003).

VIII.5. Biofraccionamiento y purificación del compuesto responsable de la actividad antiinflamatoria

Después de determinar la actividad antiinflamatoria del extracto crudo de hexano de la semilla de *Byrsonima crassifolia*, se procedió al biofraccionamiento para poder aislar el compuesto responsable de dicha actividad.

Para ello, el extracto de hexano de la semilla de *B. crassifolia* se colocó en una columna empacada con sílica gel de malla 70-230 y se eluyó con éter de petróleo: acetona: hexano (2:1:0.5), de donde se obtuvo una subfracción (NSH1), la cual resultó positiva al evaluar su actividad antiinflamatoria mediante la prueba de edema

inducido con TPA. El diagrama de aislamiento y purificación de las subfracciones con actividad antiinflamatoria se muestra en la Figura 13.

VIII.5.1. Biofraccionamiento de la subfracción NSH1

Esta subfracción se colocó en una columna empacada con sílica gel de malla 70-230 y se eluyó con éter etílico: cloroformo (1:5), de donde se obtuvieron dos subfracciones (NSH11 y NSH12), de las cuales únicamente la NSH11 resultó tener actividad antiinflamatoria.

VIII.5.2. Biofraccionamiento de la fracción NSH11

La subfracción NSH11 se colocó en una columna empacada con sílica gel y se eluyó con éter etílico: cloroformo (1:5), de donde se obtuvieron cinco subfracciones (NSH111- NSH115), y de las cuales únicamente NSH111 presentó actividad.

VIII.5.3. Biofraccionamiento de la fracción NSH111

La subfracción NSH111 fue colocada en una columna cromatográfica con Sephadex LH-20, eluyendo inicialmente con cloroformo:metanol y posteriormente, aumentando gradualmente la polaridad (10:1 a 5:1), de donde se obtuvieron cinco subfracciones (NSH1111- NSH1115), de las cuales únicamente resultó activa la NSH1114.

VIII.5.4. Biofraccionamiento de la fracción NSH1114

NSH1114 se purificó por cromatografía en columna con Sephadex LH-20, para lo cual se utilizó un sistema de gradientes cloroformo:metanol 10:1/5:1, y se separaron cuatro subfracciones (NSH11141-NSH11144), de las cuales NSH11142 presentó actividad antiinflamatoria.

VIII.5.5. Biofraccionamiento de la fracción NSH11142

Esta subfracción se colocó en un columna empacada con sílica gel y se eluyó con éter etílico:cloroformo (1:5), de la cual se obtuvieron tres subfracciones (NSH111421-NSH11143), resultando activas NSH111422 y NSH1114213. La subfracción NSH111422 se obtuvo en muy poca cantidad, por lo que la muestra resultó insuficiente para seguir purificándola.

VIII.5.6. Biofraccionamiento de la fracción NSH111423

NSH111423 fue finalmente purificada por cromatografía en columna con sílica gel, y se eluyó con éter de petróleo:hexano (2:05), para dar el compuesto 1 (90 mg).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

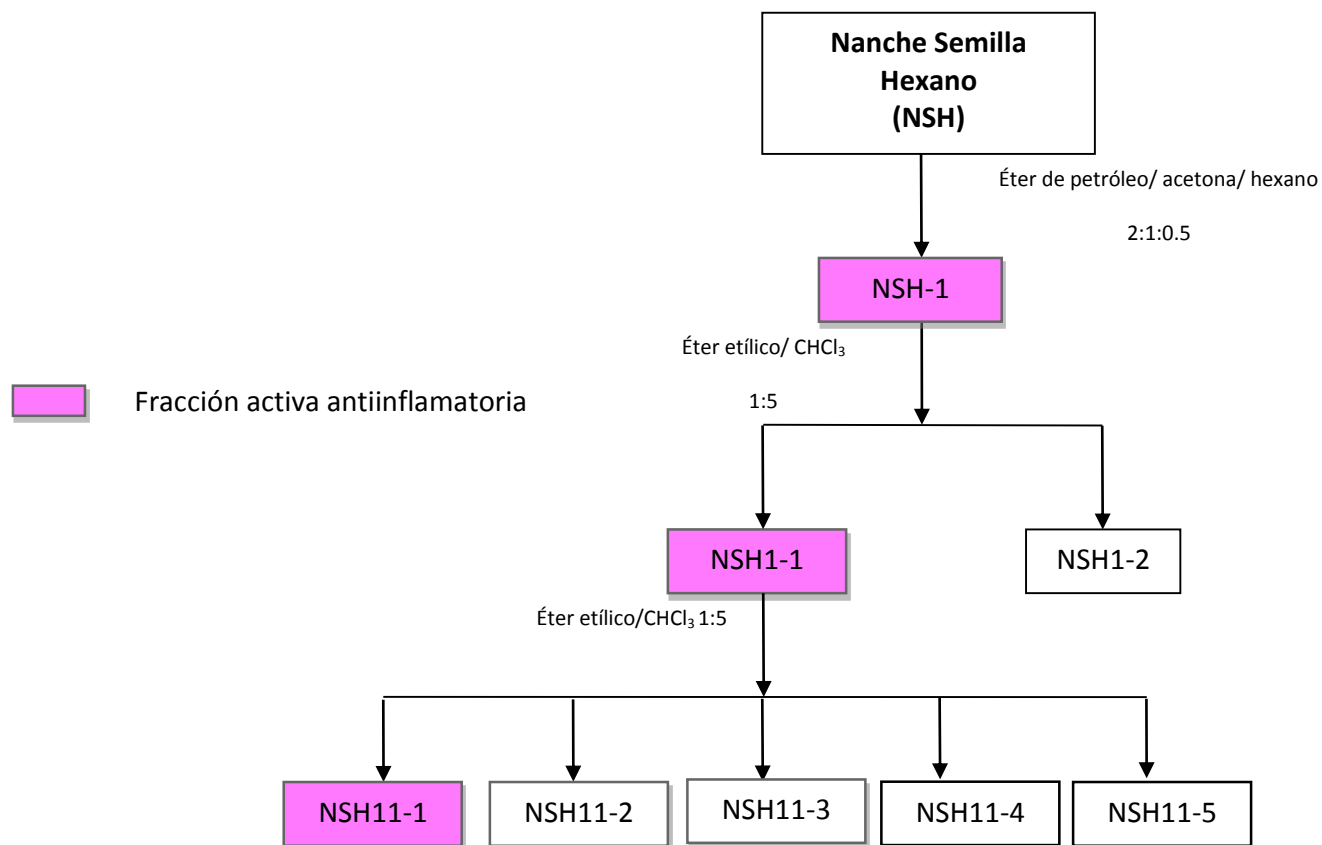


Figura 13. Diagrama del aislamiento y purificación de las subfracciones con actividad antiinflamatoria (continúa).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

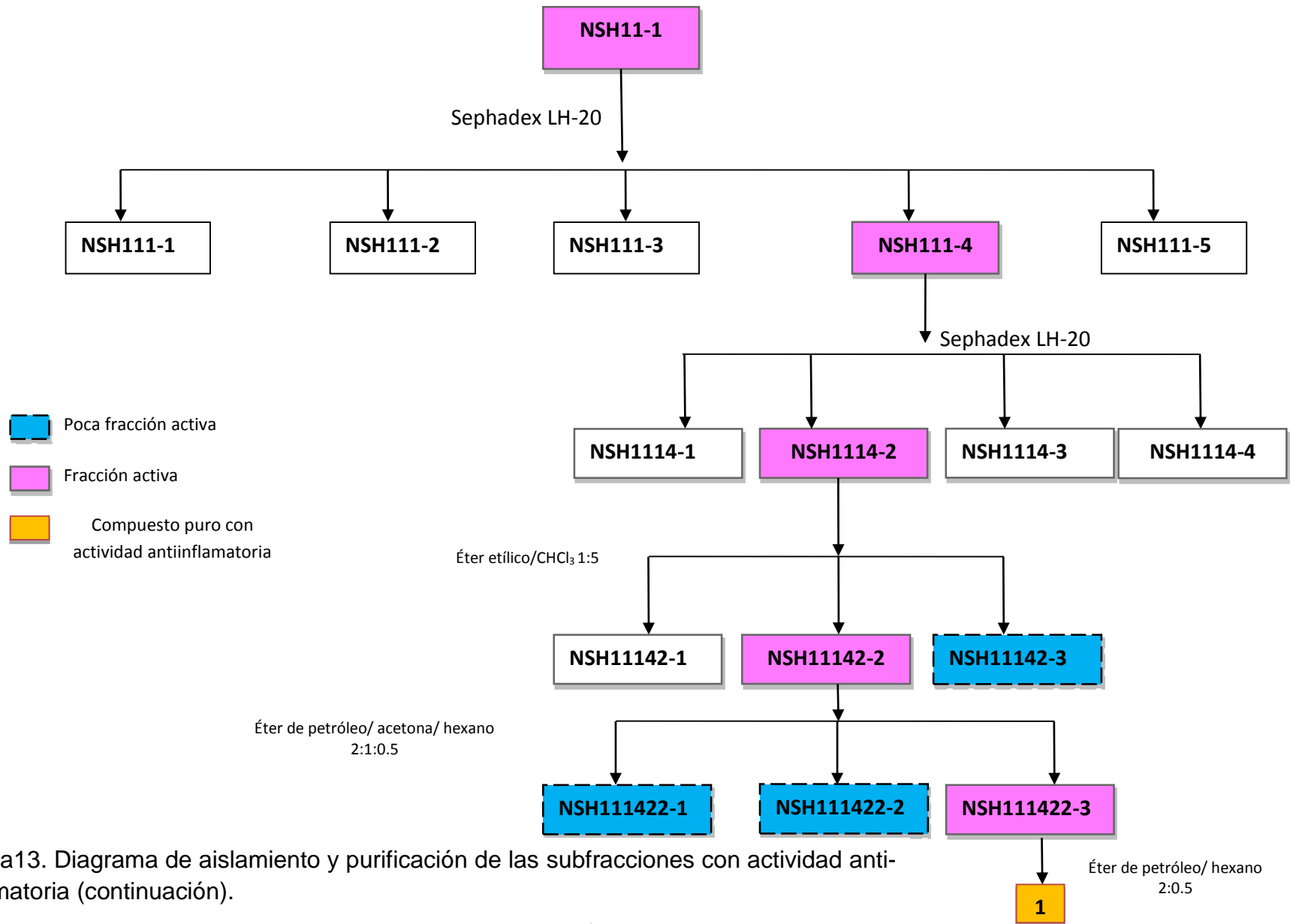


Figura13. Diagrama de aislamiento y purificación de las subfracciones con actividad anti-inflamatoria (continuación).

VIII.6. Elucidación estructural del compuesto 1 (birsonimadiol) con actividad antiinflamatoria

Los datos obtenidos en los espectros de IR, de resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C y espectrometría de masas (EM) se muestran a continuación:

El compuesto 1, se nombró como Birsonimadiol, el cual es un compuesto de aspecto gomoso incoloro. IR (KBr) ν_{max} : 3402, 2852, 1736, 1651, 1463, 1375, 1067 y 721 cm^{-1} .

HRESIMS, m/z [$M = 588$], 588.3956 calcd. para $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_8$ 588.3662; EIMS m/z (rel. int.) 589 [$M + 1$] (100), 570 [$\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_7$] (10), 528 [$\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{O}_6$] (6), 470 [$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$] (6), 412 [$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_2$] (9), 322 [$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_5$] (7), 304 [$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_4$] (5), 296 [$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5$] (4), 264 [$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3$] (3), 246 [$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_2$] (4), 224 [$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$] (4).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 0.77 (3H, s, H-24), 0.84 (3H, s, H-25), 1.20 (3H, s, H-26), 1.24 (3H, s, H-27), 1.55 (3H, s, H-29), 1.94 (1H, m, H-2), 3.97 (1H, dd $J = 4.8, 11.7$ Hz, H-3), 2.26 (1H, ddd, $J = 3.0, 12.5, 13.0$ Hz H-7), 2.37 (1H, m, H-9), 5.45 (1H, t, $J = 3.7$ Hz, H-12), 3.68 (1H, m, H-16), 2.22 (1H, dd, $J = 14.1, 4.0$ Hz, H-18), 4.55 (1H, d, $J = 11$ Hz, H-23 α), 4.61 (1H, d, $J = 11$ Hz, H-23 β), 2.21 (3H, s, COOMe).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 38.18 (C-1), 27.49 (C-2), 68.32 (C-3), 42.11 (C-4), 39.42 (C-5), 19.1 (C-6), 39.10 (C-7), 30.39 (C-8), 37.69 (C-9), 37.62 (C-10), 25.02 (C-11), 127.82 (C-12), 137.51 (C-13), 45.34 (C-14), 34.62 (C-15), 77.51 (C-16), 69.67 (C-17), 31.21 (C-18), 31.32 (C-19), 151.9 (C-20), 30.71 (C-21), 32.98 (C-22), 63.52 (C-23), 14.32 (C-24), 16.21 (C-25), 22.88 (C-26), 26.04 (C-27), 173.56 (C-COOMe), 173.59 (COOMe), 21.46 (COOMe). 178.59, 173.56 y 173.59, 14.32 (C-24), 16.21 (C-25), 22.88 (C-26), 26.04 (C-27), 27.45 (C-30), 173.56 (C-COOMe), 173.59 (COOMe), 178.59 (COOMe), 21.46 (COOMe).

El compuesto 1 se aisló como una sustancia incolora gomosa, la cual mostró en el espectro IR bandas de absorción en 3402 y 1736 cm^{-1} , lo que indicó la presencia de grupos hidroxilo y grupos carbonilo, respectivamente, así como un doble enlace terminal (3072, 1691 y 884 cm^{-1}).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El compuesto 1 mostró un ion molecular a 590 m/z [M +2] y 589 m/z [M +1] correspondiente a la fórmula molecular $C_{34}H_{52}O_8$ (calc para 588.3662), lo cual concuerda con los datos de RMN de ^{13}C y DEPT.

El espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C reveló 34 señales de carbono que fueron ordenadas por DEPT en: ocho metilos, diez metilenos, incluyendo un hidroximetilo, seis metinos y diez carbonos cuaternarios incluyendo un olefínico y tres grupos carbonil.

En el espectro de RMN de 1H , se observaron señales de cinco metilos terciarios en δH 0.77, 0.84, 1.20, 1.24, 1.55, (3H cada uno, Me-24, Me-25, Me-26, Me-27 y Me-29 respectivamente), quienes revelaron el esqueleto básico de un triterpenoide del tipo oleano.

En el espectro de RMN de ^{13}C se observaron tres señales de carbonil éster a 178.59, 173.56 y 173.59, lo que sugirió que el compuesto 1 puede tener un grupo acetilo adicional en lugar de un grupo metilo en C-27 (Li y col.1997).

La comparación del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 1 con los de un yemuoside, y un verbesinosido A (Gao et al.,2009; Xu et al., 2010 respectivamente), sugirieron la posición de los dos grupo éster en el C-28 y C-29. Estas asignaciones se confirmaron mediante experimentos HMBC (Figura 14).

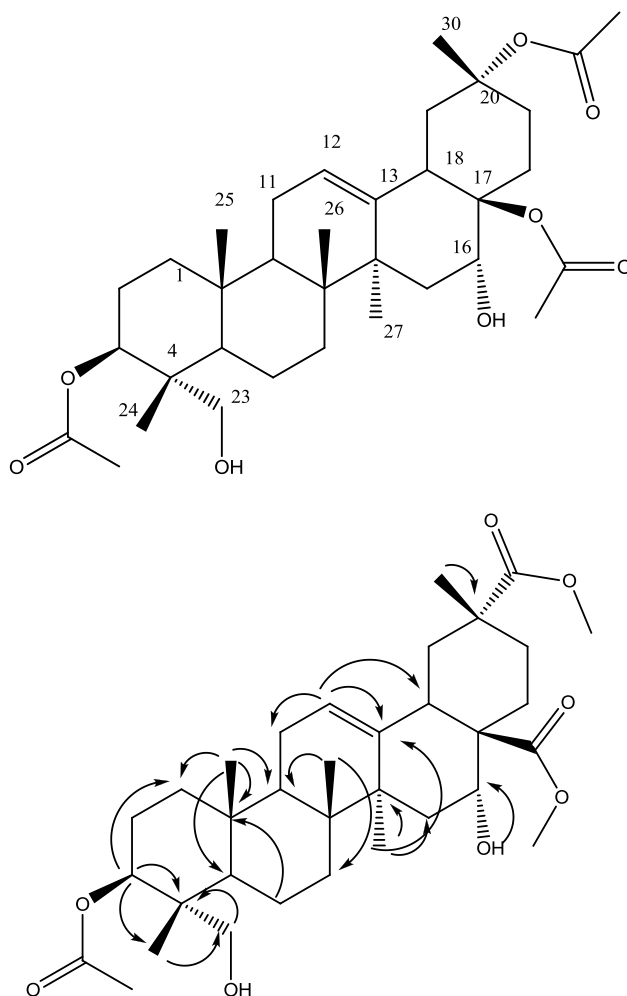


Figura 14. Compuesto 1 y sus correlaciones observadas en el experimento HMBC (H-C).

Un análisis detallado del espectro de RMN de ^1H del compuesto 1 confirmó los rasgos característicos de la estructura principal de un triterpéno del tipo oleano, la señal en δ_{H} 5.45 se atribuyó a un protón vinílico, el cual fue confirmado por RMN de ^{13}C a δ_{C} 127.82 (C-12), 137.51 (C-13).

La posición del grupo hidroximetino fue proporcionada por los datos del espectro de HMBC en el cual aparecen correlaciones de largo alcance de los protones del metileno a δ_{H} 4.55 (H-23 α), y δ_{H} 4.61 (H-23 β), a las señales del carbono δ_{C} 68.32 (C-3), y δ_{C} 14.32 (C-24), observándose también una correlación desde los protones metinos a δ_{H} 3.68 a la señal del carbono δ_{C} 77.51 (C-16), indicando la posición del

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

segundo grupo hidroxilo, finalmente las señales a δ_H 3.97 (H-3) al carbono del carbonil de un grupo acetato a δ_C 173.56.

Por lo tanto, la estructura del compuesto 1 se determinó como 16 α ,23-Dihidroxi-olean-12-ene-3 β ,17 β ,20 β -triacetato (Figura 14), el cual fue nombrado como birsonimadiol. En el Anexo E, se muestra la fragmentación sugerida para birsonimadiol así como sus espectros.

VIII.6.1. Actividad antiinflamatoria del compuesto 1, aislado de las semillas de *B. crassifolia*

El efecto antiinflamatorio del compuesto 1 aislado de *B. crassifolia* se estudió en ratas con inflamación inducida con TPA; los datos obtenidos se compararon con la dexametasona, usada como estándar de referencia.

La aplicación tópica de TPA en oreja de ratón indujo una respuesta edematogénica, lo cual puede observarse por un marcado incremento en el grosor de la oreja (Tabla 18). El triterpeno inhibió eficazmente la inflamación (0.056 a 0.070 mm/oreja) de forma comparable con el efecto de la dexametasona (0.075 mm/oreja). La aplicación tópica del compuesto 1 a dosis de 0.125, 0.25 y 0.50 mg de dosis/oído redujo significativamente el grado de inflamación en 24, 22 y 40%, respectivamente, en comparación con el grupo control tratado con dexametasona (0.05 mg/oreja), el cual fue de 19% (Tabla 18).

La dexametasona es un agonista glucocorticoide con acción antiinflamatoria; se cree que tiene efecto sobre las lipocortinas (proteínas inhibidoras de la fosfolipasa A2), las cuales controlan la biosíntesis de potentes mediadores de la inflamación, como las prostaglandinas y los leucotrienos. La dexametasona atraviesa las membranas celulares y, por su alta afinidad, se une con receptores citoplasmáticos específicos (Tazaki y col.2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 18. Efecto del compuesto 1 en el edema inducido con tetradecanoilforbol (TPA) en oreja.

| Tratamiento | Dosis (mg/oreja) | Espesor de la oreja (mm) |
|--------------|------------------|-------------------------------------|
| Control | | 0.092 ± 0.0023 |
| Compuesto 1 | 0.125 | 0.070 ± 0.0056 ^a (24) |
| Compuesto 1 | 0.25 | 0.063 ± 0.0038 ^a (22) |
| Compuesto 1 | 0.50 | 0.056 ± 0.0074 ^a (40) |
| Dexametasona | 0.05 | 0.075 ± 0.0098 ^a (19) |

Las medias y los errores estándar de las medias fueron calculados para grupos de seis ratones. Usando una ^ap<.001 cuando los datos son comparados con el grupo control. () Porcentaje de reducción del edema.

El TPA es una proteína quinasa caracterizada como activador y promotor de tumores; es a su vez, un modelo conveniente para seleccionar compuestos tópicos con potencial antiinflamatorio. Una sola aplicación de TPA induce estrés oxidativo, inflamación cutánea e hiperplasia epidérmica, debido a una mayor proliferación de queratinocitos (Morris, 2003). Este ensayo se ha utilizado para identificar alérgenos potenciales, basándose en el aumento del espesor de la oreja en los animales tratados. La inhibición de esta reacción dérmica se puede expresar como la disminución del edema en la oreja o del grosor de ésta, en comparación con un grupo control.

VIII.7. Actividad cicatrizante del extracto de hexano de *B. crassifolia*

Debido a que el extracto de hexano de la fruta de *B. crassifolia* presentó menor actividad cicatrizante respecto al extracto de hexano de la semilla, únicamente se muestran los resultados de la actividad cicatrizante de la semilla.

VIII.7.1. Efecto del extracto de hexano de la semilla de *B. crassifolia* en la herida por escisión

Los resultados de este estudio muestran que la aplicación tópica del extracto de hexano de las semillas de *B. crassifolia* en la superficie de la herida en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina acelera el proceso de cicatrización, disminuyendo el área lacerada.

El cierre de la herida en diferentes intervalos se muestra en la Tabla 19. La aplicación del extracto de hexano de las semillas de *B. crassifolia* (NSH) dio como resultado el cierre completo de la herida al día 14, lo que conduce a una curación más rápida, lo cual se confirma por la reducción en el tiempo de epitelización (Rathi y col.2004), en comparación con el grupo control diabético y el grupo diabético tratado con nitrofurazona (2% p/p), en los cuales la herida cerró 60%, y 90% el día 14, respectivamente. Estos resultados se pueden apreciar mejor en la Figura 15, donde se muestran fotos del proceso de cicatrización.

Tabla 19. Efecto de la aplicación tópica del extracto de hexano de las semillas de *B. crassifolia* (NSH) en la cicatrización de heridas en ratas durante un periodo de 16 días.

| Cierre de la herida en mm ² | | | | |
|--|----------------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Días | Control normal | Control diabético | NSH 10% | NT 0.2% |
| 3 | 58.9 ± 4.12 (21) | 59.7 ± 7.18 (19) | 87.4 ± 0.58 ^a (28) | 72.1 ± 1.36 ^a (23) |
| 6 | 85.5 ± 6.88 (27) | 75.1 ± 3.46 (24) | 125.5 ± 0.13 ^a (40) | 94.3 ± 5.48 ^a (30) |
| 9 | 135.4 ± 5.90 (43) | 115.8 ± 2.87 (37) | 228.5 ± 00 ^a (73) | 159.6 ± 4.02 ^a (51) |
| 12 | 176.0 ± 7.63 (56) | 156.5 ± 5.64 (50) | 288.0 ± 0.96 ^a (92) | 250.2 ± 6.01 ^a (80) |
| 14 | 223.0 ± 7.23 (71) | 190.3 ± 4.57 (61) | 313.0 ± 00 ^a (100) | 281.6 ± 00 ^a (90) |
| 16 | 249.6 ± 8.45 (80) | 234.2 ± 4.12 (75) | - | 306.4 ± 00 ^a (98) |

Las medias y sus errores estándar fueron calculados para grupos de seis ratas. Utilizando una p <0.05 en comparación con el grupo diabético. () Porcentaje de cierre de la herida, calculado respecto al área de la herida al día 0 (313 mm²). Nitrofurazona (NT) utilizada como control positivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

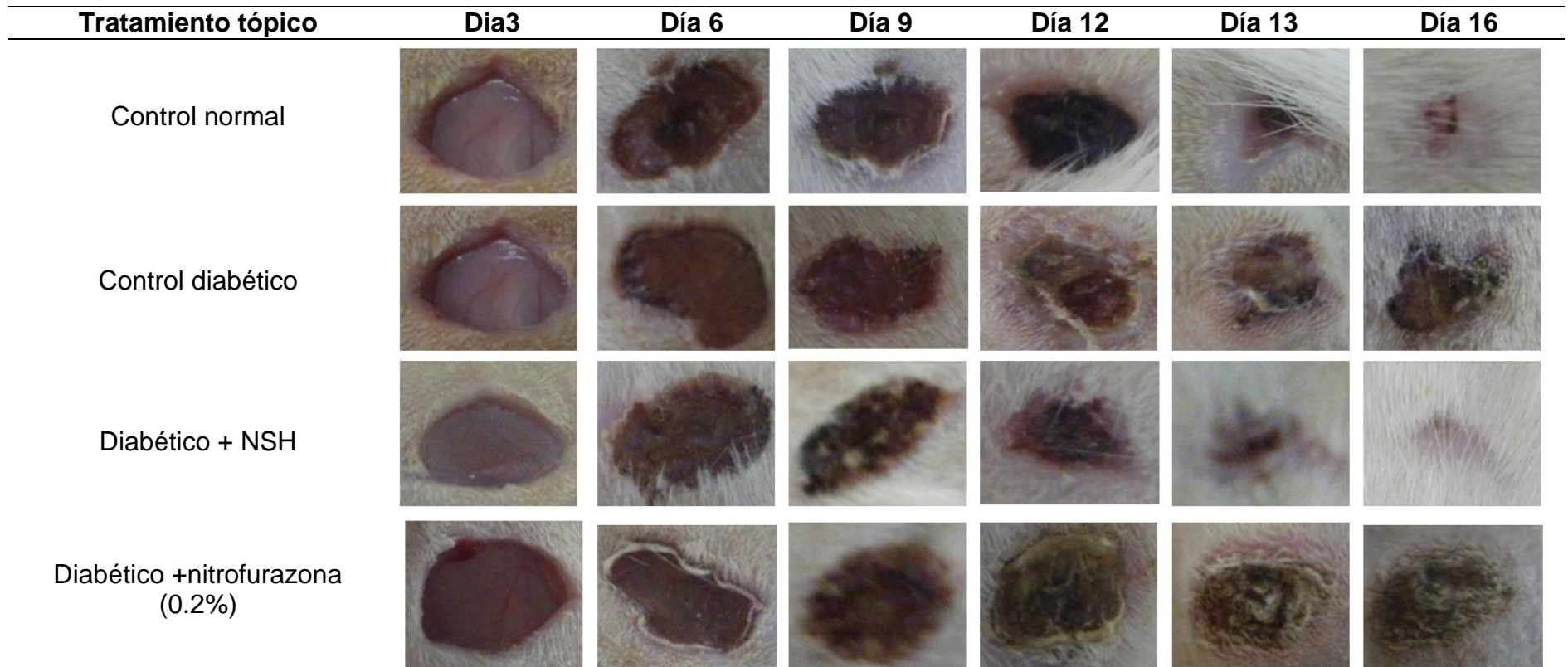


Figura 15 . Efecto de la aplicación tópica del (NSH) en heridas hechas por escisión durante un periodo de 16 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El NSH disminuyó el tiempo de curación de la herida, así como el periodo de epitelización. Además, la tasa de contracción determina el periodo de epitelización, el cual se puede definir como el movimiento centrípeto de los bordes de un espesor total de la herida para facilitar su cierre (Wang y Li, 2009). De ahí que la tasa de contracción se asocia con la cantidad de colágeno depositado.

El colágeno no sólo confiere resistencia e integridad a la matriz del tejido, sino que también desempeña un papel importante en la homeostasis y la epitelización (fase posterior de la cicatrización de la herida); por lo tanto, al aplicar tópicamente NSH en la herida, ésta mejora significativamente la síntesis de colágeno, por lo que el extracto de hexano de la semilla de *B. crassifolia* contribuye a la curación y también proporciona la fuerza necesaria para que el tejido sea reparado.

VIII.7.2. Efecto del extracto de hexano de *B. crassifolia* en la herida por incisión

La resistencia a la tensión de la herida por incisión se muestra en la Tabla 20. Al realizar esta prueba se observó un aumento significativo en la resistencia de la piel en ratas tratadas con NSH (612.10 ± 1.45), respecto al control diabético (325 ± 0.98) y la nitrofurazona (599.67 ± 1.87).

Tabla 20. Efecto del extracto de hexano de las semillas de *B. crassifolia* (NSH) en las heridas hechas por incisión.

| Tratamiento tópico | Resistencia a la tensión (g) | Peso del granuloma seco (mg/100 g) | Resistencia a la tensión (g) |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| Control normal | 381.16 ± 4.37 | 53.75 ± 2.41 | 331.0 ± 4.18 |
| Control diabético | 325 ± 0.98 | 40.16 ± 1.65 | 186.21 ± 1.52 |
| NSH 10% | 612.10 ± 1.45^a | 159.20 ± 3.54^a | 483.95 ± 5.16^a |
| Pomada de nitrofurazona (0.2%) | 599.67 ± 1.87^a | 146.54 ± 1.78^a | 474.23 ± 5.88^a |

Las medias y sus errores estándar fueron calculados para grupos de seis ratas, utilizando una ^ap <0.01 en comparación con el grupo diabético.

El efecto de la aplicación tópica de NSH en las heridas realizadas por incisión se estimó determinando el aumento en el peso del tejido (159.20 ± 3.54) y el aumento de su resistencia a la tensión (483.95 ± 5.16). Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Dado que las heridas tratadas con *B. crassifolia* mostraron una mayor resistencia a la tensión, se puede deducir que *B. crassifolia* aumenta la síntesis de colágeno celular. Las moléculas de colágeno se forman en el lugar de la herida y se convierten en enlaces cruzados para formar fibras, por lo que la resistencia del tejido se debe a la regeneración de colágeno y a la formación de moléculas entrecruzadas, además de que un aumento en el peso seco del granuloma indica un mayor contenido de proteína (Hon y col.2009).

VIII.7.3. Análisis bioquímicos de las heridas por escisión

La Tabla 21 muestra el contenido de colágeno (hidroxiprolina), el contenido de proteína y el ADN en los tejidos de ratas tratadas por vía tópica. Los resultados mostraron que NSH posee una acción cicatrizante, aumentando significativamente el contenido de hidroxiprolina (niveles de colágeno), y proteína total. Por lo que los elevados niveles de hidroxiprolina en el tejido regenerado sugieren la síntesis de colágeno, un importante constituyente de la matriz extracelular (Manjunatha y col.2007).

El colágeno, es un componente esencial de la matriz extra celular, el proceso de curación depende, en gran medida, de su biosíntesis, su formación y su maduración subsiguiente. Al evaluar el contenido de colágeno en los tejidos del grupo control y las heridas tratadas con NSH, se observa claramente que *B. crassifolia* aumenta la producción de colágeno en el día 8 (Tabla 21) (Midwood y col.2004)

El ácido urónico y la hexosamina son moléculas de la matriz que actúan como sustancia base para la síntesis de nueva matriz extracelular. Se ha reportado que existe un incremento en los niveles de estos componentes durante las primeras etapas de la cicatrización de una herida, después de lo cual son restaurados los niveles normales (Midwood y col.2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una tendencia similar se observó en las heridas tratadas con el extracto de hexano de la semilla de *B. crassifolia*, ya que los niveles de ácido urónico y hexosamina aumentaron ocho días después de haber iniciado el tratamiento.

Tabla 21. Contenido de colágeno (hydroxyprolina), proteína total, ácido urónico y hexosamina en la granulación de los tejidos.

| Granuloma | | | | | |
|---------------------------|-----|--------------------------------|---|----------------------------|---------------------------|
| Tratamiento | Día | Hidroxi-prolina (mg/100 mg) | Contenido de proteína (µg/100 mg) | Ácido urónico | Hexosamina (µg/100 mg) |
| Control normal | 4 | 3.22 ± 1.18 | 2.67 ± 0.67 | 97.38 ± 7.65 | 798 ± 34.16 |
| | 8 | 5.67 ± 2.49 | 5.98 ± 2.13 | 88.54 ± 6.54 | 781 ± 43.28 |
| | 16 | 3.04 ± 1.89 | 3.01 ± 1.87 | 86.79 ± 6.73 | 694 ± 29.08 |
| NSH | 4 | 2.73 ± 0.65 | 3.21 ± 1.12 | 93.19 ± 14.74 | 728 ± 16.48 |
| | 8 | 4.69 ± 1.71 | 7.56 ± 1.55 | 85.72 ± 9.30 | 543 ± 21.3 |
| | 16 | 3.01 ± 1.20 | 5.62 ± 1.34 | 82.26 ± 8.76 | 365 ± 41.1 |
| Nitrofurazona | 4 | 4.78 ± 1.73 ^a | 5.72 ± 1.62 ^b | 114.0 ± 11.62 | 1009 ± 56.8 ^b |
| | 8 | 8.94 ± 2.56 ^a | 9.28 ± 2.47 ^a | ^a | 854 ± 39.71 ^b |
| | 16 | 3.28 ± 3.56 ^b | 7.54 ± 4.80 ^a | 103.9 ± 10.33 ^b | 583 ± 27.19 ^a |
| Nitrofurazona | 4 | 4.65 ± 2.57 ^b | 5.23 ± 2.14 ^a | 97.1 ± 15.46 ^b | 1011 ± 43.21 ^a |
| | 8 | 8.79 ± 4.32 ^a | 8.77 ± 3.51 ^b | 112.40 ± 8.64 | 876 ± 36.52 ^b |
| | 16 | 3.26 ± 1.36 ^b | 4.21 ± 1.47 ^b | 106.1 ± 8.34 ^b | 587 ± 24.70 ^a |

Las medias y sus errores estándar fueron calculados para n=6 seis animales. Todos los valores, excepto el colágeno, se expresan como mg/100 mg de tejido húmedo. Los valores de colágeno se reportan en mg/100 mg de tejido seco. LOS resultados estadísticamente significativos se indican como ^ap <0,01 y ^bp <0,001 en comparación con el grupo diabético.

VIII.7.4. Estimación de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y catalasa)

La estimación de las enzimas antioxidantes SOD y CAT se realizó en los tejidos obtenidos de las heridas en las ratas. Los animales tratados con NSH mostraron un aumento significativo después de ocho días, seguido de una reducción gradual hasta el día 16, en comparación con el control diabético (Tabla 22).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron un aumento en los niveles de SOD y CAT a los ocho días de tratamiento, y que tienden a normalizarse gradualmente hacia el día 16.

Los niveles de ambas enzimas fueron mayores en las ratas tratadas con NSH. El grupo control diabético mostró una disminución de la actividad enzimática que puede atribuirse al exceso de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que trae como consecuencia un retraso en la cicatrización.

Tabla 22. Efecto del tratamiento tópico con NSH en el contenido de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT)

| Tratamiento | Día | Unidad /mg de proteína | |
|-------------------|-----|---------------------------|--------------------------|
| | | SOD | CAT |
| Control normal | 4 | 0.59 ± 0.006 | 1.49 ± 0.87 |
| | 8 | 0.84 ± 0.007 | 1.75 ± 0.54 |
| | 12 | 0.75 ± 0.004 | 1.63 ± 0.62 |
| | 16 | 0.69 ± 0.003 | 1.59 ± 0.23 |
| Control diabético | 4 | 0.53 ± 0.003 | 1.32 ± 0.45 |
| | 8 | 0.72 ± 0.007 | 1.41 ± 0.26 |
| | 12 | 0.60 ± 0.004 | 1.40 ± 0.28 |
| | 16 | 0.50 ± 0.009 | 1.38 ± 0.31 |
| NSH | 4 | 0.55 ± 0.001 ^a | 1.40 ± 0.21 ^a |
| | 8 | 0.99 ± 0.002 ^a | 1.53 ± 0.35 ^a |
| | 12 | 0.86 ± 0.008 ^a | 1.50 ± 0.29 ^a |
| | 16 | 0.72 ± 0.005 ^a | 1.46 ± 0.36 ^a |
| Nitrofurazona | 4 | 0.51 ± 0.006 ^a | 1.39 ± 0.34 ^a |
| | 8 | 0.90 ± 0.008 ^a | 1.50 ± 0.43 ^a |
| | 12 | 0.81 ± 0.005 ^a | 1.48 ± 0.16 ^a |
| | 16 | 0.71 ± 0.009 ^a | 1.45 ± 0.28 ^a |

Las medias y sus errores estándar fueron calculados para grupos de seis ratones usando una ^ap<0.001 cuando se compara con el grupo diabético.

VIII.8. Aislamiento y purificación de las fracciones con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs

En estudios previos realizados al extracto de hexano de la fruta y la semilla de *B. crassifolia*, se concluyó que éste presenta actividad hipoglucemiante y anti-AGEs en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (Perez y col.2010). Continuando con esta investigación, se decidió aislar y purificar los componentes que le confieren al nanche estas propiedades, por lo que las pruebas preliminares de estas actividades no se presentan.

Como el extracto de hexano de la fruta de *B. crassifolia* presentó menor actividad hipoglucemiante y anti-AGEs, respecto al extracto de hexano de la semilla, únicamente se muestran los resultados hipoglucemiantes y anti-AGEs de la semilla.

VIII.8.1. Biofraccionamiento y purificación de los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante y anti-AGEs

El extracto de hexano de la semilla de *B. crassifolia* se colocó en una columna empacada con sílica gel de malla 70-230, y se eluyó con éter de petróleo/acetona/hexano (2:1:0.5), de donde se obtuvieron dos subfracciones (NSH1 y NSH2), a las cuales se les evaluó la actividad antidiabética y antiglicación, dando positiva la fracción NSH1 (el diagrama de aislamiento y purificación de las fracciones con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs, esto se muestra en la Figura 16).

VIII.8.2. Biofraccionamiento de la subfracción NSH1

Esta subfracción se colocó en una columna cromatográfica con sílica gel y se eluyó con éter etílico/cloroformo (1:5), de donde se obtuvieron dos subfracciones (NSH11 y NSH12) y la fracción NSH11 resultó activa en la prueba hipoglucemiante y anti-AGEs.

VIII.8.3. Biofraccionamiento de la subfracción NSH11

NSH11 se sometió a cromatografía en columna con sílica y se eluyó con éter etílico/cloroformo (1:5), de donde se obtuvieron cinco subfracciones (NSH111-NSH115), de las cuales únicamente la fracción NSH111 presentó actividad.

VIII.8.4. Biofraccionamiento de la subfracción NSH111

La subfracción NSH111 se colocó en una columna cromatográfica con Sephadex LH-20, utilizando para ello un sistema de eluyentes cloroformo:metanol 10:1- 5:1, y de donde se obtuvieron cinco fracciones (NSH1111- NSH1115), de las cuales las subfracciones NSH1113 y NSH1114 fueron positivas.

La subfracción NSH1114 se siguió sometiendo a proceso de cromatografía; no obstante, al purificarlas, las subfracciones obtenidas se obtuvieron en muy poca cantidad, por lo que el proceso de biofraccionamiento de esta subfracción no se detalla, pero se puede observar en la Figura 16.

VIII.8.5. Biofraccionamiento de la subfracción NSH1113

NSH1113 se separó por cromatografía en una columna empacada con Sephadex LH-20, se utilizó para ello cloroformo:metanol (10:1-5:1), y se obtuvieron cuatro subfracciones (NSH11131- NSH11134), de las cuales únicamente NSH11131 resultó activa.

VIII.8.6. Biofraccionamiento de la subfracción NSH11131

La subfracción NSH11131 se colocó en una columna cromatográfica con Sephadex LH-20, en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, de donde se obtuvieron dos subfracciones (NSH111311 y NSH111312), y resultó activa la subfracción NSH111312.

VIII.8.7. Biofraccionamiento de la fracción NSH111312

NSH111312 se continuó purificando, y se utilizó para ello cloruro de metileno: cloroformo (3:2), de donde se obtuvieron cinco subfracciones de las cuales NSH1113121 y NSH1113123 resultaron positivas; debido a que se obtuvo muy poca cantidad de NSH1113121, está ya no se siguió purificando.

VIII.8.8. Biofraccionamiento de la fracción NSH1113123

Finalmente, la subfracción NSH1113123 se purificó mediante cromatografía en columna con Sephadex LH-20, eluyendo con un gradiente de cloroformo: metanol 10:1- 5:1, de donde se obtuvieron los compuestos 2 (94 mg) y 3 (112 mg), los cuales resultaron positivos en la prueba anti-AGEs e hipoglucemiante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

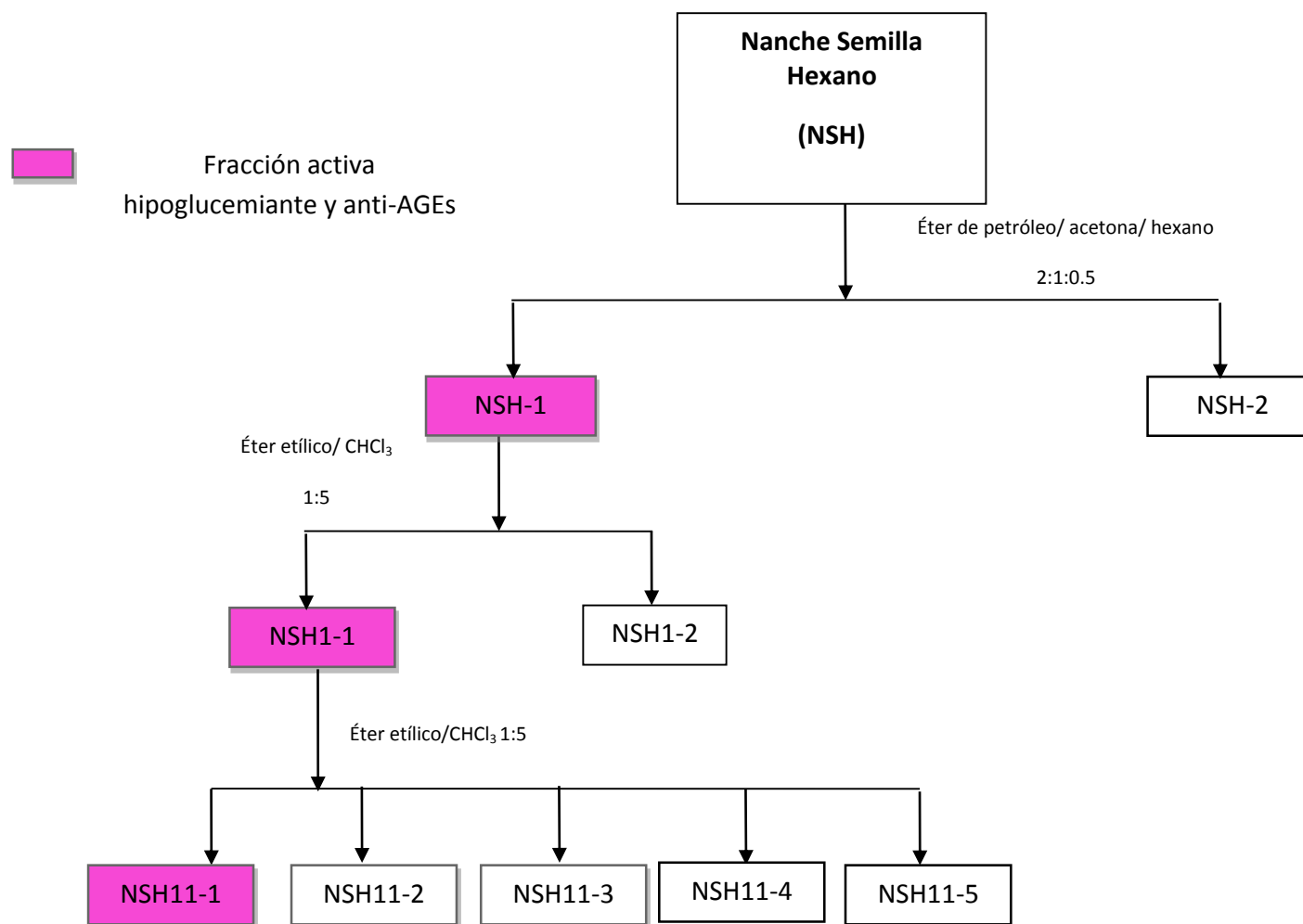


Figura 16. Diagrama del aislamiento y purificación de las subfracciones con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs (continúa)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

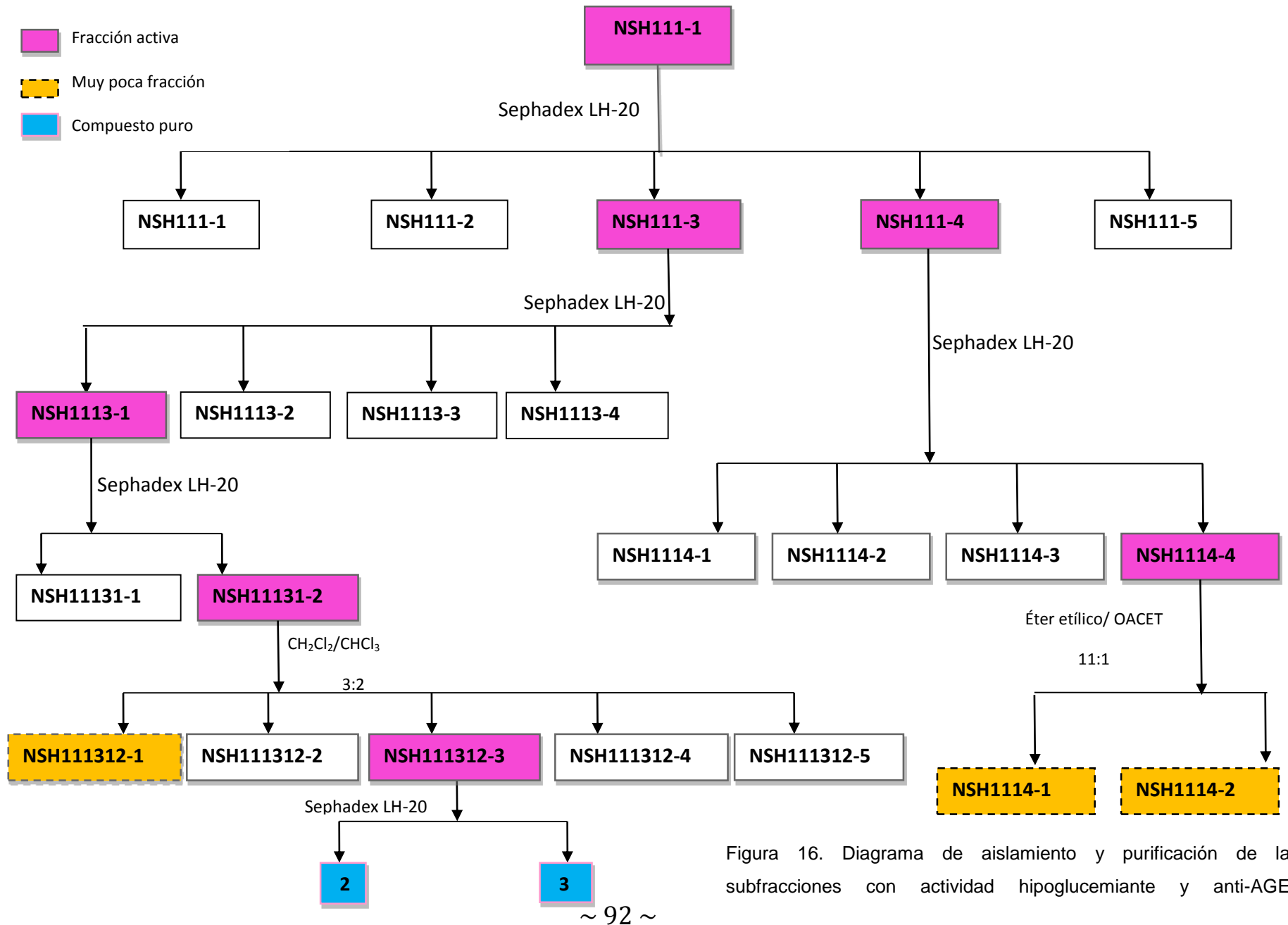


Figura 16. Diagrama de aislamiento y purificación de las subfracciones con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs

VIII.9. Elucidación estructural de los compuestos 2 y 3 (birsonina A y birsonina B) con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs

En la tabla 23 se muestran los datos de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 2 con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs.

Tabla 23. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 2 con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs.

| Posición | ^1H | ^{13}C | HMBC |
|---------------------|-------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|
| 1 | - | 132.48 | - |
| 2 α | 5.54 (1H, dd, $J = 4.1, 3.7$, Hz) | 65.08 | C=O |
| 3 α | 2.50 (1H, dt, $J = 14, 3.7$ Hz) | 34.11 | |
| 3 β | 1.79 (1H, dt, $J = 14, 6.0$ Hz) | | |
| 4 β | 2.65 (1H, m) | 57.29 | C-15, C-15' |
| 5 | 3.62 (1H, m) | 29.19 | C-10, C-7, C-6, C-1, C-4, C-2 |
| 6 | 4.17 (1H, dd, $J = 6.8, 9.3$ Hz) | 62.17 | |
| 7 | 3.43 (1H, m) | 57.35 | C13, C-11, C-9, C-8, C-6, |
| 8 | 4.18 (1H, td, $J = 2.1, 10.3$, Hz) | 68.20 | C-14, C-10, C-7, C-8, C-1 |
| 9a | 2.04 (1H, dd, $J = 2.0, 13.4$ Hz) | 29,79 | C-14, C-10, C-8, C-7, C-1, |
| 9b | 2.18 (1H, m) | - | |
| 10 | - | 129.77 | |
| 11 | 2.20 (1H, m) | 38.71 | C-13, C-7, C-12 |
| 12 | - | 173.44 | |
| 13 | 1.34 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) | 13.91 | C-7, C-11, C-12 |
| 14 | 2.27 (3H, br,s) | 22.78 | C-10, C-9, C-8, C-1, C-2 |
| 15 | 2.06 (1H, m) | 25.44 | C-4 |
| 1' | - | 130.98 | |
| 2' | | 68.95 | |
| 3' | | 31.73 | |
| 4' | | 130.07 | |
| 5' | | 58.96 | C-10', C-7', C-6', C-4', C-1' |
| 6' | 4.19 (1H, dd, $J = 7.1, 9.5$ Hz) | 60.21 | |
| 7' | | 59.01 | C13', C-11', C-6', C-5', C-9' |
| 8' | | 68.20 | |
| 9' | | 28.98 | C-14', C-10', C-7', C-8', C-5', C-1' |
| 10' | - | 129,77 | |
| 11' | | 29.30 | |
| 12' | | 172.99 | |
| 13' | 1.33 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) | 14.21 | |
| 14' | | 23.07 | |
| 15' | 5.33 (1H, brs) | 129.92 | C-4', C-5, C-3', |
| 1'' | - | 167.88 | |
| 2''-6'' | 7.70 (2H, d, $J = 7.6$) | 130.98 | |
| 3''-5'' | 7.49, (2H, d, $J = 7.6$) | 128.87 | |
| CH ₃ COO | 2.30 | 22.88 | |
| CH ₃ COO | - | 172.98 | |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El compuesto 2 (birsonina A), se obtuvo como una sustancia incolora con consistencia de gel. El HRFABMS mostro un ion en 820.5461 m/z , de acuerdo con el espectro de RMN de ^{13}C y DEPT, este compuesto tiene la fórmula molecular $\text{C}_{48}\text{H}_{52}\text{O}_{12}$.

El espectro de IR reveló bandas de absorción de γ -lactona a 1774 cm^{-1} , éster (1743 cm^{-1}) y de grupos olefínicos a 1674 cm^{-1} . Los espectros de RMN de ^{13}C y DEPT revelaron que el compuesto 2 presenta 48 átomos de carbono, derivándose en seis metilos, cinco metilenos, veinticuatro metinos y trece carbonos cuaternarios. Los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 2 (Tabla 24) fueron consistentes con un esqueleto Guaia-1(10), con la presencia de dos señales de protones de lactona en δ_{H} 4.17 y δ_{H} 3.43. El espectro de RMN de 2 mostró señales de metilo en δ_{H} 1.34 (3H, d, $J = 7.0\text{ Hz}$), δ_{H} 1.33 (3H, d, $J = 7.0\text{ Hz}$), δ_{C} 13,91 y 14,21 que caracterizan a los protones de metilo de la α -metil- γ -lactona en los sesquiterpenos del tipo guaianolido lactonas (Kumari y col. 2003)

Se observaron también dos grupos lactona carbonil a δ_{C} 172.98 y δ_{C} 173.44, así como dos carbonos unidos a oxígenos (δ_{C} 62.17 y δ_{C} 60.21) los cuales fueron asignados a dos grupos γ -lactona, respectivamente. En adición los grupos metilo de los acetilos a δ_{C} 172.48 dieron dos picos a δ_{H} 1,97 y δ_{H} 1.99, estos datos sugieren que 2 es un sesquiterpeno dimérico con dos unidades guaian-12,6-olide.

Las correlaciones observadas entre H-13 y H-6 revelaron que éstos están orientados en posición β . Además, la constante de acoplamiento ($J_{6,7} = 9.5\text{ Hz}$) confirmó la disposición de los hidrógenos 6 y 7.

El compuesto 2, por su parte, mostró la presencia de un grupo benzoilo en sus espectros de HMBC; las correlaciones de δ_{H} 4.18 (H-8) junto con δ_{C} 168.78 (C-1) confirmaron la presencia de un benzoilo en C-8 El espectro de RMN de ^1H presentó un singulete a δ_{H} 2.27 que podría ser asignado a un grupo metilo terciario unido a un carbono cuaternario (C-10), estas asignaciones fueron apoyadas por el espectro de HMBC

El espectro de RMN de ^{13}C reveló la presencia de un doble enlace tetra-sustituido (δ_{C} 132.78 y 129.77). A la correlación NOE entre los grupos metilo del grupo acetilo se le asignó la posición en C-2. El valor de la constante de acoplamiento $J_{7,8}=3.3$ Hz indicó una α -orientación del H-2. La posición del grupo acilo se confirmó en el C-2 (δ_{C} 65.08) por el pico observado entre el H-2 (δ_{H} 5.54) y el C=O (δ_{C} 172.98) observado en el espectro HMBC.

Por otra parte, las correlaciones de la otra unidad del guaianolido (compuesto 2), con un grupo acetilo, un grupo benzoilo y señales de exo-olefina (δ_{C} 130.07 y δ_{C} 129.92) fueron evidentes. El vínculo entre las dos unidades guaianolidos se caracterizó en los espectros de HMBC los cuales mostraron correlaciones entre el H-4 (δ_{H} 2.65) y C-4' (δ_{C} 130.07).

Las constantes de acoplamiento para H-6 ($J_{5,6} = 6,8$ Hz, $J_{6,7} = 9-3$ Hz) y H-6' ($J_{5',6'} = 7,1$ Hz, $J_{6',7'} = 9,5$ Hz) indicaron la presencia de dos anillos *trans*-fusionados de α -metil- γ -lactona en **2**. La orientación del H-6 y H-11 se determinaron en posición β y la de H-5, H-7, CH₂-15 y Me-13 se determinaron en posición α , esto debido a las correlaciones observadas en el espectro NOESY (H-6/H-4, H-11; H-5/H-1; H-13/H-7; H-5) y a la constante de acoplamiento de H-6 a H-7. Por lo tanto, el compuesto **2** es un nuevo dímero por lo cual fue identificado como birsonina A, Figura 17.

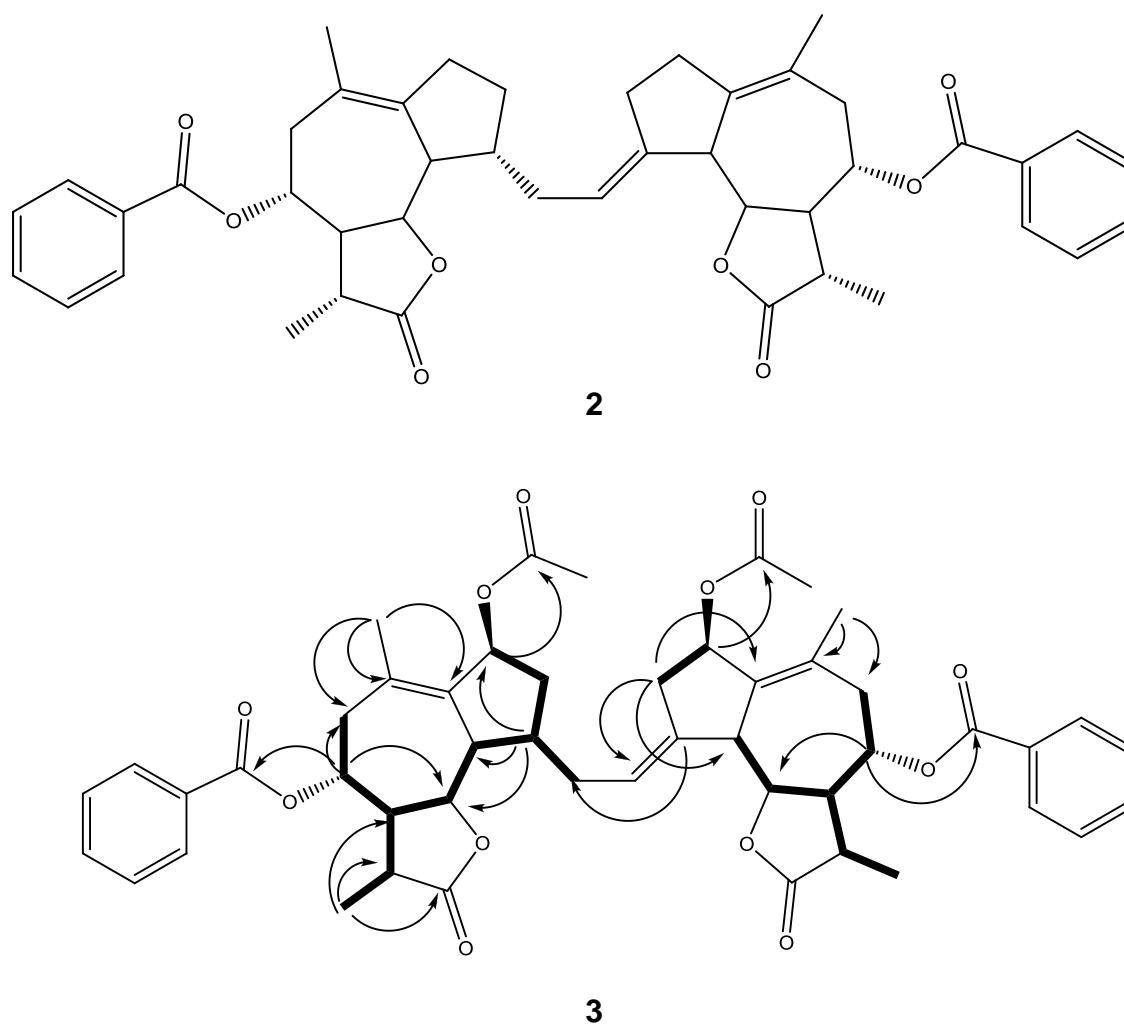


Figura 17. Estructura química del compuesto 2 (birsonina A) y 3 (birsonina B), con actividad hipoglucemiante y anti-AGEs, y la correlación HMBC del compuesto 2 (correlaciones ^1H - ^1H COSY (negrita) y ^1H - ^{13}C HMBC (flecha))

El compuesto 3 (birsonina B), se obtuvo como un gel incoloro. El HRFABMS (espectro de masas de alta resolución) mostró un ion a 704.3928 m/z sugiriendo la fórmula molecular $\text{C}_{44}\text{H}_{48}\text{O}_8$ concordando con los espectros de RMN de ^{13}C y el experimento DEPT. Su espectro de IR mostró bandas características en 1724 (γ -lactona), 1743 (carbonilo éster) y 1624 (doble enlace).

La estructura del compuesto 3 se dedujo de los datos de RMN, los cuales están estrechamente relacionados con birsonina A, estos mostraron similitudes en los desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento, y en las correlaciones 2D-RMN.

Al comparar los datos de RMN de ^{13}C , el compuesto 3 no presentó un resto acilo (δ_{H} 5.54 H-2, δ_{C} 65.08, C-2), además solo presentó dos señales para grupos carbonilos a diferencia del compuesto 2 el cual presentó 3 señales, los espectros correspondientes a los compuestos 2 y 3 se pueden observar en los Anexos C y D respectivamente. Por lo tanto, la estructura del compuesto 3 fue denominada como birsonina B (Figura 17).

VIII.9.1. Actividad hipoglucemiante y anti-AGEs de birsonina A y B

La administración oral de birsonina A en una dosis de 30 mg / kg redujo la glucosa sanguínea en ratones diabéticos tipo 1, de 371.28 mg/dl (al tiempo cero) a 215.38 mg dl (6 h después del suministro) (Tabla 24). Al administrar birsonina B (30 mg/kg) se observó una reducción en el nivel de glucosa sanguínea de 317.82 mg / dl a 210.34 mg / dl en el mismo intervalo. Cuando se administró glibenclamida a los ratones diabéticos tipo 1, se obtuvo una reducción de 351.46 mg/dl a 203.30 mg/dl después de seis horas de haber sido suministrado el tratamiento (Tabla 24).

Cuando se suministró birsonina A (30 mg / kg) a ratones diabéticos tipo 2, ésta produjo su mayor efecto hipoglucemiante después de seis horas de haberse iniciado la prueba, reduciendo los niveles de glucosa de 214.76 mg / dl (tiempo 0) a 113.67 mg / dl (Tabla 24). Al suministrar birsonina B a la misma dosis, ésta redujo la glucosa sanguínea de 256.23 mg / dl a 129.34 md/dl en el mismo intervalo. Al observar los resultados referentes a la glibenclamida, ésta redujo la glucosa en sangre de 249.53 (tiempo 0) a 148.51 después de seis horas de haber sido suministrado el tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 24. Efecto de birsonina A y B en los niveles de glucosa sanguínea en ratones con diabetes tipo 1 y tipo 2 (continúa).

| Niveles de glucosa en sangre (mg/dl) a diferentes horas | | | | | | | |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Grupo | Dosis (mg/kg) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 12 |
| Control normal | -- | 104.12 ± 2.54 | 106.56 ± 4.73 | 101.76 ± 2.95 | 108.32 ± 3.73 | 105.87 ± 2.65 | 100.67 ± 3.21 |
| No-diabético + Birsonina A | 20 | 103.19 ± 2.68 | 85.13 ± 5.24 | 66.19 ± 2.19 ^a | 50.21 ± 1.96 | 59.65 ± 2.21 ^a | 70.36 ± 3.45 ^a |
| | 30 | 102.37 ± 1.34 | 71.65 ± 4.46 | 46.74 ± 3.10 ^a | 43.08 ± 2.28 ^a | 50.48 ± 2.54 ^a | 61.97 ± 1.79 ^a |
| No-diabético + Birsonina B | 20 | 101.56 ± 1.97 | 87.44 ± 3.78 | 68.29 ± 2.43 ^a | 56.84 ± 1.39 ^a | 60.37 ± 1.96 ^a | 73.10 ± 2.64 ^a |
| | 30 | 104.06 ± 1.51 | 79.38 ± 1.37 | 51.32 ± 2.46 ^a | 53.17 ± 3.54 ^a | 56.78 ± 1.54 ^a | 60.23 ± 2.32 ^a |
| No - diabético + GB | 4.0 | 99.56 ± 5.19 | 92.49 ± 5.22 | 89.67 ± 4.39 | 88.13 ± 4.73 | 89.21 ± 3.89 | 98.37 ± 2.76 |
| Diabético tipo 1 control | -- | 354.14 ± 3.24 | 358.21 ± 3.73 | 360.12 ± 4.52 | 357.31 ± 5.39 | 361.27 ± 4.62 | 359.21 ± 4.19 |
| Diabético tipo 2 control | -- | 267.31 ± 1.18 | 265.39 ± 2.89 | 264.87 ± 3.54 | 267.28 ± 4.86 | 269.04 ± 5.41 | 266.47 ± 5.31 |

Las medias y sus errores estándar fueron calculados para grupos de seis ratones. ^ap<0.05 cuando se comparó con el grupo control normal, ^bp<0.05 cuando se comparó con el grupo control diabético. (GB): Glibenclamida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 24. Efecto de birsonina A y B en los niveles de glucosa sanguínea en ratones con diabetes tipo 1 y tipo 2 (continuación).

| Niveles de glucosa en sangre (mg/dl) a diferentes horas | | | | | | | |
|---|------------------|---------------|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Grupo | Dosis (mg/kg) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 12 |
| Diabético tipo 1 + Birsonina A | 20 | 371.28 ± 4.23 | 310.41 ± 5.76 | 263.52 ± 3.23 ^b | 215.38 ± 4.79 ^b | 241.10 ± 6.18 ^b | 266.35 ± 3.63 ^b |
| | 30 | 388.11 ± 3.72 | 309.41 ± 4.30 | 259.13 ± 5.67 ^b | 210.73 ± 4.58 ^b | 239.53 ± 5.27 ^b | 261.27 ± 4.08 ^b |
| Diabético tipo1 + Birsonina B | 20 | 335.57 ± 5.29 | 291.53 ± 3.48 | 263.21 ± 5.76 ^b | 232.18 ± 4.83 ^b | 248.32 ± 4.39 ^b | 260.52 ± 2.93 ^b |
| | 30 | 317.82 ± 4.30 | 267.17 ± 5.79 | 224.62 ± 2.50 ^b | 210.34 ± 4.95 ^b | 225.47 ± 2.18 ^b | 242.71 ± 3.46 ^b |
| Diabético tipo 1 + GB | 4.0 | 351.46 ± 5.79 | 276.78 ± 6.87 | 205.19 ± 2.59 ^b | 203.30 ± 2.94 ^b | 232.57 ± 1.98 ^b | 280.17 ± 2.83 ^b |
| Diabético tipo 2 + Birsonina A | 20 | 236.23 ± 4.79 | 186.67 ± 2.98 | 160.35 ± 1.78 ^b | 132.39 ± 3.89 ^b | 147.97 ± 4.39 ^b | 163.76 ± 4.912 ^b |
| | 30 | 214.76 ± 5.72 | 164.38 ± 2.81 | 134.76 ± 2.50 ^b | 113.67 ± 4.28 ^b | 127.41 ± 2.65 ^b | 137.60 ± 4.13 ^b |
| Diabético tipo 2 + Birsonina B | 20 | 245.90 ± 2.98 | 201.37 ± 3.75 | 183.48 ± 5.78 ^b | 130.26 ± 4.83 ^b | 171.32 ± 4.39 ^a | 183.52 ± 2.93 ^a |
| | 30 | 256.23 ± 2.16 | 199.12 ± 3.14 | 170.62 ± 3.51 ^b | 129.34 ± 4.95 ^b | 158.47 ± 2.18 ^a | 162.71 ± 3.46 ^a |
| Diabético tipo 2 + GB | 4.0 | 249.53 ± 1.97 | 240.34 ± 1.97 | 187.71 ± 3.67 ^b | 148.51 ± 5.31 ^b | 99.50 ± 2.68 ^b | 128.52 ± 4.87 ^b |

Las medias y sus errores estándar fueron calculados para grupos de seis ratones. ^ap<0.05 cuando se comparó con el grupo control normal, ^bp<0.05 cuando se comparó con el grupo control diabético. (GB): Glibenclamida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de determinar el efecto inhibitorio de birsonina A y B sobre la formación de AGEs, se llevaron a cabo ensayos basados en la inhibición de la fluorescencia generada por los AGEs, así como ensayos basados en la inhibición de la unión AGEs-proteína utilizando floroglucinol y aminoguanidina. Al evaluar la actividad inhibitoria de A y B en la formación de AGEs inducidos con glucosa, se obtuvieron valores de IC₅₀ de 0.318, 0.286 y 0.323 mg/ml, para birsonina A, birsonina B y aminoguanidina (utilizada como control positivo), respectivamente, después de la incubación a 37 °C durante 15 días (Tabla 25).

Tabla 25. Efecto inhibitorio de birsonina A y B, y de la aminoguanidina en la formación de los productos finales de glicación avanzada (AGEs) *in vitro* inducidos por glucosa, metilglioxal y ribosa.

| Inductor | Tratamiento | AGEs IC₅₀ (mg/ml) |
|-----------------|--------------------|---|
| Glucosa | A | 0.418 ± 0.027 |
| | B | 0.386 ± 0.049 |
| | Aminoguanidina | 0.323 ± 0.075 |
| Metilglioxal | Floroglucinol | 0.071 ± 0.0032 |
| | A | 0.301 ± 0.014 |
| | B | 0.278 ± 0.026 |
| | Aminoguanidina | 0.195 ± 0.015 |
| Lizosima/ribosa | A | 77.8% |
| | B | 69.4% |
| | Aminoguanidina | 58.3% |

Los datos se muestran como las medias ±. Las pruebas se realizaron por triplicado.

La inhibición de la glucosilación de proteínas inducida por Metilglioxal se evaluó en birsonina A y B, mostraron un IC₅₀ de 0.301, 0.278 mg/ml, respectivamente, en comparación con el floroglucinol y la aminoguanidina utilizados como controles, los cuales tuvieron un IC₅₀ de 0.071 y 0.195 mg/ml, respectivamente (Tabla 25). Además, el efecto de A y B sobre la formación de AGEs inducidos con ribosa produjo una inhibición del 77.8 y 69.4%, respectivamente, en comparación con la aminoguanidina, la cual mostró una inhibición de 58.3% en la prueba de Amadorin, que se utiliza para evaluar la capacidad de los compuestos para inhibir la reacción de Amadori.

Lo anterior indica que birsonina A y B reducen significativamente la glucosa en sangre en ratones diabéticos tipo 1 y 2, en comparación con los ratones diabéticos control. El suministro oral de cualquiera de éstos compuestos producen efectos hipoglucémicos en ratones normales, en ratones diabéticos tipo 1 inducidos con estreptozotocina y en ratones diabéticos tipo 2 inducidos con estreptozotocina-nicotinamida. Además ambos compuestos presentaron actividad en la prueba Amadorin, inhibiendo la formación de AGEs.

Los resultados obtenidos muestran que birsonina A y B inhiben la formación de AGEs en el sistema metilglioxal-BSA y también pueden actuar inhibiendo la formación de dicarbonilos, los cuales son intermediarios en la formación de AGEs (Lishuang y col.2010).

VIII.10. Aislamiento y purificación de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana

El extracto de hexano de la semilla de *B. crassifolia* se colocó en una columna empacada con sílica gel de malla 70-230, y se eluyó con éter de petróleo:acetona:hexano (2:1:0.5), de donde se obtuvieron siete fracciones (NSH1-NSH7), la fracción NSH3 fue la única que presentó actividad antimicrobiana (el diagrama de aislamiento y purificación de las fracciones con actividad antimicrobiana se muestra en la Figura 18).

VIII.10.1. Biofraccionamiento de la subfracción NSH3

NSH3 se colocó en una columna empacada con sílica gel y se eluyó con cloroformo:acetato de etilo (11:2), de donde se obtuvieron cinco subfracciones (NSH31-NSH35), resultando activa en la prueba antimicrobiana la subfracción NSH34.

VIII.10.2. Biofraccionamiento de la subfracción NSH34

La subfracción NSH34 se colocó en una columna cromatográfica con sílica gel, y se eluyó con cloruro de metileno:cloroformo (3:1.5), de donde se obtuvieron cuatro subfracciones (NSH341-NSH344) de las cuales solo la NSH341 presentó actividad.

VIII.10.3. Biofraccionamiento de la subfracción NSH341

NSH341 fue purificada mediante placa preparativa, utilizando éter de petróleo:acetato de etilo (1:4), de donde se obtuvieron cuatro subfracciones (NSH3411- NSH3414), y resultó activa la subfracción NSH3411.

VIII.10.4. Biofraccionamiento de la subfracción NSH3411

La fracción NSH3411 se purificó finalmente mediante cromatografía en columna con Sephadex LH-20, para lo cual se utilizó cloroformo:metanol 10:1-5:1) y se obtuvieron los compuestos 4 y 5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

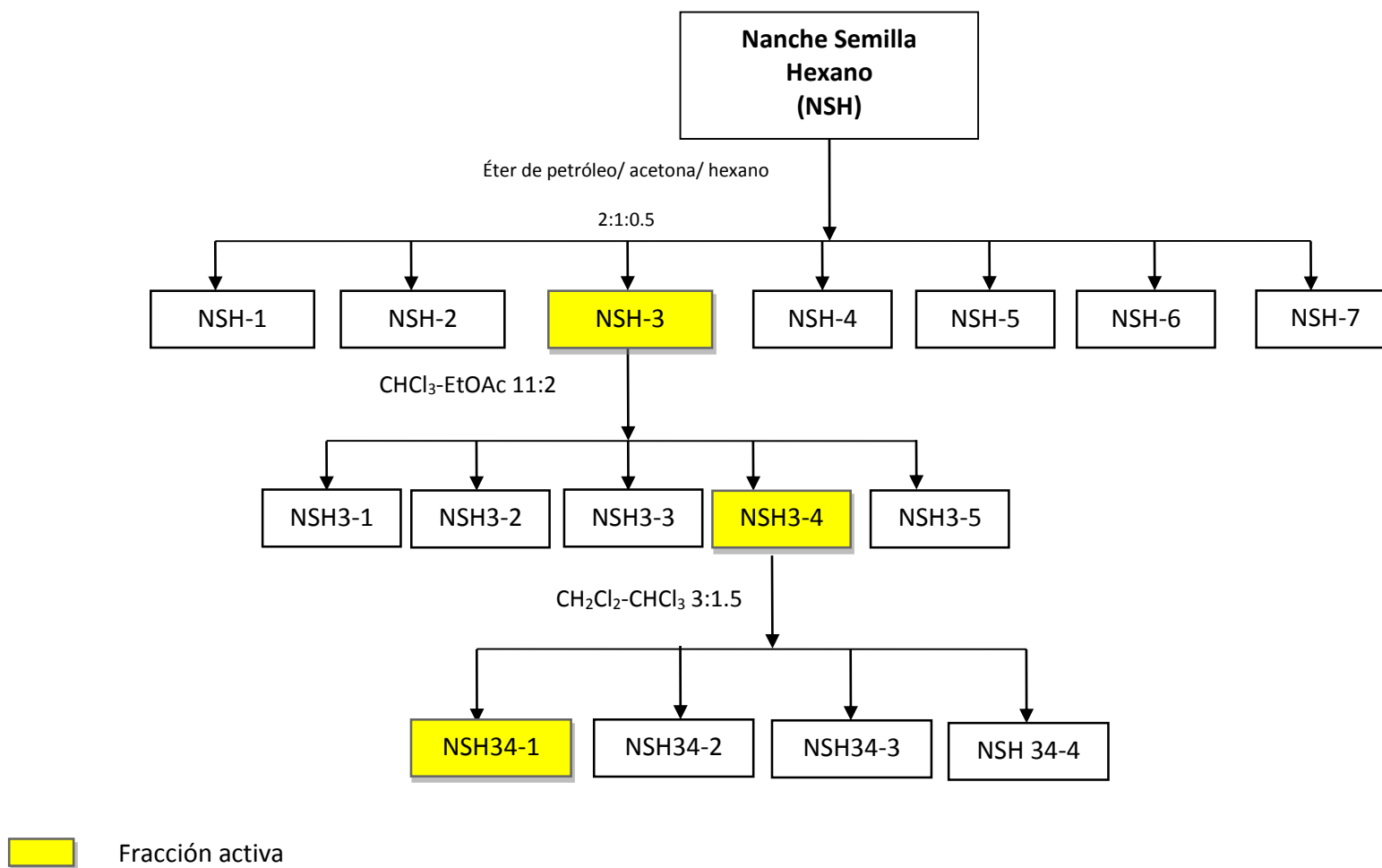


Figura 18. Diagrama de aislamiento y purificación de las fracciones con actividad antimicrobiana

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

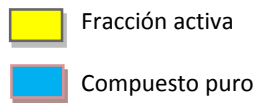
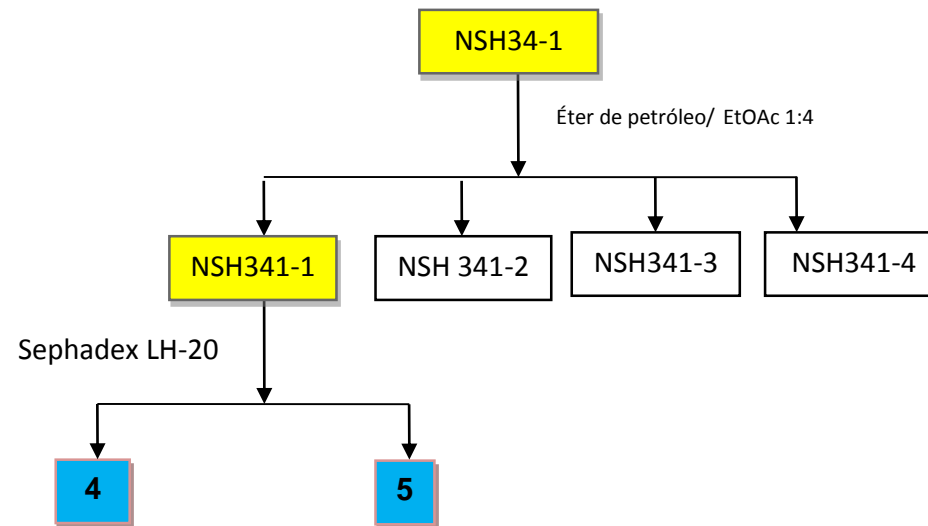


Figura 18. Diagrama de aislamiento y purificación de las fracciones con actividad antimicrobiana (continuación).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.11. Elucidación estructural del compuesto 4 con actividad antimicrobiana

El compuesto 4 se obtuvo como un aceite amarillento: (CHCl₃, c 0.68); IR 2924, 2854, 1710, 1645, 1460, 1375, 1163, 1096, 895 cm⁻¹; *m/z* 561.9254 [M+H]⁺, (calc, for C₃₆H₆₄O₄, 561.5039); *m/z* 543 (17), 531 (19), 517 (23), 511 (11) 507 (39), 487 (51), 473 (38), 459 (30), 359 (100), 331 (37), 311 (7), 242 (54), 223 (8), 194 (67), 146 (12), 124 (4), 122 (3), 109 (6).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ: 0.96 (m, H-1a), 1.45 (m, H-1a), 1.74 (m, H-1b), 1.46 (m, H-2a), 1.78 (m, H-2a), 1.84 (m, H-2b), 1.58 (m, H-3b), 1.22 (m, H-3a), 1.34 (m, H-5), 1.70 (m, H-6), 1.33 (1H, m, 7a), 1.39 (m, H-7b), H-8), 2.06 (m, H-9), 2.35 (ddd, *J* = 15, 7, 3.5 Hz, H-11a), 2.20 (ddd, *J* = 15, 9, 7 Hz, H-11b), 5.32 (1H, t-like, *J* = 7 Hz, H-12), 2.30 (dd, *J* = 14.7, 5.9 Hz, H-14), 3.74 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-15), 0.96 (3H, br s, H-16), 4.08 (2H, d, *J* = 2.8 Hz, H-17), 1.17 (s, H-18), 1.18 (s, H-19), 0.75 (s, H-20), 2.20 (s, COOMe), 1.18-1.25 (CH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ: 33.21 (C-1), 18.23 (C-2), 34.65 (C-3), 41.64 (C-4), 52.24 (C-5), 25.71 (C-6), 39.89 (C-7), 37.82 (C-8), 54.32 (C-9), 36.81 (C-10), 24.16 (C-11), 129.89 (C-12), 131.18 (C-13), 43.21 (C-14), 68.72 (C-15), 16.52 (C-16), 62.54 (C-17), 33.71 (C-18), 22.35 (C-19), 14.23 (C-20), 172.13 (COOMe), 20.98 (COOMe), 173.07 (CH₂-COO-CH₂).

El compuesto 4 mostró un ión molecular a 588.9254 *m/z* y la presencia de 38 átomos de carbono; el espectro de RMN de ¹³C sugirió la fórmula molecular C₃₈H₆₈O₄. Los experimentos DEPT clasificaron las señales protonadas de carbono en seis metilos, veintitrés metilenos, cuatro metinos y cinco carbonos cuaternarios. Este compuesto mostró 37 señales de carbono, 20 de las cuales son típicas de un esqueleto de labdano, mientras que las otras 17 fueron asignadas a un ácido graso esterificado.

El espectro de IR del compuesto 4 mostró bandas de absorción a 1645 cm⁻¹, 1710 y 1163 cm⁻¹ correspondientes a un grupo éster, esto se confirmó en el espectro de RMN de ¹³C por la presencia de señales correspondientes a carbonos cuaternarios a δ_c 172.13 y δ_c 173.07.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un análisis más detallado se realizó mediante RMN de ^1H , donde se pudieron observar señales de cuatro metilos terciarios (δ_{H} 0.96, s; 1.18, s; 0.75, s), un doble enlace trisustituido (δ_{H} 5.32, t, $J = 6.5$ Hz) y dos grupos acetoxilo (δ_{H} 2.02, s y 2.04, s). En el espectro de RMN de ^{13}C se observaron señales a δ_{C} 129.89 y δ_{C} 131.18 correspondientes a dos carbonos olefínicos. Los análisis de RMN 2D (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, HSQC y HMBC) del compuesto 4 revelaron un esqueleto de un diterpeno labdano (Bohlmann y Czerson, 1979; Timmermann y *col.*1986).

Las correlaciones observadas en el espectro HMBC mostraron que el H-17 está correlacionado con el C-7, C-8 y C-9 (δ_{C} 54.32), esto indicó que la cadena lateral se encuentra en el C-9; un doble enlace tri sustituido fue localizado en C13 y C-14 (δ_{C} 131.18). El doble enlace en C-13 fue asignado al realizar una comparación de los datos de RMN con compuestos similares (Urones y *col.*1995; Su y *col.*1996). También se logró detectar la presencia de un gran número de grupos metileno (22.7-34.4), lo que sugirió a su vez la presencia de ácidos grasos esterificados derivados del labdano en C-15. Lo anterior se confirmó, debido a que se observaron correlaciones en el HMBC entre los protones del grupo metileno H₂-15 (δ_{H} 4.08, 2H, d, $J = 7.2$ Hz), la cadena del grupo metileno y del carbono cuaternario δ_{C} 173.07. El análisis de ^1H - ^1H COSY mostró una correlación entre H5/H6, H6/H7, H11/H12 (Figura 19). El grupo metilo (δ_{C} 16.52) y el gran número de grupos metileno (δ_{C} 22.6-34.5) (DEPT) sugirieron la presencia de un ácido graso esterificado con un derivado labdano en C-15. Por lo anterior, el compuesto 4 fue identificado como labda-17-acetoxi-13E-en-15-palmitato.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

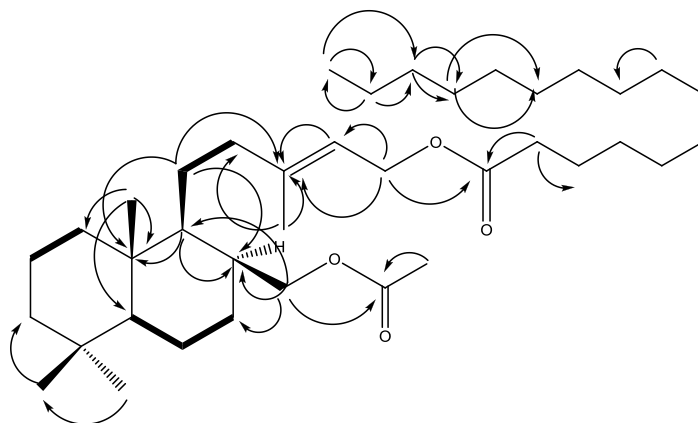


Figura 19. Correlaciones ^1H - ^1H COSY (negrita) y ^1H - ^{13}C HMBC (flecha) del compuesto 4.

Los espectros obtenidos de RMN de ^1H , y de ^{13}C , así como ^1H - ^1H , COSY y HMBC del compuesto 5 permitieron su identificación como: Labda-8 (17),13E-dien-19-carboxi-15-yl palmitato (Figura 20), el cual fue aislado previamente a partir de *Cretan propóleos* (Peopova y col.2009). Este compuesto exhibió una débil actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

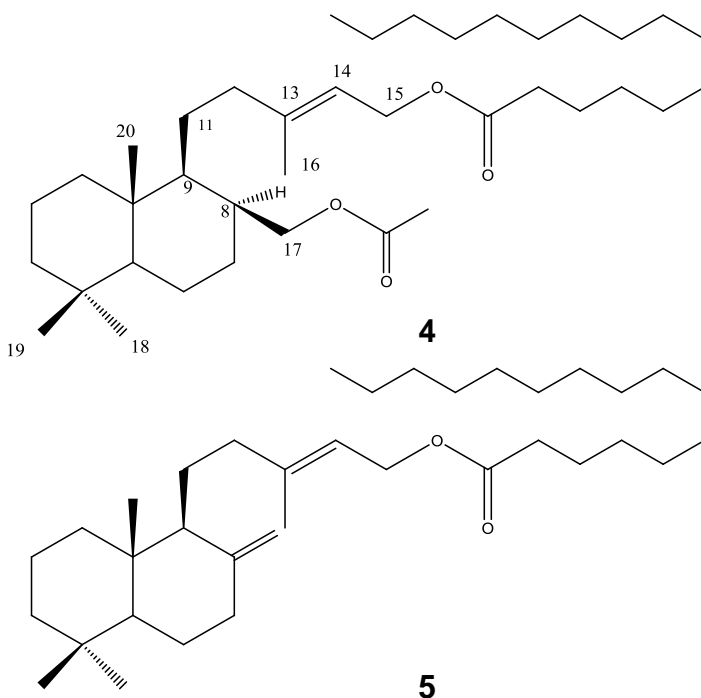


Figura 20. Compuestos 4 y 5 aislados de *B. crassifolia* con actividad antimicrobiana.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.12. Actividad antimicrobiana del compuesto 4 aislado de *B. crassifolia*

La actividad antimicrobiana del compuesto 4 se muestra en la Tabla 26, en la cual se puede observar que labda-7(8)-17-acetoxi-15-palmitato presentó mejor actividad antimicrobiana frente a *Salmonella paratyphi* (23.87 ± 0.65 mm), seguido de *Pseudomonas aeruginosa* ($21.45 \pm 0,53$ mm), *S. typhi* (20.72 ± 0.56 mm) y *B. subtilis* (20.89 ± 2.90 mm), Martínez y col. 1999, sugieren que los diterpenos deben su actividad antimicrobiana a su capacidad para dañar la membrana celular de las bacterias.

Tabla 26. Actividad antimicrobiana del compuesto 4 obtenido de las semillas de *Byrsonima crassifolia*.

| Microorganismos | Zona de inhibición (mm) | CMI ($\mu\text{g/ml}$) | CMB ($\mu\text{g/ml}$) |
|---|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Bacterias Gram-positivas | | | |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 | 18.76 ± 0.68 | 38.34 ± 1.87 | 500 |
| <i>B. megaterium</i> ATCC 12872 | 19.20 ± 3.42 | 43.26 ± 2.76 | 500 |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | 20.89 ± 2.90 | 41.28 ± 3.29 | 500 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | 17.95 ± 1.78 | 36.79 ± 1.87 | 500 |
| <i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341 | 12.17 ± 1.23 | 58.84 ± 4.76 | 1000 |
| Bacterias Gram-negativas | | | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 13.35 ± 1.43 | 69.20 ± 2.76 | 1000 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 | 21.45 ± 0.53 | 32.41 ± 4.11 | 500 |
| <i>Salmonella paratyphi</i> ATCC 6539 | 23.87 ± 0.65 | 20.27 ± 1.04 | 250 |
| <i>S. typhi</i> ATCC 43971 | 20.72 ± 0.56 | 18.79 ± 2.54 | 250 |
| <i>S. dysenteriae</i> ATCC 13313 | 16.52 ± 1.88 | 45.67 ± 3.87 | 500 |
| <i>Vibrio mimicus</i> ATCC 33654 | 13.08 ± 4.12 | 66.78 ± 5.14 | 1000 |
| <i>V. parahemolyticus</i> ATCC 43996 | 11.87 ± 4.20 | 70.12 ± 4.98 | 1000 |

CMI: concentración mínima inhibitoria, CMB: concentración mínima bacteriana.

Por lo que resultados obtenidos sugieren que la actividad antimicrobiana de la semilla de *Byrsonima crassifolia* se debe principalmente a la presencia de compuestos diterpeno-labdano.

CONCLUSIONES

- Los extractos metanólicos de la fruta y la semilla de tres diferentes especies de *Byrsonimas* (*Byrsonima crassifolia*, *B. bucidaefolia* y *B. bahiana*), contienen apigenina, kaempferol y epigalacatequina.
- El fruto y la semilla de las tres especies de *Byrsonima* estudiadas tienen contenidos de fenoles totales similares entre sí.
- La epitelización de los grupos tratados tópicamente con diferentes especies de *Byrsonima* y con nitrofurazona fue mejor, en comparación con la epitelización de los grupos tratados con pomada simple.
- El extracto de hexano de las semillas de *Byrsonima crassifolia*, tienen una actividad antiinflamatoria comparable con la de los fármacos utilizados como referencia en diferentes modelos inflamatorios tanto agudos como crónicos.
- El extracto de hexano de las semillas de *B. crassifolia* puede ser un candidato potencial para acelerar la cicatrización de heridas dérmicas, debido a su influencia positiva en las diversas fases del proceso de curación en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina.
- El compuesto 1, llamado birsonimadiol, aislado de semillas de *B. crassifolia*, presentó una actividad antiinflamatoria comparable a la de la dexametasona utilizada como fármaco control (76 y 88%, respectivamente).
- Se identificaron dos nuevos compuestos birsonina A y B los cuales son efectivos para reducir la glucosa en sangre en ratas con diabetes tipo 1 y tipo 2 inducidas con estreptozotocina. Los dos compuestos inhiben eficazmente la formación de los productos finales de glicación avanzada.

CONCLUSIONES

- Se aisló e identificó el compuesto labda-17-acetoxi-13E-en-15-palmitato, el cual presentó actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos patógenos Gram positivos y negativos.
- Finalmente, la semilla de *B. crassifolia* puede ser considerada un efectivo antidiabético, el cual puede ser utilizado en el tratamiento de algunas de las complicaciones de la diabetes.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta A.G., Frías L.G., Reyes M.R., Vargas H.V., Suárez C.J. (2011) Radicales libres y mecanismos de daño oxidativo en la DM. Rev. Fac. Med.UNAM. **54**(3):46-53.

Actis D.S., Rebolledo R. O. (2000) La glicación y glicosilación de las lipoproteínas, su importancia en la diabetes mellitus. Med. **60**:645-656.

Andrade C., Heinrich M. (2005) Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. J. Ethnopharmacol. **99**: 325-348.

Argente J.M., Muñoz T.C. (1999) Diabetes mellitus tipo 1. In: Hernández R.M., Sastre G.A. (eds) Tratado de nutrición. 1ra ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, pp 935-956.

Argueta V.A., Cano A.L.M., Rodarte M.E. (1994) Atlas de las plantas medicinales tradicionales Mexicanas II. Instituto Nacional Indigenista. México, pp, 1032-1033.

Baynes J.W., Dominiczak M.H. (2005) Bioquímica Médica. 2da ed. Elsevier. Madrid España, pp 277-304

Bejar E., Malone M.H. (1993) Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from México. Part I. J. Ethnopharmacol. **39**(2):141-158.

Belmont H.M., Levartovsky D., Goel A., Amin A., Giorno R., Rediske J., Skovron M.L., Abramson S.B. (1997) Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis. Rheum. **40**:1810-1816.

Bennett. (2007) Nuevos datos, perspectivas renovadas: Diabetes Atlas. Diabetes Voice. 1(52).

Blanes J.I., Lluch I., Morillas C., Nogueira J.M., Hernández A. (2002) Etiopatogenia del pie diabético. 2da ed. Madrid.Barcelona, pg 45-57.

Bohlmann F., Czerson H. (1979) Neue labdan- und pimaren-derivate aus *Palafoxia rosea*. Phytochemistry. **18**:115-118.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Burton K. (1956) A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62:315-323.

Campillo A.J. (2003) Páncreas endocrino. In: Córdova A. (ed). *Fisiología dinámica*. Barcelona Masson, pp 594-604.

Coppo N. B., Coppo J. A., Lazarte M. A. (2003) Intervalos de confianza para colesterol ligado a lipoproteínas de alta y baja densidad en suero de bovinos, equinos, porcinos y caninos. *Rev. Vet.* 1(14): 3-10.

Crunkhorn P., Meacock S.C.R. (1971) Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenan. *Br J. Pharmacol.* 42: 392-402.

Dai Y., Chan Y., Chu L., But P.P. (2002) Antiallergic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract from *Gleditsia sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 1179-1182.

De Castro P.S., Pérez A.J. (2006) *Manual de patología general*. 6ta ed. Elsevier Barcelona España, pp 551.

Diabetes atlas de la FID, 2012 5a edición.

Dubón P.M. (2013) Pie diabético. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 56(4):47-53.

Dunne M.W. (1990) Pathophysiology: Concepts of Altered Health States with Contributors. In: Porth C.M. (ed) Lippincott Philadelphia, pp 165-176.

Elgayyar M., Draughon F.A., Golden D.A., Mount J.N. (2000) Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food. Prot.* 64:1019-1024.

Elson L.A., Morgan W.T.J. (1933) A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem. J.* 27: 1824-1828.

España S. M., Velez D. M. P., Cáceres A. (1994) Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 5. Vibriocidal activity of five American plants used to treat diarrhea. *Fitoterapia* 65(3): 273-274.

España, S.M., Vélez, P.V., Cáceres, A. 1994. Flores J. (2004) *Farmacología Humana*. 4ta ed. Masson México, pp 960-966.

Fracasso J.F., Nunes-de-Souza R.L., Teixeira C.E., Castro R.C., Lepera E.Z., Silva R.F. (1996) Effect of dipyrone, L-NAME and L-arginine on endotoxin-induced rat paw edema. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:1543-1548.

Freeman D.J., Norrie J., Caslake M.J., Gaw A., Ford I., Lowe G.D. (2002) C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes.* 51:1596-1600.

Galvez I.V., Lopez G.M., Martin V.A. (2007) Bases de fisiología. 2da. España Tebar, pp 452-456.

Gao H., Zhao F., Chen G., Chen S., Yu Y., Yao Z., Lau B.W.C., Wang Z., Li L., Yao X. (2009) Bidesmoside triterpenoid glycosides from *Stauntonia chinensis* and relationship to anti-inflammation. *Phytochemistry.* 70: 795-806.

Gárriz P.I. (1986) Estudio de algunos caracteres morfológicos del nanche (*Byrsonima crassifolia*). *Ctro. Agr.* 8(4):82-91.

Gay S., Gay R.E., Koopman W.J. (1993) Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction. *Ann. Rheum. Dis.* 52: S39-S47.

Gaydos J.M., Harrington B.J. (1982) Agar disk diffusion for the quality control testing of *Autobac* elution disks. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 21:516–518.

Gepdiremen A., Mshvildadze V., Suleyman H., Elias R. (2004) Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Hedera cochica* in rats. *J Ethnopharmacol.* 94: 191-195.

Godo A., de Heras B., Vivas J.M., Villar A. (2000) Anti-inflammatory properties of a lipid fraction obtained from *Sideritis javalambrensis*. *Biol. Pharm. Bull.* 23(10):1193-1197.

González C.A., Elizondo A.S., Gutiérrez R.G., León P.J. (2011) Implicaciones fisiopatológicas entre inflamación crónica y el desarrollo de diabetes y obesidad. *Cir. Cir.* 79(2):209-216.

GonzalezGonzález F.F., Castello P.R., Gagliardino J.J., Rossi, F.C. (2000) La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia al día Internacional.* 3(2):1-17.

Greenwald R.A. (1991) Animal model for evaluation of arthritic drugs. *Methods. Find. Exp Clin. Pharmacol.* 13:75-79.

Guyton Hall. (2006). Tratado de fisiología médica. 11ª. España Elsevier, pp 961-977.

Hon K., Zeyu Q., Hashimoto M., Yamamoto K., Kimura T. (2009) Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin induced diabetic rats. *Am. J. Surg.* **197**: 503-509.

Hotamisligil G.S., Spiegelman B.M., (1993). Adipose of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.***259**:87-91.

Itokawa H., Yoshimoto S., Morita H. (1988) Diterpenes from the rhizomes of *Alpinia formosana*. *Phytochemistry.* **27**: 435-438.

Kumari G.N.K., Masilamani S., Ganesh M. R., Aravind S. (2003) Microbial transformation of zanzanin-D. *Phytochemistry.* **62**: 1101-1104.

Kuwano H., Vano K., Ohano S., Ikebe M., Kitamura K., Toh Y., Mori M., Sugimaehi K. (1994) Dipyrindamole inhibits early wound healing in rat skin incisions. *J. Surg. Res.* **56**: 267-270.

Li X., Cai L., Wu C. (1997) Antimicrobial compounds from *Ceanothus americanus* against oral pathogens. *Phytochemistry.***46**: 97-102.

Li H., Wu X., Davey A., Wang J. (2011) Antihyperglycemic effects of Bacalin on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Phytother. Res.* **25**: 189-194.

Lishuang L. V., Xi S. L., Wang L. (2010) Stilbene glucoside from *Polygonum multiflorum* Thunb; A novel natural inhibitor of advanced glycation end product formation by trapping of methylglyoxal. *J. Agric. Food. Chem.* **58**: 2239-2245.

Liu H., Gu L. (2012) Phlorotannins from Brown algae (*Fucus vesiculosus*) inhibited the formation of advanced glycation endproducts by scavenging reactive carbonyls. *J. Agric. Food. Chem.* **60**: 1326-1334.

López de la Torre C.M., Gargallo F.M.A., Moreno E.B. (1997) Diagnóstico y tratamiento en enfermedades metabólicas. Madrid: Ediciones Díaz Santos.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.T. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* **193**: 265-276.

Manjunatha B.K., Vidya S.M., Krishna V., Mankani K.L., Jagadeesh S., Manohara Y.N. (2007) Comparative evaluation of wound healing potency of *Vitex L.* and *Vitex altissima L.* *Phytother. Res.* **21**: 457-461.

Midwood K.S., Williams L.V., Schwarzbauer J.E. (2004) Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**: 1031-1037.

Miranda G.L., Reza A.A. (2007) Obesidad, inflamación y diabetes. *Gac Méd Méx.* **144**(1):39-46.

Morris C.J. (2003) Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods. Mol. Biol.* **225**: 115-121.

Nobecourt E., Zeng J., Davies M.J., Brown B.E., Yadav S., Barter P.J., Rye K.A. (2008) Effects of cross-link breakers, glycation inhibitors and insulin sensitizers on HDL function and the non-enzymatic glycation of apolipoprotein A-I. *Diabetología.* **51**:1008-1017.

Palu A.K., Kalisi T., Palu K., Palu A., Hifo T. (2010) Fakatafe A forgotten art of traditional wound-healing using nonu leaves in the Friendly Islands of Tonga. *J Med. Food. Plants.* **2**: 27-33.

Patil C.R., Gadekar A.R., Patel P.N., Rambhade A., Surana S.J., Gaushal M.H. (2009) Dual effect of *Toxicodendron pubescens* on carragenin induced paw edema in rats. *Homeopathy.* **98**: 88-91.

Peng X., Zheng Z., Cheng K. W. (2008) Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food. Chem.* **106**: 475-481

Peopova, M.P., Chinou, I.B., Marekov I.N., Bankova, V.S. (2009) Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry.* **70**:1262-1271.

Pérez G.R.M (2008). Recent Progress in Medicinal Plants: Phytopharmacology and Therapeutic Values IV. Antihyperglycemic Agents from Plants. Cap 15. Vol. 22. Studium Press, pp 243-293.

Perez G.R.M., Muñoz R. A., Gomez G. Y., Bautista R. E. (2010) Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiglycation of *Byrsonima crassifolia* fruits. *Plant. Foods. Hum. Nutr.* **65**(4): 350-357.

Perianayagam J.B., Sharma S.K., Pillai K.K. (2006) Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* **104**: 410-414.

Piñon P., Kaski J.C. (2006) Inflammation, Atherosclerosis and Cardiovascular Disease Risk: PAPP-A, Lp-PLA2 and Cystatin C. New Insights or Redundant Information. *Rev. Esp Cardiol.* **59**(3):247-258.

Ramos R.H., Domingo M.J. (1994) Diabetes mellitus experimental. *Ciencia veterinaria*. **6**:347-377.

Rathi B., Pathi P.A., Baheti A.M. (2004) Evaluation of aqueous extract of pulp and seeds of *Moringa oleifera* for wound healing in albino rats. *J. Natur .Rem*. **4**:145-149.

Rosado P.J., Mendoza N.V. (2007) Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*.**32**(2):58-69.

Sahgal G., Ramanathan S., Sasidharan S., Mordi M., Ismail S., Mansor S. (2009) In vitro antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic *Swieteniamahagoni* seed extracts. *Molecules*. **14**:4476-4485.

Sanchez R.A., Kaski C.J. (2001) Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria: perspectiva actual y futura. *Ver. Esp. Cardiol*. **54**(6):751-763.

Saneja A., Kaushik D., Khokra S.L., Kaushik P., Sharma C., Aneja K.R. (2009) Evaluation of activities of *Mitragyna parvifolia* fruit extract. *J. Nat. Prod*. **2**: 49-54.

Schiller S., Slover G., Dorfman A.A. (1961) A method for separation of acid mucopolysaccharides: Its application for the isolation of heparin from the skin of rats. *J. Biol. Chem*. **236**: 983-987.

Schneider W.C. (1957) Nucleic acids and derivatives. *Method Enzymol*. **3**: 680-684.

Shmidt M.I.(1999) Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (atherosclerosis risk in communities study): a chort study. *Lancet*. **353**:1649-1652.

Siddalingaswamy M., Rayaorth A., Khanum F. (2011) Anti-diabetic effects of cold and hot extracted virgin coconut oil. *J. Diabetes*. **1**: 118-123.

Silva E.M., Souza J.N.S., Rogez H., Rees J.F., Larondelle Y. (2007) Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food. Chem*. **101**:1012-1018.

Smit AJ., Lutgers HL. (2004) The clinical relevance of advanced glycation end products (AGE) and recent development in pharmaceutics to reduce AGE accumulation. *Curr. Med. Chem*.**11**:2767-2784.

Swingle K.F, Shideman F.E. (1972) Phases of inflammatory response to subcutaneous implantation of cotton pellet and other modifications by certain anti-inflammatory agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **183**: 226-234.

Szkudelski T. (2001) The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* **50**:536-546.

Tazaki Y., Tazaki M., Inoue T., Shimono M. (2011) Scanning and transmission electron microscopic observation of changes in cylindrical cytoplasmic processes of isolated single merkel cell. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* **52**: 69-76.

Tebar. (2009).La diabetes mellitus en la práctica clínica. Ed.Médica Panamericana.
Thompson W.M., Thompson S.J., Nussbaum L.R., McInnes R.R., Willard F.H. (2005). *Genética en medicina*. 5ta ed. Barcelona,España: Masson.

Timmermann B.N., Hoffmann J.J., Jolad S.D., Bates R.B., Stahaan T.J. (1986) Labdane diterpenoid from *Grindella discoidea* (Asteraceae). *Phytochemistry.* **25**: 1389-1392.

Tubaro A., Dri P., Del Bello G., Zilli C., Loggia D.R. (1985) The croton oil ear test revisited. *Agents Actions.* **17**: 347-349.

Vane J., Booting R. (1987) Inflammation and the mechanism of anti-inflammatory drugs. *FASEB. J.* **1**(2):89-96.

Vasudevan M., Parle M. (2007) Pharmacological actions of *Thespesia populnea* relevant to Alzheimer's diseases. *Phytomedicine.* **13**: 677-687.

Wang Z., Li L. (2009) The plasmid encoding Hsp47 enhances collagen expression and promotes skin wound healing in an alloxan-induced diabetic model. *Cell. Biol. Int.* **20**: 1-6.

Winter C.A., Risley E.A., Nuss W.G. (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**: 544-547.

Woessner J.R. (1961) The determination of hydroxyproline in tissues and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* **93**: 440-447.

Zhang F., Liao L., Ju Y., Song A., Liu Y. (2011) Neurochemical plasticity of nitric oxide synthase isoforms in neurogenic detrusor overactivity after spinal cord injury. *Neurochem Res.* **36**: 181-192.

Xu Y., Bai L., Liu Y., Yue L., Xu T., Xie S., Si Y., Zhou H., Liu T., Xu D. (2010) A new Triterpenoid Saponin from *Pulsatilla cernua*. *Molecules*.**15**(3):1891-1897.

Zhou J., Zeng S. Z. S., Zhou J., Jiang M., He Y. (2012) Hypoglycemic and hypolipidemic effects of ethanolic extract of *Mirabilis jalapa* L. root in normal and diabetic mice. *Evid.- Based Complement Alternat Med.*1-9 .

ANEXO A. Publicaciones

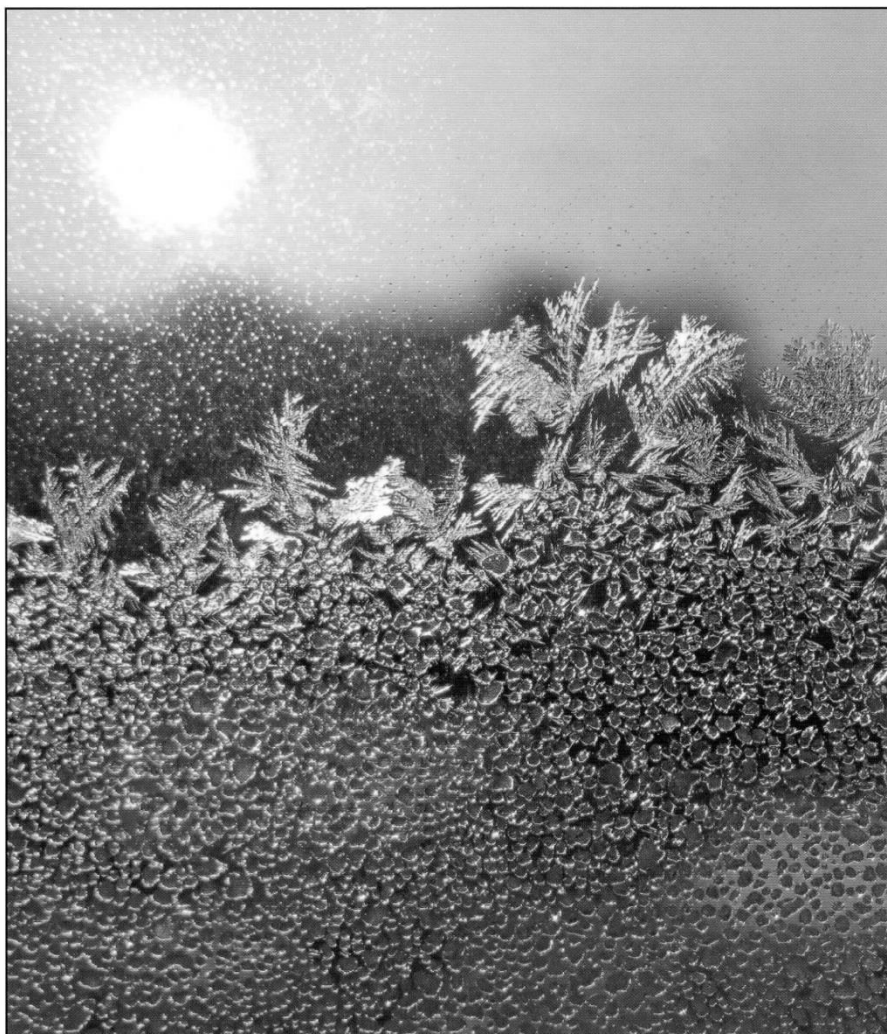
A. 1. Anti-inflammatory Activity of the Hexane Extract of *Byrsonima crassifolia* Seeds in Experimental Animal Models.

ALTERNATIVE THERAPIES

IN HEALTH AND MEDICINE

A PEER-REVIEWED JOURNAL · JAN/FEB 2013 · VOL. 19, NO. 1 · \$14.95

FOR THE ASSESSMENT OF INTESTINAL PERMEABILITY, SIZE MATTERS ·
ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF BYRSONIMA CRASSIFOLIA SEEDS ·
ARTERIAL BLOOD PRESSURE AND CARDIOVASCULAR RESPONSES TO
YOGA PRACTICE · EFFECTS FROM REPEATED ADMINISTRATION OF
HOMEOPATHIC REMEDIES IN INDIVIDUALS WITH CHEMICAL
SENSITIVITY · CHINESE MEDICINE FOR MENTAL DISORDER ·
CONVERSATIONS/ARISTO VOJDANI, PHD ·



Anti-inflammatory Activity of the Hexane Extract of *Byrsonima crassifolia* Seeds in Experimental Animal Models

Alethia Muñiz Ramirez, MCs; Luis B. Flores Cotera, PhD; Rosa Martha Perez Gutierrez, PhD

ABSTRACT

Context • *Byrsonima crassifolia* is a tropical tree, commonly known as *nance* and distributed widely in Mexico and Central and South America. Since pre-Hispanic times, the seeds of the fruits have been used in folklore medicine as an anti-inflammatory; however, currently no researchers have examined its potential pharmacological properties in scientific studies.

Objective • This study investigated the anti-inflammatory activity of extracts obtained with the solvents n-hexane, chloroform, and methanol from seeds of *B crassifolia*.

Design • The research team induced edemas in Wistar rats with 12-O-tetradecanoylphorbol (TPA), formaldehyde, carrageenan, and histamine to study the anti-inflammatory activity of the three organic extracts of seeds from *B crassifolia*. The team also used the cotton-pellet granuloma method to induce edemas in Wistar rats and study the inhibitory effect of the three extracts from *B crassifolia*. Finally, the team examined the participation of the nitric oxide (NO) system in the anti-inflammatory activity of the hexane extract of nance seeds (NS), diclofenac, and L-NAME as well as the effects of L-arginine and D-arginine on the anti-inflammatory actions of the compounds.

Setting • This research was conducted in the Laboratory of Research of Natural Products, School of Chemical Engineering, National Polytechnic Institute (IPN-ESIQIE) and Department of Biotechnology and Bioengineering, Cinvestav-IPN, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Mexico D.F., CP 07360, Mexico.

Outcome Measures • The research team measured the edema that the solvents caused, either in the ears of rats for tetradecanoylphorbol or in the paws for formaldehyde, carrageenan, and histamine. To study the antiproliferative effects of the extracts after implantation of the cotton-pellet granuloma, the team determined the wet and dry weights of the pellets, after drying at 70°C for 1 hour in the second case. To study the participation of the NO system in the anti-inflammatory activity of the

hexane extract of NS, diclofenac, and L-NAME, the research team measured paw edema.

Results • Among the extracts tested, NS showed the most significant anti-inflammatory activity. That extract decreased the paw edema that carrageenan, formaldehyde, histamine, and cotton pellet-induced, either by oral or topical administration at doses of 200 mg/kg, with 31%, 66%, 83%, and 58.2% inhibition respectively. In addition, NS inhibited the ear edema that TPA induced by 62%. Methanol and chloroform extracts produced a small effect, so the team does not present the results in this article. L-arginine, a precursor of NO, significantly inhibited the anti-inflammatory effects of NS and L-NAME, an anti-inflammatory drug, on mouse paw edema, but D-arginine did not. In contrast, neither D-arginine nor L-arginine inhibited the anti-inflammatory effects that diclofenac produced. These results indicate that the anti-inflammatory effect of NS on mouse paw edema occurs via the inhibition of NO production, as does the anti-inflammatory effect of L-NAME but not the anti-inflammatory effect of diclofenac. The anti-inflammatory activity of NS was comparable to standard anti-inflammatory drugs such as indomethacin, dexamethasone, and sodium diclofenac.

Conclusions • The hexane extract from seeds of *B crassifolia* exhibited significant anti-inflammatory activity in both acute and chronic inflammatory models with a partial contribution of inhibitory actions on some cellular inflammatory responses. The anti-inflammatory mechanism of NS may be related to the other isoform (iNOS). (*Altern Ther Health Med.* 2013;19(1):26-36.)

Alethia Muñiz Ramirez, MSc, is in the Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional No.2508, Col San Pedro Zacatenco CP.07360, México. Rosa Martha Perez Gutierrez, PhD, is head of the Laboratory of Research on Natural Products, School of Chemical Engineering and Extractive Industries, Unidad Profesional Adolfo Lopez Mateos, Zacatenco, Mexico. Luis B. Flores Cotera, PhD, Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional No.2508, Col San Pedro Zacatenco CP.07360, México.

Corresponding author: Rosa Martha Perez Gutierrez, PhD
E-mail address: rmpg@prodigy.net.mx

Byrsonima crassifolia (*B. crassifolia*) is a tropical tree, commonly known as *nance* and distributed widely in Mexico and Central and South America. Nance fruit is edible and bright yellow when ripened; it has a sweet taste and a slightly bitter aftertaste. In Mexico, nance is consumed as juice, liquor, jelly, and candy. Since pre-Hispanic times, it has been used as an anti-inflammatory.

Reports on ethnobotanical uses include (1) using the bark to promote bleeding in females, to facilitate childbirth, and to treat snakebites; (2) using the leaves as a diuretic, as an antipyretic, as a way to expel the placenta, and as a treatment for diarrhea; (3) using the fruit to treat fever and to induce a pleasant dizziness; (4) using the bark and branches to assist in tightening loose teeth; and (5) using the seeds to treat dysentery, heal wounds, and treat inflammation.¹ Phytochemical studies indicate that the nance plant contains esters,² epicatechins,³ and glycolipids.⁴ A pharmacological study of its leaf and bark extracts demonstrated spasmogenic effects.⁵ In another study, a chloroformic extract from the bark showed anti-inflammatory activity when the researchers evaluated it using the Croton oil model.⁶ Furthermore, Silva et al have determined the antioxidant activity of extracts from the leaves, fruits, and bark.⁷ The ethyl-acetate extract of its roots exhibit antibacterial activity.⁸ Also, the aqueous extract of its leaves inhibits some dermatophytes.⁹ The ethanol extract of the leaves shows trypanocidal activity against *Leishmania mexicana* promastigotes (trypanosome parasites).¹⁰

Based on the traditional uses of seeds from *B. crassifolia*, and given the lack of scientific studies on their potential pharmacological properties, the objective of this work was to study the anti-inflammatory activity of nance seed (NS) extracts obtained with hexane, chloroform, and methanol on acute and chronic phases of inflammation, and to also compare their anti-inflammatory effect potencies with indomethacin, dexamethasone, and diclofenac sodium, which are well known as anti-inflammatory drugs.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

B. crassifolia belong to the Malpighiaceae family. The research team collected the tree's fruit in Morelos, Mexico, in October 2010. The plant material was identified by biologist Martha Arreguin of the Department of Botany, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN). A voucher specimen (No. 8976) was deposited at the Herbario as reference.

Experimental Animals

The research team conducted the study in Wistar rats weighing between 150 g and 200 g and in CD1 mice weighing between 20 g and 25 g. The team procured all animals from the bioterio of ENCB-IPN and housed them in Microlon boxes in a controlled environment (temperature $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), with a standard laboratory diet and water ad libitum. Prior to the experiments, the team acclimatized the animals to the new environment for 3 days. The research team observed the ethical clearance in animal handling as described in the US National Institutes of Health's publication No. 85-23 (revised 1985).

Preparation of Extracts

The seeds of *B. crassifolia* were air-dried at 38°C and powdered. The dried powders (400 g), were extracted with 1.5 L of hexane, chloroform, and methanol of form consecutively under reflux condition for 3 hours using a Soxhlet apparatus followed by filtration through a Whatman No. 42 filter. The solvent was removed under reduced pressure at 30°C in a rotary evaporator (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) to obtain a residue used for the determination of its bioactivity. The averages for extract yields (weight/weight [w/w]) were as follows: 10.1% for hexane, 0.9% for chloroform, and 12.3% for methanol.

Anti-inflammatory Activity

Formaldehyde-, Carrageenan-, and Histamine-induced Paw Edema in Rats. Wistar albino rats of either sex (150-200 g) in 24 groups (each $n = 6$) were fasted for 12 hours prior to the induction of edema, but water was available ad libitum. Rats were deprived of water only during the experiment to ensure uniform hydration and to minimize variability in edematous response. Inflammation of the hind paw was induced by injecting 0.2 mL of formaldehyde (1% weight/volume; w/v),¹¹ or 0.1 mL of 1% carrageenan,¹² or 1 mg/mL of histamine¹³ in a normal isotonic saline solution into the subplantar region of the right-hind paw. The control group orally received a saline solution (0.1 mL), and the positive standard groups received indomethacin (10 mg/kg),¹⁴ or diclofenac sodium orally. The groups treated with NS extracts (hexanic, chloroformic, and methanolic) received doses at 50 mg/kg, 100 mg/kg, and 200 mg/kg, PO. All drug treatments were given 1 hour before the inflammatory injection. Edema was measured with a digital plethysmometer

Figure 1. General Procedure Used to Prepare Extracts of *B crassifolia* Seeds Using Hexane

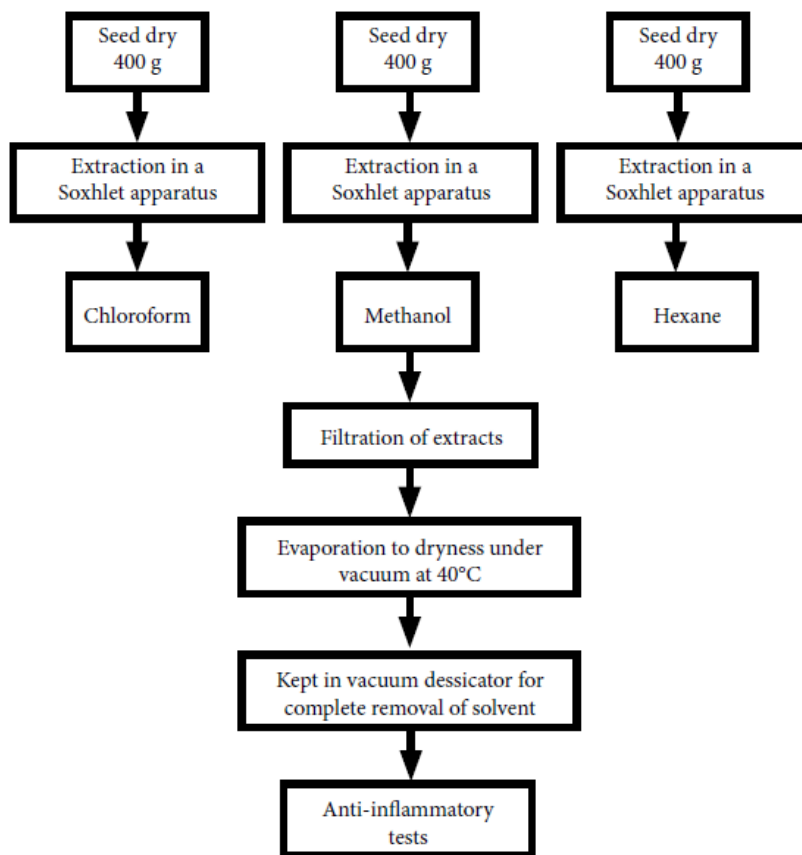


Table 1. Screening of the Anti-inflammatory Activity of the Hexane Extract From *B crassifolia* Seeds (NS) on Different Inflammation Models

| Treatment | Inflammatory drug | Standards |
|---|----------------------|-----------------------|
| Tetradecanoylphorbol-induced ear edema in mice | Tetradecanoylphorbol | Dexamethasone |
| Formaldehyde-induced paw edema in rats | Formaldehyde | Indomethacin |
| Carrageenan-induced paw edema in rats | Carrageenan | Indomethacin |
| Cotton-pellet granuloma test | Cotton pellet | Indomethacin |
| Histamine-induced paw edema in rats | Histamine | Diclofenac |
| Treatment of carrageenan edema with L-arginine and D-arginine | Carrageenan | Diclofenac and L-NAME |

(Ugo Basile Sri, Comerio, Italy) before and after the inflammatory injection (ie, at 0.5, 2, 4, and 6 hours).¹²

Edema was expressed as the relative increase in paw volume that the inflammatory injection induced (ie, the edema was proportional to the volume difference between 0 hours and the other times [0.5, 2, 4, and 6 hours]).

The percentage of rise in paw volume was as follows¹³:

$$\% \text{ rise} = \frac{V_t - V_c}{V_c} \times 100$$

Where: V_t = paw volume at time t

V_c = paw volume at time 0

Tetradecanoylphorbol-induced Ear Edema in Mice.

TPA (1 μ g) dissolved in acetone (20 μ L) was applied to the right ear of mice by means of a micropipette, delivering a volume of 10 μ L to the inner and outer surface of the ears. The samples of each extract (0.12 mg/ear, 0.25 mg/ear, 0.5 mg/ear), and the control (water) and dexamethasone (0.05 mg/ear) as the drug reference were applied topically about 30 minutes before TPA treatment. For ear thickness determinations, a pocket thickness gauge (Mitutoyo, Kawasaki, Japan) was applied to the tip of the ear. The gauge had a range of 0 mm to 9 mm, graduated at 0.01-mm intervals and modified to increase the contact surface area to reduce tension. The ear thickness measured before the first treatment and 6 hours after TPA treatment: (TPA + water and TPA + extract). The following values were then calculated: edema A as induced by TPA alone (B - A) and edema B as induced by TPA + extract (B - A).

$$\text{Inhibitory ratio (\%)} = \frac{[\text{edema A} - \text{edema B}]}{\text{edema A}} \times 100$$

Each value was the mean of individual determinations from five mice. The 50% inhibitory dose (ID_{50}) values were determined by probit-graphic interpolation for four dose levels.¹⁵

Cotton-pellet Granuloma Test. The effects of the hexane extract (NS) and indomethacin on the proliferative phase of induced-inflammation in rats were studied by a cotton-pellet granuloma test. A 200-mg/kg dose of NS and a 10-mg/kg dose of indomethacin were administered to two rats groups separately. The same volume of distilled water was applied to the control group. After 30 minutes, the animals were anesthetized with 25 mg/kg thiopental sodium (IP). Under sterile conditions, cotton pellets, weighing 7 mg each, were implanted at an interscapular distance under the skin. The same doses of NS and indomethacin were supplied once a day for a period of 7 days. The rats were sacrificed by a high anesthesia dose on the eighth day; the cotton pellets, surrounded by granuloma tissues, were dissected, and then the wet and dry weights of the pellets were determined (in the second case after drying them at 70°C for 1 hour).¹⁶ The antiproliferative effect of the NS was compared with the control and indomethacin groups.

Effect of L-arginine and D-arginine on the Anti-inflammatory Activity of *B crassifolia*, Diclofenac, and L-NAME in Mice. An intraplantar injection of 30 μ L of 2% carrageenan stimulated edema development at 30 minutes in the control mice treated orally with 0.45% ethanol solution 10 minutes before the injection. The paw edema increased 6 hours after the injection. The anti-inflammatory effect of the hexane extract was evaluated as the area under the curve (AUC) during the period between 30 minutes and 6 hours after carrageenan injection¹⁷ at doses of 1:1000 and 1:100 equivalent to 18.5 mg extract per 100 μ L.¹⁸ L-arginine or D-arginine was intraperitoneally administered 2 hours before the peak time of the anti-inflammatory effects; peak times were determined using the data obtained earlier in the test with carrageenan. The anti-inflammatory effects of diclofenac (3.1-50 mg/kg PO), a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), and L-NAME (1-100 mg/kg subcutaneously SC), a NOS inhibitor, in a carrageenan-induced mouse paw edema were examined to compare the effects with the anti-inflammatory effects of the NS.

Statistical Analysis

The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) for six or eight rats per group. Parametric data were assessed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's t test; P values $<.05$ were considered to be significant.

RESULTS

Figure 1 shows the general procedure used to prepare extracts of *B crassifolia* seeds using hexane, chloroform, and methanol because these solvents have different abilities to extract substances from plants. The extract prepared with hexane showed the highest percentage of reduction of the induced edema in comparison with those of the other two solvents. Methanol and chloroform extracts produced a small effect, so those results are not presented here. In the present study, the main focal point is the efficacy of the NS on anti-inflammatory activity. Such activity may be associated with the presence of terpenoids. A few of them have been used for therapeutic purposes for decades as an anti-inflammatory agent. Table 1 shows a screening of the anti-inflammatory activity of the hexane extract from *Byrsonima crassifolia* seeds (NS) on different inflammation models induced by formaldehyde, carrageenan, histamine, TPA, and cotton pellets.

Formaldehyde-induced Edema in Rats

The hexane extract supplied orally for 6 days at 50 mg/kg, 100 mg/kg, and 200 mg/kg doses decreased the edema induced by formaldehyde by 35% ($P <.005$), 46% ($P <.005$), and 66% ($P <.001$), respectively. The edema decreased 73% ($P <.001$) with a dose of 10 mg/kg indomethacin. Table 2 shows the mean paw volume of different rat groups.

Table 2. Effects of NS and Indomethacin on Formaldehyde-induced Paw Edema in Rats

| NS doses mg/kg | Mean values for paw volumes | | Anti-inflammatory effects (%) |
|---------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|
| | Before inf | After 6 d inf | |
| Control | 0.89±0.65 | 1.64±2.34 | - |
| 50 | 0.86±0.38 | 1.42±1.28 ^a | 35 |
| 100 | 0.88±0.57 | 1.34±1.45 ^a | 46 |
| 200 | 0.89±0.73 | 1.19±1.32 ^b | 66 |
| Indomethacin, 10 mg/kg | 0.90±0.19 | 1.14±1.63 ^b | 73 |

Note: The data are expressed as mean ± for six rats.

^aP < .005.

^bP < .005 compared with vehicle inflammation (inf).

Table 3. Effects of the Hexane Extract of *B Crassifolia* Seeds on Acute Inflammation Induced by Carrageenan^a

| Doses, mg/kg | Percentage rise in paw edema at different time intervals | | | | |
|---------------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 1 h Mean ± SEM | 2 h Mean ± SEM | 3 h Mean ± SEM | 4 h Mean ± SEM | 6 h Mean ± SEM |
| Carrageenan control | 52±3.81 | 65±3.76 | 69±2.19 | 86±4.12 | 82±3.68 |
| 50 | 28±3.48 ^b | 38±6.02 ^b | 41±5.31 ^b | 58±3.96 ^b | 42±2.86 ^b |
| 100 | 23±4.23 ^b | 35±6.13 ^b | 38±4.36 ^b | 48±4.54 ^b | 39±4.93 ^b |
| 200 | 16±3.78 ^b | 22±4.15 ^b | 27±3.78 ^b | 44±4.07 ^b | 36±4.80 ^b |
| Indomethacin, 10 mg/kg | 2±3.47 ^b | 19±3.89 ^b | 24±6.01 ^b | 36±5.64 | 33±5.13 ^b |

^aThe results of the increase in edema are expressed as the percentage of the postdrug value of the paw volume to the predrug value. The results are expressed during the period from 30 minutes to 6 hours after carrageenan injection. The means and standard errors of the means represent data for groups of six mice.

^bP < .01 when compared to vehicle-treated controls.

Acute Carrageenan-induced Edema in Rats

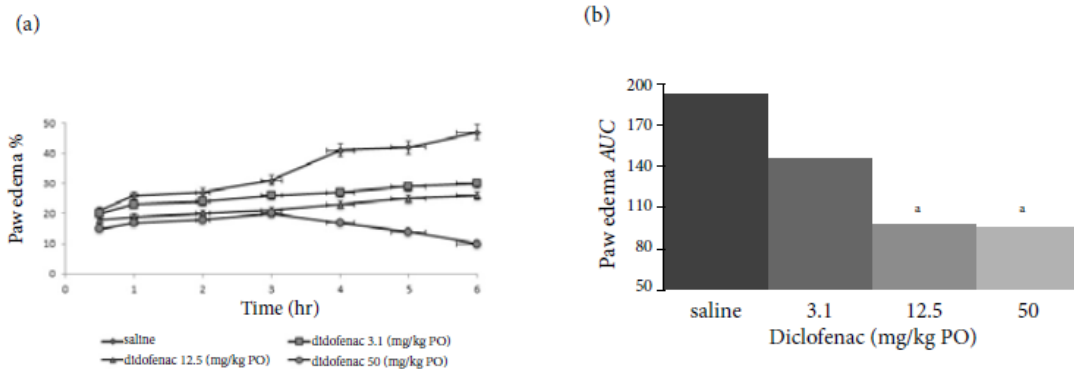
The results of the effect of NS on carrageenan-induced paw edema are shown in Table 3. The hexane extract exhibited significant reduction in the percent rise of carrageenan-induced rat paw edema. The maximal inhibition in the percent rise of edema volume was observed at the doses of 200 mg/kg when compared to the control, decreasing after 6 hours. Figure 2 shows anti-inflammatory activity of diclofenac on rat paw edema caused by carrageenan. Results show the dose-dependence of the anti-inflammatory effect of diclofenac and NS.

Histamine-induced Edema in Rats

In this study, the team evaluated the anti-inflammatory activity of the extract on the phlogistic agent histamine, which is a known mediator of inflammation. Table 4 shows that the hind paw edema of rats peaked at 2 hours; then, it rapidly decreased from 3 hours after the injection. The left-

hind paw used as the control showed no increase in paw volume during the entire experiment (data not shown), whereas the injection of histamine successfully induced the edema for the right-hind paw. Administration of the NS by intraperitoneal injection at 100 mg/kg and 200 mg/kg dosages showed significant and increasing inhibition of the edema at 1, 2, and 3 hours after injection. These data indicate that the anti-inflammatory effect of NS is time-dependent. The NS showed strong and dose-dependent inhibition on the paw edema in the early stage of inflammation (1 hour after histamine injection) at 50 mg/kg to 200 mg/kg dosages. However, in the late phase (2 hours after histamine injection), the NS affected the paw edema to a lesser extent with dose-dependence. Diclofenac sodium also showed a significant inhibition of paw edema from 1 hour after histamine injection.

Figure 2. Anti-inflammatory Activity of Diclofenac on Rat Paw Edema Caused by Carrageenan

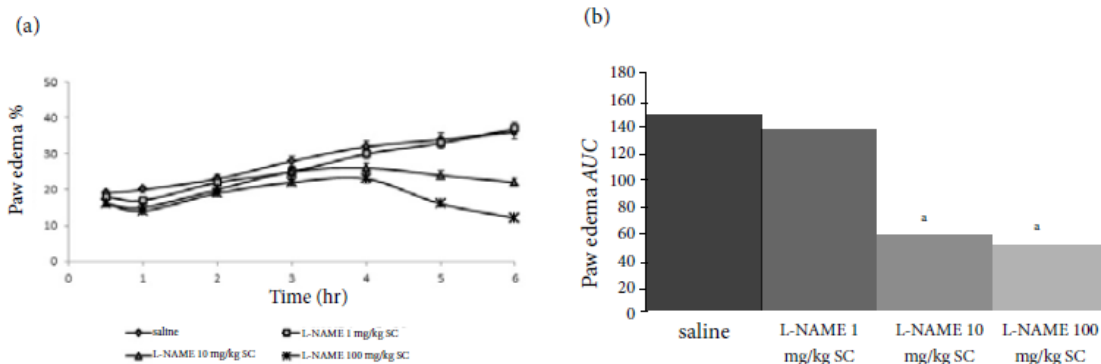


^a $P < .01$ when compared to water-treated controls.

(a) Results of edema increase are expressed as the percentage of the postdrug value of paw volume to the predrug value. $P < .05$.

(b) Dose-dependence of the anti-inflammatory effect of diclofenac. The results are expressed as AUC during the period between 30 min and 6 h after carrageenan injection. These data are given as the means and SEM for groups of six rats. $P < .01$ when compared to water-treated controls.

Figure 3. Anti-inflammatory Effect of L-NAME on Rat Paw Edema Caused by Carrageenan



^a $P < .01$ when compared water-treated controls.

(a) Time course of L-NAME or saline. The results of edema increase are expressed as the percentage of the postdrug value of paw volume to the predrug value.

(b) Dose-dependence of the anti-inflammatory effect of L-NAME. The results are expressed as AUC during the period from 30 min to 6 h after carrageenan injection. These data are given as the means and SEM for groups of six rats, $P < .05$. $P < .01$ when compared to water-treated controls.

Table 4. Anti-inflammatory Effects of the Hexane Extract of *B Crassifolia* Seeds on Histamine-induced Paw Edema in Rats^a

| Doses, mg/kg | % Increase in Paw Edema Size | | |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|
| | 1 h Mean ± SEM | 2 h Mean ± SEM | 3 h Mean ± SEM |
| Control | 46 ± 2.78 | 70 ± 6.43 | 66 ± 5.72 |
| 50 | 33 ± 5.15 ^b | 27 ± 3.69 ^b | 23 ± 1.27 ^b |
| 100 | 28 ± 3.46 | 22 ± 3.54 ^b | 19 ± 2.89 ^b |
| 200 | 24 ± 3.38 ^b | 19 ± 2.70 ^b | 11 ± 2.23 ^b |
| Diclofenac sodium, 10 mg/kg | 17 ± 4.12 | 14 ± 2.89 ^b | 9 ± 3.62 ^b |

^aThe results of edema increase are expressed as the percentage of the postdrug value of paw volume to the predrug value. The results are expressed during period from 1 hour to 3 hours after histamine injection. The means and standard errors of the means represent data for groups of six mice.

^bP < .01 when compared to vehicle-treated controls.

Tetradecanoylphorbol-induced Edema in Mice

Evaluation of the topical anti-inflammatory activity of the NS was performed in the TPA-induced mouse ear edema. The phorbol ester (TPA) provides a skin inflammation model suitable for evaluation of both topical and systemic anti-inflammatory agents and it has been extensively applied in studies of anti-inflammatory products. As shown in Table 5, topical application of the NS significantly suppressed the extent of swelling by 38%, 51%, and 62% at the doses of 0.125, 0.25 and 0.50 mg/ear, respectively. The anti-inflammatory activity of NS is less than that obtained with dexamethasone (0.05 mg/ear).

Cotton-pellet Granuloma Test

In this assay, the team calculated the anti-inflammatory effect of indomethacin and NS from the weight of cotton pellets procured from the rats. The mean weight of wet pellets removed from rats in the control group was 205 mg ± 30.3 mg. In contrast, the mean weights in rats given 200 mg/kg NS and indomethacin were 85 mg ± 15.4 mg (P < .005) and 75 mg ± 26 mg (P < .001), respectively (Table 5). According to these data, the antiproliferative effect of the NS and indomethacin was 57.7% and 62.7%, respectively. The mean dry weight of pellets was 26.5 mg ± 1.76 mg (P < .005) and 24.3 mg ± 1.45 mg (P < .005) in the rat groups treated with the NS and indomethacin, respectively. Based on the mean dry weight, the NS and indomethacin administration inhibited inflammation by 58.2% and 56%, respectively.

Effects of L-arginine and D-arginine on the Anti-inflammatory Actions of *B crassifolia*, Diclofenac, and L-NAME

To determine the participation of the NO system in the anti-inflammatory mechanism of NS, diclofenac, and L-NAME, the research team studied the effect on the anti-inflammatory activity of the extract and the two compounds of L-arginine and D-arginine administered intraperitoneally.

Table 5. Effects of NS on Tetradecanoylphorbol-induced Ear Edema

| Doses mg/ear | Δ Ear Thickness mm (% Reduction) |
|----------------------------|-------------------------------------|
| Control | 0.091 ± 0.12 |
| NS 0.125 | 0.056 ± 0.30 ^b (38) |
| NS 0.25 | 0.044 ± 0.47 ^a (51) |
| NS 0.50 | 0.034 ± 0.42 ^b (62) |
| Dexamethasone, 0.05 mg/ear | 0.072 ± 0.98 ^a (80) |
| Indomethacin, 10 mg/kg | - |

Note: The data are expressed as mean ± SEM for six rats.

^aP < .005.

^bP < .001 compared with vehicle.

The administration of L-arginine or D-arginine was realized 2 hours before the peak time of the anti-inflammatory activity in each case; peak times were determined using the data obtained earlier in the test with carrageenan. Figures 2 and 3 respectively show the growth of paw edema induced by carrageenan injection as well as the effect of diclofenac (3.1-50 mg/kg PO) and L-NAME (1-100 mg/kg SC). In both cases, the research team administered the drug 10 minutes prior to the carrageenan injection. The evaluation of AUC during the period between 30 minutes and 6 hours after the carrageenan injection shows the significant anti-inflammatory effects of diclofenac (12.5, 50 mg/kg) and L-NAME (10, 100 mg/kg). Figure 3 shows the anti-inflammatory effects of L-NAME on

Figure 4. Effect of L- and D-arginine on the anti-inflammatory effect induced by NS. Each arginine was given IP 1h after carrageenan injection. The results are expressed as AUC during the period from 2 to 6 h after carrageenan injection. These data are given as the means and SEM for groups of six rats.

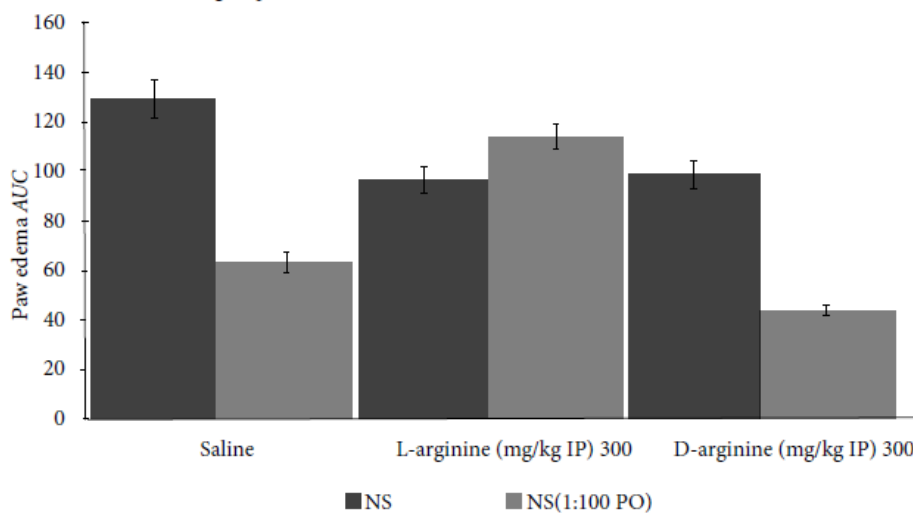
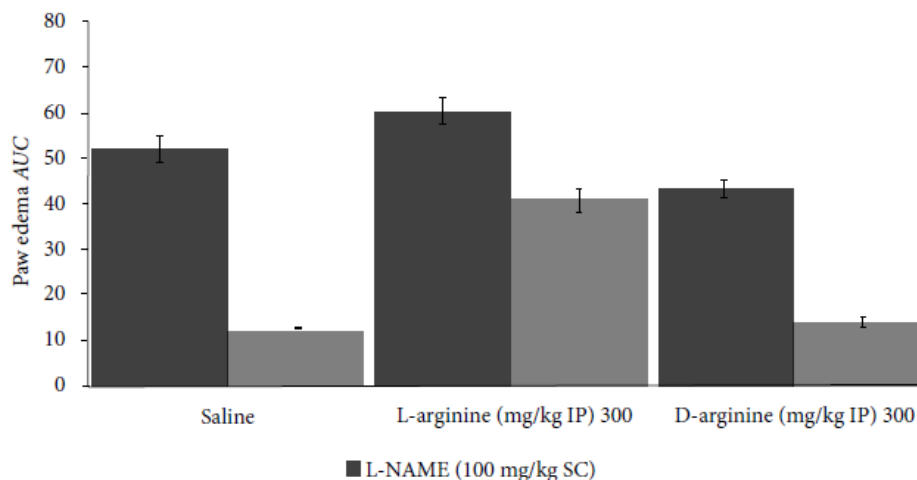


Figure 5. Effect of L- and D-arginine on the anti-inflammatory effect induced by L-NAME. Each arginine was given IP 1h after carrageenan injection. The results are expressed as AUC during the period from 2 to 6 h after carrageenan injection. These data are given as the means and SEM for groups of six rats.

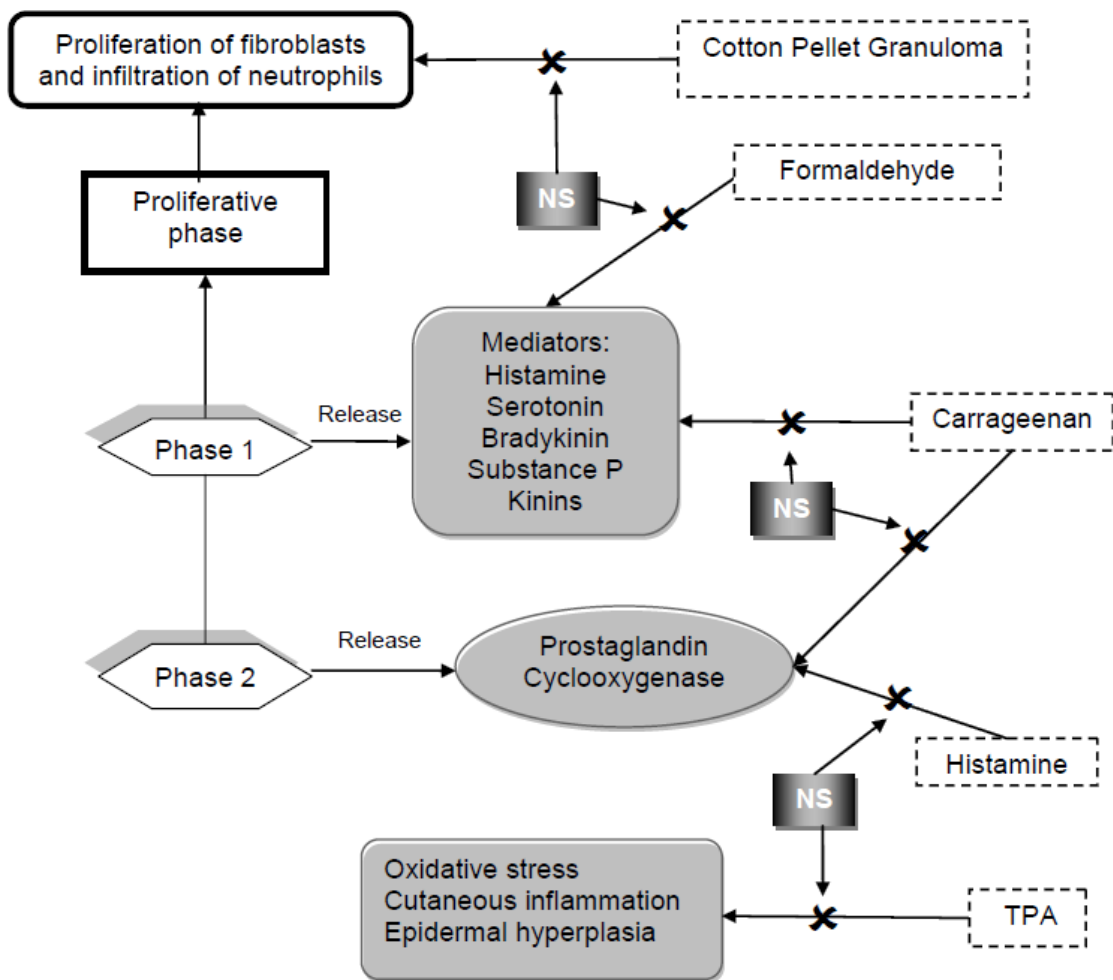


rat paw edema that carrageenan induced. Figure 4 shows the effect of the administration of arginine D or L on the rat paw edema carrageenan induced. Each arginine was given IP 1 hour after carragenin injection. Treatment with L-arginine (300 mg/kg) significantly inhibited the anti-inflammatory effect of the NS. In contrast, neither D-arginine nor L-arginine inhibited the anti-inflammatory effect of diclofenac (50 mg/kg). The single administration of the arginines (300 mg/kg) did not significantly affect the paw edema.

DISCUSSION

Traditional medicine for the treatment of various diseases is becoming more popular. Therefore, the present study aimed to evaluate the scientific basis for the traditional use of seeds from *B crassifolia*, employing six different types in vivo inflammatory models. The study's data indicate that NS exerts anti-inflammatory effects in rats and mice, and specifically that these effects could be associated with the presence of terpenoids.¹⁹

Figure 6. Schematic Representation of the Events After Treatment of NS on Inflammatory Process



The paw edema induced by formaldehyde is another of the most suitable test methods to evaluate anti-inflammatory agents. The method is commonly considered as a close model to human arthritis.²⁰ Histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandin, and P-substance have roles in formaldehyde-induced edema in rat hind paws (Figure 6). The formaldehyde-induced inflammation usually involves two distinct phases. Researchers suggest that the first phase involves the direct stimulation of nociceptors, and the second may be associated with activity of inflammation mediators.²¹ Some studies have shown that the P-substance receptor antagonists slow down the progression to the second phase of formaldehyde-induced edema, and P-substance has a role in this response. Formaldehyde-induced paw edema becomes visible after a

short period of time following formaldehyde injection, and acute inflammation symptoms (tumor, rubor, and color) reach the peak at 3 to 6 hours.

Researchers have widely used carrageenan-induced edema in rats' hind paws for the discovery and evaluation of anti-inflammatory drugs, since for most drugs tested with this model, the relative potency estimates tend to reflect clinical experience.²² The intraplantar injection of carrageenan in rats leads to paw edema in two phases (Figure 6). The first phase occurs within an hour of injection and is the result of the concurrent release of histamine, serotonin, and kinins; the second is associated with elevated production of prostaglandins, oxygen-free radicals, and inducible cyclooxygenase (COX-2) and the local infiltration

and activation of neutrophils.^{23,24} Prostaglandins play a major role in the development of the second phase, which usually occurs after 3 hours.

The increase in paw size usually quantifies the inflammatory response, but inhibitors, such as NSAIDs, can modulate this response.²⁰ The extract of seeds from *B crassifolia* significantly ($P < .05$) decreased the edema size during the initial 4 hours after treatment as compared to control rats. The extract most likely decreased the paw edema by acting at both phases of the carrageenan-induced inflammation. The effect is similar to that of indomethacin. Thus, the NS extract may inhibit the synthesis or release of mediators leading to the acute phase, like histamine, serotonin, or other pro-inflammatory mediators, which usually appear in the early phase of inflammation (Figure 2). Moreover, the effect in the second phase of inflammation may be through the inhibition of COX-2, which leads to the inhibition of prostaglandin synthesis.

Histamine is likely one of the most important mediators of inflammation. Histamine may increase vascular permeability and act with prostaglandins to induce edema (Figure 6). The secretory granules store these two mediators, but mast cells release them during their activation.²⁵ Silva et al propose that prostaglandins act through specific receptors on the nearby vasculature to induce plasma extravasation.²⁶ The hexane extract and the diclofenac, a reference drug, significantly decreased inflammation 1 hour after histamine injection.

Topical application of TPA, a protein kinase well characterized as an activator and tumor promoter, is a suitable model to screen compounds for potential topical anti-inflammatory therapy. A single application of TPA induces oxidative stress, cutaneous inflammation, and epidermal hyperplasia due to enhanced keratinocyte proliferation (Figure 6).²² Researchers have used the mouse ear edema test to identify the potential allergens on the basis of increases in ear thickness in sensitized animals. The inhibition of this dermal reaction can be expressed as the decrease in ear edema or ear thickness as compared to a control group. Topical application of NS markedly suppressed the ear thickening and epidermal hyperplasia. Dexamethasone, a glucocorticoid agonist, has an anti-inflammatory action that is thought to involve phospholipase A₂ inhibitory proteins and lipocortins, which control the biosynthesis of potent mediators of inflammation such as prostaglandins and leukotrienes. Unbound dexamethasone crosses cell membranes and binds with high affinity to specific cytoplasmic receptors.²⁷

Inflammatory granuloma is a typical feature of an established chronic inflammatory process (Figure 6). Researchers have employed the cotton-pellet granuloma method widely to evaluate the transudative, exudative, and proliferative components of chronic inflammation. Generally, the dry weight of the cotton pellets correlates well with the amount of granulomatous tissue.²⁸ The use of NS decreased the dry weight of implanted cotton pellets, indicating that it inhibits the proliferative phase of inflammation. Chronic inflammation is a reaction arising when the acute response is

insufficient to eliminate proinflammatory agents and includes proliferation of fibroblasts and the infiltration of neutrophils and exudation. Chronic inflammation occurs by means of the development of proliferative cells. These cells can be either of spread or granuloma form.²⁹ The NS was more effective on chronic inflammation compared to acute inflammation. Separate administration of NS and indomethacin prevented the growth of granuloma tissue that the cotton pellets induced, at comparable levels.

Indomethacin decreased the granuloma tissue arising from the cellular response, which inhibits the granulocyte infiltration to the foreign cotton body implanted.³⁰ The NS was more effective on chronic inflammation than on acute inflammation, and both NS and indomethacin prevented weight increases of granuloma tissue induced by cotton pellets at almost the same level.

Three isoforms of NOS synthase produce NO from L-arginine.³¹ Two of them, namely endothelial NOS and neuronal NOS, are calcium-dependent and constitutively expressed enzymes. The other isoform (iNOS) is calcium independent; so consequently its inhibition causes an anti-inflammatory effect on rat paw edema. The separate administration of L-NAME (100 mg/kg) or NS showed significant but similar anti-inflammatory activity. Moreover, L-arginine, a substrate of NOS, significantly inhibited the anti-inflammatory effects of NS and L-NAME, but D-arginine did not. Also, L-arginine did not inhibit the diclofenac-induced anti-inflammation mediated through COX-2 inhibition.³² The results suggest that NS and L-NAME inhibit only the catalytic activity of iNOS and not iNOS expression. Regardless of the mechanism implied, it may be that *B crassifolia* produces an anti-inflammatory activity through the inhibition of NO production. The anti-inflammatory mechanism of NS may be related to iNOS and it is associated with the increase in the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD, and GPx). NS may be used as a pharmacological agent for controlling acute and chronic inflammation in experimental models of diseases in which free radical formation is a pathogenic factor.

CONCLUSION

In conclusion, the hexane extract from seeds of *Byrsonima crassifolia* exhibited significant anti-inflammatory activity in both acute and chronic inflammatory models with a partial contribution of inhibitory actions on some cellular inflammatory responses. The anti-inflammatory mechanism of NS may be related to iNOS. Further studies are needed to elucidate the precise mechanism of action and effective constituents of *B crassifolia*. Isolation of the active constituents and evaluation of their anti-inflammatory activity are in progress. This study also confirms the folklore medicinal uses of the plant to treat various ailments related to inflammatory processes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are immensely grateful to the Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal for their financial support.

REFERENCES

1. Bejar E, Malone MH. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from México. Part I. *J Ethnopharmacol*. 1993;39(2):141-158.
2. Alves GL, Franco MR. Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L Rich). *J Chromatog. A*. 2003;985(1-2):297-301.
3. Geiss F, Heinrich M, Hunkler D, Rimpler H. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry*. 1995;39:635-643.
4. Rastrelli L, De Tommasi N, Berger I, Cáceres A, Saravia A, De Simona F. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry*. 1997;45:647-650.
5. Bejar E, Amarquaye A, et al. Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. *Int J Pharmacognosy*. 1995;33(1):25-32.
6. Maldini M, Sosa S, Montoro P, et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. *J Ethnopharmacol*. 2009;122(3):430-433.
7. Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem*. 2007;101:1012-1018.
8. Martínez-Vázquez M, González-Esquínca AR, Cazares Luna L, Moreno Gutiérrez AN. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *J Ethnopharmacol*. 1999;66(1):79-82.
9. Cáceres A, Brenda B, López R, Giron MA, Logemann H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. I. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *J Ethnopharmacol*. 1991;31(3):263-276.
10. Berger I, Barrientos AC, Cáceres A, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol*. 1998;62(2):107-115.
11. Dai Y, Chan YP, Chu LM, Bu PP. Antiallergic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract from *Gleditsia sinensis*. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(9):1179-1182.
12. Winter CA, Risley EA, Nuss WG. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceed Soc Exp Biol Med*. 1962;111:544-547.
13. Patil CR, Gadekar AR, Patel PN, Rambhade A, Surana SJ, Gausal MH. Dual effect of *Toxicodendron pubescens* on Carrageenin induced paw edema in rats. *Homeopathy*. 2009;98(2):88-91.
14. Saneja A, Kaushik D, Khokra SL, Kaushik P, Sharma C, Aneja KR. Evaluation of activities of *Mitragyna parvifolia* fruit extract. *J Nat Prod*. 2009;2:49-54.
15. Godo A, de Heras B, Vivas JM, Villar A. Anti-inflammatory properties of a lipid fraction obtained from *Sideritis javalambrensis*. *Biol Pharm Bull*. 2000;23(10):1193-1197.
16. Vane J, Booting R. Inflammation and the mechanism of anti-inflammatory drugs. *FASEB J*. 1987;1(2):89-96.
17. Belmont HM, Levartovsky D, Goel A, et al. Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997;40(10):1810-1816.
18. Crunkhorn P, Meacock SC. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenan. *Br J Pharmacol*. 1971;42(2):392-402.
19. de las Heras B, Hortelano S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8(1):28-39.
20. Tubaro A, Dri P, Delbello G, Zilli C, Della Loggia R. The croton oil ear test revisited. *Agents Actions*. 1985;17(3):347-349.
21. Greenwald RA. Animal model for evaluation of arthritic drugs. *Meth Find Clin Pharmacol*. 1991;13(2):75-79.
22. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol*. 2003;225:115-121.
23. Gepdiremen A, Mshvildadze V, Suleyman H, Elias R. Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Hedera cochica* in rats. *J Ethnopharmacol*. 2004;94:191-195.
24. Perianayagam JB, Sharma SK, Pillai KK. Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals. *J Ethnopharmacol*. 2006;104(3):410-414.
25. Vasudevan M, Parle M. Pharmacological actions of *Thespesia populnea* relevant to Alzheimer's diseases. *Phytomedicine*. 2006;13(9-10):677-687.
26. Silva J, Worku A, Sousa SM, Duarte VG, Machadoc MI, Matpos FJ. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J Ethnopharmacol*. 2003;89(2-3): 277-283.
27. Tazaki Y, Tazaki M, Inoue T, Shimono M. Scanning and transmission electron microscopic observation of changes in cylindrical cytoplasmic processes of isolated single Merkel cell. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2011;52(2):69-76.
28. Swingle KF, Shideman FE. Phases of inflammatory response to subcutaneous implantation of cotton pellet and other modifications by certain anti-inflammatory agents. *J Pharmacol Exp Ther*. 1972;183(1):226-234.
29. Gay S, Gay RE, Koopman WJ. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis*. 1993;52: S39-S47.
30. Porth CM, ed. *Pathophysiology: Concepts of Altered Health States with Contributors*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1990:165-176.
31. Zhang F, Liao L, Ju Y, Song A, Liu Y. Neurochemical plasticity of nitric oxide synthase isoforms in neurogenic detrusor overactivity after spinal cord injury. *Neurochem Res*. 2011;36(10):181-192.
32. Fracasso JF, Nunes-de-Souza RL, Teixeira CE, Castro RC, Lepera EZ, Silva RF. Effect of dipyron, L-NAME and L-arginine on endotoxin-induced rat paw edema. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(11):1543-1548.

ReadiSorb® Products



Liposomal
Glutathione Drink

Melatonin Spray

Methyl B-12 Spray

Published studies
document absorption
of liposomal
glutathione

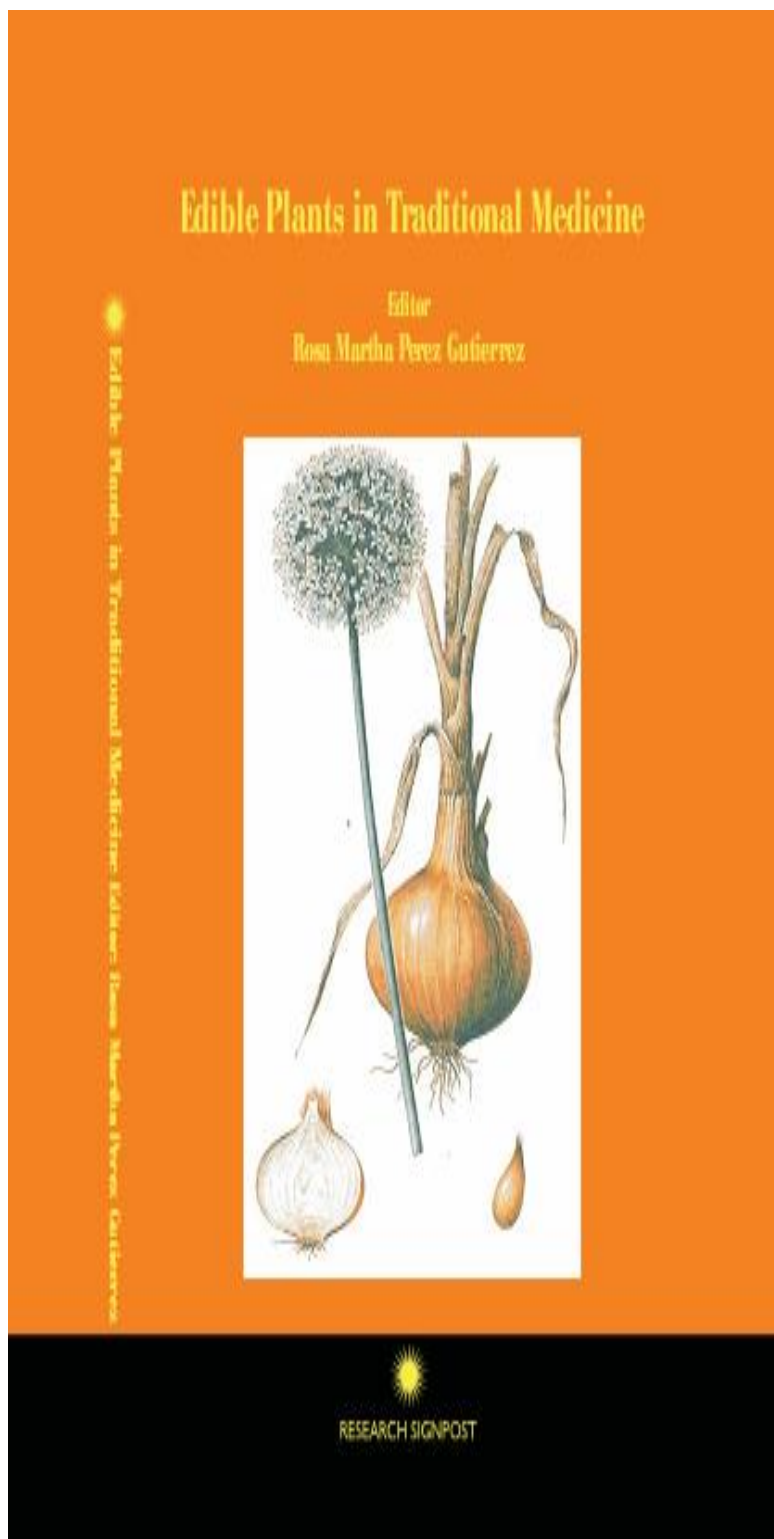
9th year of liposomal
technology

Your Energy Systems, LLC

877-303-3238 www.readisorb.com

650-323-3238 www.lipoglut.com

A.2. Byrsonima: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology.



Published by Research Signpost
2011; Rights Reserved
Research Signpost
T.C. 37/661(2), Fort P.O.,
Trivandrum-695 023, Kerala, India

Editor
Rosa Martha Perez Gutierrez

Managing Editor
S.G. Pandalai

Publication Manager
A. Gayathri

Research Signpost and the Editor as
for the opinions and statements adv:

ISBN: 978-81-308-0447-7



Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O.
Trivandrum-695 023
Kerala, India

Edible Plants in Traditional Medicine, 2011: 37-59 ISBN: 978-81-308-0447-7
Editor: Rosa Martha Perez Gutierrez

2. *Byrsonima*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology

Rosa Martha Perez Gutierrez¹, Alethia Muñiz Ramirez¹
and Luis B. Flores-Cotera²

¹Laboratory Research of Natural Products. ESIQIE, Instituto Politecnico Nacional Av. Instituto Politecnico Nacional S/N, Col Zacatenco Mexico D.F.; ²Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav, Av IPN 2508 Mexco 07360 D.F

Abstract. Genus *Byrsonima*, is an important food crop and medicinal plant in tropical and subtropical countries is widely used like food and in folk medicine in Latin America. Many pharmacological studies have demonstrated the ability of these plants to exhibit antioxidant, antidiarrheal, antibacterial, antifungal, trypanocidal, antispasmodic, antidiabetic, antiinflammatory, antiulcerogenic, mutagenic and neuropharmacological activities, supporting its traditional uses. Also produces a number of metabolites in good yield and some have been shown to possess useful biological activities belonging mainly to phenolic, flavonoid, proanthocyanidins, galloylquinic acids, glycolipids, sulphonoglycolipids, and triterpene. This aims a comprehensive of the chemical constituents, pharmacological, and clinical uses.

Introduction

The genus *Byrsonima*, which is composed of approximately 150 species, belongs to the Malpighiaceae family and is widely distributed throughout tropical America. This family is constituted by approximately 800 species distributed in 60 genera and about 50% of these species are

Correspondence/Reprint request: Dr. Rosa Martha Perez Gutierrez, Laboratory Research of Natural Products ESIQIE, Instituto Politecnico Nacional Av. Instituto Politecnico Nacional S/N, Col Zacatenco Mexico D.F., Mexico. E-mail: rmpg@prodigy.net.mx

concentrated in Brazil [1]. The genus *Byrsonima* has approximately 130 species native to tropical America. Genus *Byrsonima* has a small number of species and only a few have been examined chemically widely distributed in several regions of Central and South America and popularly known as 'Nanche' or 'Murici'. The fruits are edible and commonly sold in local markets. In Mexico it has been used medicinally since prehispanic times by several ethnic groups such the Mixe of Oaxaca [2] and the Zoques, Tzeltal and Tzotzil peoples of Chiapas [3].

Byrsonima is found from Veracruz in Mexico to Brazil and Paraguay; it also grows in the West Indies. The species often used as an ornamental has been introduced to southern Florida [4]. *Byrsonima* generally grows in association with *Curatella americana* L. (chumico) and both species are resistant to fire, displaying a special habit that makes the trees appear twisted.

Byrsonima are a small evergreen tree, 4 to 10 m in height and 15 to 30 cm d.b.h. The tree has a fissured bark, gray to dark chocolate in color, with lenticels. The interior part has pink or red grooves and a bitter taste. The stems have prominent foliar scars, and young leaves are tomentose. The leaves are opposite, obovate to elliptic or ovate, scantily acuminate. 4 to 15 cm long, and 2 to 9 cm wide with an acute to obtuse base and whole margin. The species usually grows in barren soils of dry to very wet places and is common in savannas and pastures. The wood of *Byrsonima* is opaque, reddish chocolate in color, hard, heavy (specific gravity of 0.7), and moderately durable. Throughout its range, every part of the tree is used in a variety of ways. Due to its golden yellow flowers, the tree is used as an ornamental, especially in Florida, and in some countries it is considered a honey-bearing tree. The wood is used for charcoal and firewood. The bark is used to tan hides, poison fish, and treat gastrointestinal and pulmonary diseases and skin infections. The roots are used to treat a variety of illnesses. The fruit may be used as a cotton dye and as a major component in sweet foodstuffs such as jellies and sherbets.

Brazil has a great variability of fruits which present exotic flavor, thus having a great economic potential. Murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich) is a medium-sized shrub or small tree is a small round fruit of 1-2 cm in diameter. When ripe it exhibits a yellow coloration, softer pulp and develops a characteristic and unusual cheese aroma. The fruit is found in the Northern and Northeastern regions of the country and is mainly consumed as juice, jellies, confectionery and liquor. Volatile compounds are responsible for the aroma and flavour of foods [5]. There has been a tremendous interest in this plant as evidenced by the voluminous work. Therefore, we aimed to compile an up to date and comprehensive review of genus *Byrsonima* that covers its traditional and folkmedicine uses, phytochemistry and pharmacology.

Use in traditional medicine

Table 1. Ethnomedical uses of genus *Byrsonima*.

| Place, country | Part(s) used | Ethno medical uses | Preparation(s) | Reference(s) |
|-------------------|--|---|---|--------------|
| Brazil | Leaves of <i>B. intermedia</i> | Against fever, in ulcers, as a diuretic, as antiasthmatics and in skin infections | Infusion or decoction | [5], [6] |
| North Brazil | Bark and leaves of <i>B. Intermedia</i> | Antiemetic, gastritis and diarrhea | Infusion or decoction | [5] |
| Central Brazil | Leaves of <i>B. crassa</i> | Diseases related to gastric ulcers | Infusion or decoction | [7] |
| Amazonia (Brazil) | Leaves, bark, fruit of <i>B. crassifolia</i> | Diuretic and anti-inflammatory | Infusion or decoction | [8] |
| Honduran | Leaves and bark of <i>B. crassifolia</i> | Used by midwives, post-partum stages and pregnancy | One to three cups of decoction drunk per day | [9] |
| Costa Rica | Fruit of <i>B. crassifolia</i> | Body paintings, treatment of respiratory diseases and as laxative | Juice | [10] |
| North Mexico | Leaves of <i>B. crassifolia</i> | Anti-inflammatory | The leaves are boiled and applied externally inflamed zones | [11] |
| South Mexico | Fruit, bark <i>B. cuneata</i> | Treatment diabetes | Infusion | [12] |

Table 1. Continued

| | | | | |
|-------------------|--|---|-----------|------------|
| Central Mexico | Aerial parts of <i>B. crassifolia</i> | Used as a febrifuge | Decoction | [13] |
| North Mexico | Fruit of <i>B. cuneata</i> | Used for the treatment of fever and to induce a pleasant dizziness | Decoction | [13] |
| Central Mexico | Bark and branches of <i>B. cuneata</i> | Used for tightening loose teeth and as fish poison | Decoction | [13] |
| South Mexico | Fruit and seed <i>B. crassifolia</i> | Used for dysentery | Decoction | [13] |
| Mexico, Brazil | Bark of <i>B. crassifolia</i> | To expel retained placenta after delivery and to induce menses | Infusion | [14] |
| Guatemala | Bark and leaves of <i>B. crassifolia</i> | Mycotic infections | Infusion | [15] |
| South Guatemala | Bark and leaves of <i>B. crassifolia</i> | Diarrhea and dysentery | Infusion | [16] |
| North Guatemala | Bark of <i>B. crassifolia</i> | Skin infections and protozoal infections | Infusion | [17], [18] |
| Central Guatemala | Leaves of <i>B. crassifolia</i> | To treat inflammatory skin affections | Decoction | [19] |
| Central America | Bark and leaves of <i>B. crassifolia</i> | To treat coughs, skin fungal diseases, diarrhea, indigestion, and snake bites | Infusion | [13] |
| Central America | Bark of <i>B. crassifolia</i> | Treatment of anti-inflammatory-based affections | | [19] |

Table 1. Continued

| | | | | |
|---------------|---------------------------------|--|----------------------------|------|
| Nicaragua | Bark of <i>B. crassifolia</i> | Used to treat snakebites as antidote and the treatment side effects caused by snakebites | Decoction | [20] |
| French Guyana | Leaves of <i>B. crassifolia</i> | General health promotion | Baby bathed with decoction | [21] |

Phytochemistry

The flavonol contents of *Byrsonima intermedia* is of 43.70 mg/g, *Byrsonima crassa* 41.37 mg/g, *Byrsonima crassifolia* leaves, bark and fruit 11.71, 11.0 and 0.12 mgGAE/g FW respectively [22].

Byrsonima crassifolia (L.), a neotropical malpighiaceae tree or treelet, has flowers that produce abundant lipids instead of nectar. Several species of *Centris* bees collect this oil. The floral oil shows variation between trees and can be separated into two types. One type is most common and consists of mono- and di-glycerides, some free fatty acids, a small amount of tri-glycerides and a trace of carbohydrate. The composition of the glycerides is predominantly (53-63%) esters of unsaturated C-18, C-22 fatty acids with the rest made up of C-14, C-18 saturated fatty acids. The second type of floral oil is similar to type one except that the samples contain large amounts of an unknown lipid more polar than the standards [10].

Murici (*Byrsonima crassifolia*) is very popular in Latino America has a strong fruity, rancid cheese aroma, High resolution gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry and aroma extract dilution analysis identified the most potent substances in its aroma as ethyl butanoate (fruity, sweet), ethyl hexanoate (fruity), 1-octen-3-ol (mushroom like), butyric acid (rancid, cheese), hexanoic acid (pungent, cheese) and phenylethyl alcohol (floral). Its pulp is mainly composed of ethyl, methyl and phenylethyl esters and by carboxylic acids, terpenoids, O-lactones and some sulfur compounds. Seed analysis also showed a buttery and oily cheese aroma and GC-MS revealed linoleic, oleic, stearic and palmitic acids as foremost components, while the aroma was associated to the butyric and hexanoic acids present in minor amounts [24].

The characterize the headspace volatile compounds of murici samples (fresh fruits) from the Northeastern region of Brazil were determined by gas chromatography-mass spectrometry. The predominant compounds were esters (52-56%) followed by alcohols (29-32%). The major compounds were ethanol (28.1%), ethyl hexanoate (25.1%), methyl hexanoate (5.2%),

butanoic acid (5.1%) and hexanoic acid (5.1%). Esters were also the most abundant compounds ethyl esters such as ethyl butyrate, hexanoate and octanoate were predominant.

Also found the presence of carbonyl compounds such as 2-pentanone, 2-heptanone and hexanal. Among the carbonyl compounds, 3-hydroxybutan-2-one presented the greatest percentage. This compound was found in several tropical fruits its aroma was described as slightly musty in sapota. Ethyl-3-(methylthio)-propanoate detected in murici was previously identified in passion fruit [24]. The presence of ethanol can indicate the occurrence of fermentation. In murici, ethanol was detected in high amounts (28.3%) and probably was an indication that fermentation had occurred. The local population usually consumes these fruits in a very ripe stage.

The characteristic aroma of murici is possibly related to the fatty acids. This fruit possesses a goaty cheesy aroma, with pineapple and cherry notes. The presence of ethyl-3-(methylthio)propanoate in murici can explain the pineapple note. This type of fruit, presenting a very unusual aroma similar to that of cheese, would not be accepted on the USA market, although, it could be accepted in yogurts [15].

Biological activity

Scientific investigations on the medicinal properties of nanche dates back to the 1960s. A summary of the findings of these studies performed is presented below.

Antifungal activity

Alcoholic extract from bark and leaves of *Byrsonima crassifolia* show activity against pathogenic fungi *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* and *Trichophyton rubrum*. The minimal inhibitory concentration (MIC) against the fungus in pure culture was 50 µg/ml. The most susceptible fungi were *E. floccosum* and *T. rubrum* [25].

In addition, aqueous extract from the bark of *B. crassifolia* inhibited dermatophytes *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. Anti-dermatophyte activity were of *E. floccosum* (43.2%), *T. rubrum* (36.0%), and *T. mentagrophytes* (31.8%); the less inhibited were *M. canis* (22.7%) and *M. gypseum* (24.0%). The MIC showed the extract could inhibit *in vitro* growth of dermatophytes at a concentration of less than 100 mg/dry vegetal [26]. These fungi are common skin infections in developing countries, of which dermatophytoses are of particular concern in

the tropics, especially in infants are often chronic and required prolonged treatment by antimycotic drugs that are expensive and sometime non-effective.

Antibacterial activity

Gastrointestinal disorders are frequent ailments of some populations mainly in Latino America. The most important are diarrhea and stomach pains in children, and constipation and gastroenteritis in adults. Most of gastrointestinal infections are fecally transmitted and due to contaminated environments. *B. crassifolia* shown *in vitro* activity against pathogenic enterobacteria *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* and *Shigella flexneri*. These bacteria are a common cause of diarrhea and dysentery in the infant population and have been responsible for regional pandemics in the past [27]. Resistance to antibiotics by these bacteria is increasing [28], thus there is a growing need for effective new antibiotics.

So reported that ethyl acetate and methanolic extracts of the root and stem from *B. crassifolia* are effective against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Micrococcus luteus*. The ethyl acetate extract of roots, being the most active extract, showing a dose-dependent antibacterial activity. The maximal zones of inhibition ranged from 17 to 26 mm. The methanolic extract of roots only showed activity against *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli* and *S. typhi*, whereas the methanolic extract of stems was ineffective. The activity of this extract against Gram-positive and Gram-negative may be indicative of the presence of broad spectrum antibiotic compounds or simply general metabolic toxins [29].

Antioxidant activity

Amazonia, with its enormous biodiversity, has a great potential in providing new nutritional compounds. In the Amazonian flora, many plants unknown to scientists have been used for years by Indian people to cure degenerative diseases, such as CHD and diabetes. The study of these medicinal plants, often rich in polyphenols, may lead to the discovery of new, useful antioxidant sources, providing an incentive for the preservation of these plants and sustainable development within this region. Due to the multifunctional characteristics of phytochemicals, the antioxidant efficacy of a plant extract is best evaluated based on results obtained by commonly accepted assays, taking into account different oxidative conditions, system

compositions, and antioxidant mechanisms [30,31]. The antioxidant effect of aqueous leaf extract of *B. crassifolia* was studied on spectrophotometric assays ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and scavenging of the radical cation ABTS⁺. In this study, a high correlation was found between TP (total phenolics) and TF (total flavonoids), as well as between the polyphenolic contents and the antioxidant activities. Due to the elevated values of their antioxidant activity, the specie *B. crassifolia*, may be considered as interesting sources of antioxidants [6]. In addition the antioxidant activity of *B. crassifolia* was higher in leaves compared to fruits and bark in several different *in vitro* tests, based either on the capacity to scavenge free radicals (ORAC, TRAP) or on the ability to protect biological structures (LDLs, erythrocytes). Most antioxidant performance indicators (ORAC, TRAP, LDL protection) correlated well with the TP and TF content of the extracts. Conversely, correlation was lower between TFO (flavonols) and these indicators, reflecting a lower involvement of these compounds in antioxidant processes. Erythrocyte protection against oxidant-triggered haemolysis showed no correlation with any of the phenolic content indicators, suggesting that most of these compounds have a low ability to protect lipid targets in the erythrocyte membrane [32].

Antiulcerogenic activity

In another study, it was observed that methanolic extract from *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK) leaves have antiulcerogenic activity reducing the formation of lesions associated with HCl/ethanol administration in mice. Methanol extract from *B. crassa* reduced the ulceration by 99% at doses de 1g/kg [33]. Several studies have indicated the ability of methanol extract from *B. fagifolia* to reduce gastric lesions induced by ethanol and HCl/ethanol and endogenous mucosal sulphhydryl groups (SHs) participated efficaciously in BF gastroprotection. BF blocked development of inflammation process and also has antidiarrheal actions. This extract accelerated the healing of the gastric ulcerated mucosa by stimulating proliferative factors and by increasing production of gastric mucus with no toxic action [34].

Mutagenic effect

Mutagenic activity was assays with *Salmonella* demonstrated that the methanol extract of *Byrsonima intermedia* induced a significant increase in the frequency of revertants per plate, in the TA98 and TA100 strains, but MI was less than 2. *In vivo* studies with methanol and chloroform extracts on albino

Swiss mice, which were treated with different doses of each extract through gavage no showed significant difference in micronucleus frequency. Mutagenicity was not observed *in vivo* [7]. Contents of the biflavonol amentoflavone found in the methanol extract may explain the mutagenic activity [35].

Spasmogenic activity

Five spasmogenic compounds ursenaldehyde, betulin, betulinic acid, quercetin, and hyperin were obtained from a MeOH extract of *B. crassifolia* leaves using isolated rat fundus as the pharmacological assay. They were found to be partial agonists relative to 5-HT. It is well known that partial agonists act as spasmogens when tested alone, but in the presence of full agonists they may act as antagonists. Noncompetitive antagonism was observed with hyperin, pipercolic acid and 5-hydroxypipercolic acid. Of these three compounds, only hyperin showed spasmogenic effects on fundus when tested alone. 5-Hydroxypipercolic acid had been previously identified as a 5-HT antagonist in an assay using blood platelets. Isolation of spasmogenic compounds from the active fractions of a MeOH leaf extract explained, at least in part, the contractile response on gastrointestinal smooth muscles observed with the total plant extract. Since some of these compounds were identified as 5-HT antagonists, the possibility of pharmacological interactions between two or more compounds has to be considered. These compounds, when present in a mixture, may partially antagonize one another and drastically modify potencies and IA values. The noncompetitive antagonism elicited by three of the compounds isolated would support a possible antagonism of endogenous neurotransmitters and autacoids, such as 5-HT, which mediate peristalsis of the gastrointestinal tract [36].

In another study, activation of ethyl acetate extract from leaf and bark of *B. crassifolia* on cholinergic effect on muscarinic and nicotinic receptors, was studied on rat jejunum and frog rectus abdominis, both classical models widely used to define muscarinic/nicotinic receptors [37]. The extract not elicit any effect on these preparations indicating that a possible cholinergic effect (nicotinic or muscarinic receptors) could be discarded when, considering rat fundus *in vitro* data [36].

Antiprotozoal activity

Methanol extracts were prepared from bark of *Byrsonima bucidaefolia* and *Byrsonima crassifolia* and evaluated in an *in vitro* bioassay for leishmanicidal activity against *Leishmania mexicana* promastigotes. Extracts

of bark from *B. bucidaefolia* showed good inhibitory activity on the growth of *L. Mexicana* ($IC_{50} = 36 \mu\text{g/ml}$) instead extracts of leaves showed moderate activity ($IC_{50} = 60 \mu\text{g/ml}$). Methanol extracts of bark from *B. crassifolia* showed good inhibitory activity on the growth of *L. Mexicana* ($IC_{50} = 14 \mu\text{g/ml}$) in comparison with the of leaves that showed moderate activity ($IC_{50} = 87 \mu\text{g/ml}$) [38].

In another report, the ethanol extract from *B. crassifolia* bark showed trypanocidal activity *in vitro* against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes with a highest IC_{50} with value of $381 \mu\text{g/ml}$ (Berger *et al.*, 1998). TLC screening and HPLC analysis of the ethanol extract showed the triterpene sapogenins oleanolic acid, 2- α and 2- β -hydroxy-oleanolic acid, and lupeanolic acid and 2- α hydroxy-lupeanolic acid, catechin, epicatechin and quercetin 3-O- β -D-galactoside, quercetin 3-O- β -D-glucoside, isorhamnetin 3-O- β -D-rutinoside and isorhamnetin 3-O- β -D-galactoside in different concentrations [3].

Neuropharmacological activity

Aqueous extract of bark of *B. crassifolia* produced pronounced effects on gross behavior. Decreased motor activity and general flaccidity, positive piloerection and palpebral ptosis was observed. Extract also induced reduced sound and touch responses. Aqueous extract of leaves retained all of the effects observed with the bark extract and also produced awareness, catalepsy (reversible by stimuli), and decreased righting reflex, ipsilateral flexor reflex and respiratory rate. These effects were not over 24 h.

The results provide strong indications that the aqueous bark extracts of *B. crassifolia* are CNS depressants since they showed activity in the entire predictive test applied. Aqueous extracts of *B. crassifolia* reduced spontaneous motor activity immediately after i.p. administration. The mean activity count in each extract-treated group was significantly reduced with respect to the control group. Aqueous extract dosage was 1.25 g dried plant/kg weight [39].

Anti-inflammatory activity

The chloroform extracts of *B. crassifolia* bark at dose of $300 \mu\text{g/cm}^2$ reducing the oedematous induced by croton-oil ear dermatitis in mice by about 70%. As positive reference was used the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin ($100 \mu\text{g/ml}$) reduced the oedematous response by 60%. The extract showed ID_{50} values (dose giving 50% oedema inhibition) of $112 \mu\text{g/cm}^2$. Anti-inflammatory potency was comparable to that of the indomethacin ($ID_{50} = 93 \mu\text{g/cm}^2$) [19].

Chemical constituents

Table 2. Flavonoids isolated from *Byrsonima*.

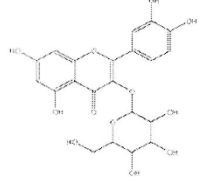
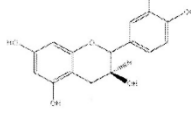
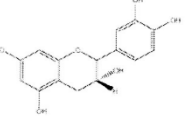
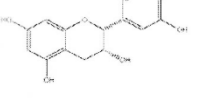
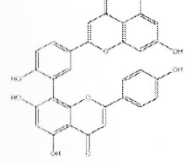
| Structure | Source | Activities |
|---|---|----------------------------------|
|  | Leaves of <i>B. intermedia</i> [7] | |
| Quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside | Leaves of <i>B. intermedia</i> [7] | |
|  | Leaves of <i>B. intermedia</i> [7] | |
| (+)-catechin | Leaves of <i>B. intermedia</i> [7] | |
|  | Leaves of <i>B. crassifolia</i> [36] | |
| (-)-catechin | Leaves of <i>B. crassifolia</i> [36] | |
|  | Leaves of <i>B. intermedia</i> [7] | Possesses mutagenic activity [7] |
| Epicatechin | Leaves of <i>B. intermedia</i> [7] | Possesses mutagenic activity [7] |
|  | | |
| Amentoflavone | | |

Table 2. Continued

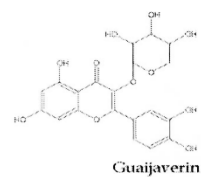
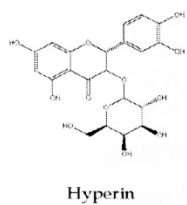
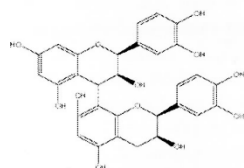
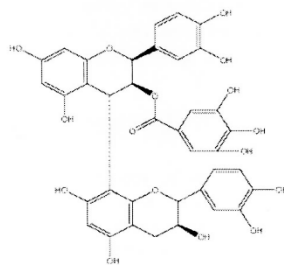
Leaves of *B. crassifolia*
[36]Leaves of *B. crassifolia* Spasmogenic activity
[36]Bark of *B. crassifolia*
[2]Bark of *B. crassifolia*
[40]

Table 2. Continued

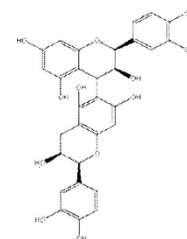
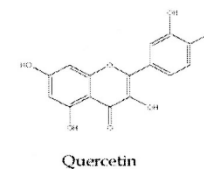
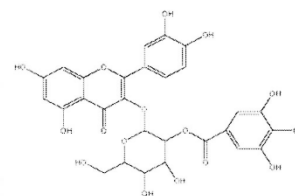
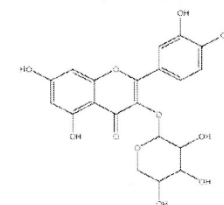
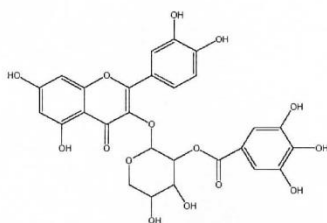
Leaves of *B. crassifolia*
[2]Leaves of *B. intermedia*
[7]Leaves of *B. intermedia*
[7]Leaves of *B. intermedia*
[7]

Table 2. Continued



Quercetin-3-O-(2''-O-galloyl)-α-arabinopyranoside

Leaves of *B. intermedia*
[7]Table 3. Glycolipids isolated from *Byrsonima*.

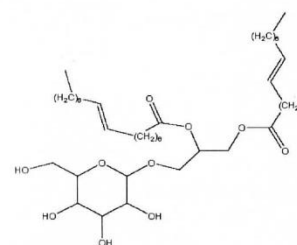
| Structure | Source | Activities |
|-----------|--|------------|
| | Leaves of <i>B. crassifolia</i> [3] | |
| | Leaves of <i>B. crassifolia</i> [3] | |
| | Leaves of <i>B. crassifolia</i> [3] | |

1,2-di-O-miristoyl-3-O-(6-sulpho-α-D-quinovopyranosyl)-glycerol

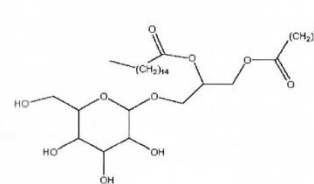
Leaves of *B. crassifolia*
[3]

1,2-di-O-(8-hexadecenyl)-3-O-(6-sulpho-α-D-quinovopyranosyl)-glycerol

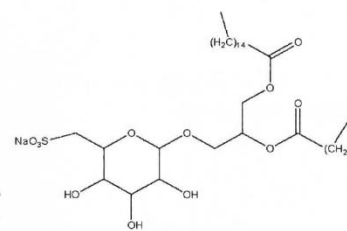
Table 3. Continued



1,2-di-O-(8-hexadecenyl)-3-O-(β-D-glucopyranosyl)-glycerol

Leaves of *B. crassifolia*
[3]

1,2-di-O-palmitoyl-3-O-(β-D-glucopyranosyl)-glycerol

Leaves of *B. crassifolia*
[3]

1,2-di-O-palmitoyl-3-O-(6-sulpho-α-D-quinovopyranosyl)-glycerol

Leaves of *B. crassifolia*
[41]

Table 4. Phenolic compounds isolated from *Byrsonima*.

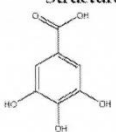
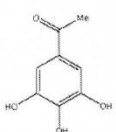
| Structure | Source | Activities |
|---|---------------------------------------|------------|
|  | Leaves of <i>B. intermedia</i> [7] | |
| Gallic acid | | |
|  | Leaves of <i>B. intermedia</i> [7] | |
| Methyl gallate | | |

Table 5. Triterpenes isolated from *Byrsonima*.

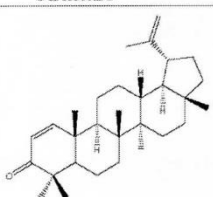
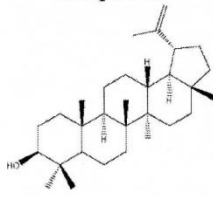
| Structure | Source | Activities |
|---|--------------------------------------|------------|
|  | Wood of <i>B. microphylla</i> [6] | |
| Δ¹-lupenone | | |
|  | Wood of <i>B. microphylla</i> [6] | |
| Lupeol | | |

Table 5. Continued

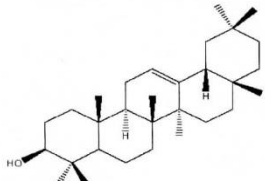
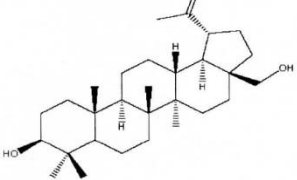
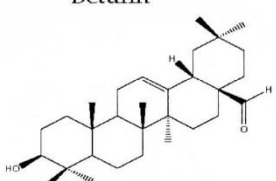
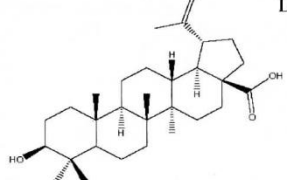
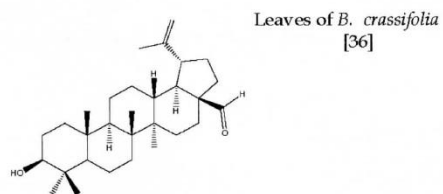
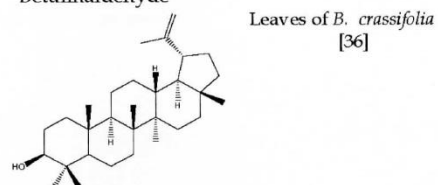
| | |
|---|---|
|  | Wood of <i>B. microphylla</i> [6] |
| β-amyrin | |
|  | Wood of <i>B. microphylla</i> [6] |
| Betulin | |
|  | Leaves of <i>B. crassifolia</i> [36] |
| Ursenaldehyde | |
|  | Leaves of <i>B. crassifolia</i> [36] |
| Betulinic acid | |

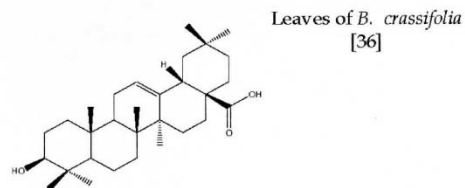
Table 5. Continued



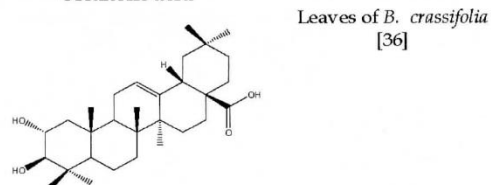
Betulinaldehyde



Lupeol

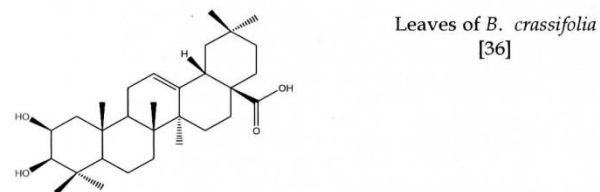


Oleanolic acid



2α-hydroxy-oleanolic acid

Table 5. Continued

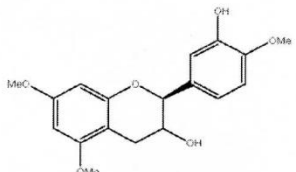
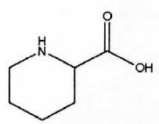
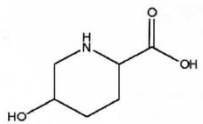


2β-hydroxy-oleanolic acid

Table 6. Miscellaneous from *Byrsonima*.

| Structure | Source |
|---|--------------------------------------|
| <p>3-Hydroxy-2-methoxy-8,8,10-trimethyl-8H-antracen-1,4,5-trione</p> | Wood of <i>B. microphylla</i> [6] |
| <p>3,7-Dihydroxy-2-methoxy-8,8,10-trimethyl-7,8-dihydro-6H-antracen-1,4,5-trione</p> | Wood of <i>B. microphylla</i> [6] |
| <p>(2S*,10aR*)-2,8-dihydroxy-6-methoxy-1,1,7-trimethyl-2,3,10,10a-tetrahydro-1H-fenantren-9-one</p> | Wood of <i>B. microphylla</i> [6] |

Table 6. Continued

| | |
|--|---|
|  <p>(2S,3S)-3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxyflavan-3-ol</p> | Wood of <i>B. microphylla</i> [6] |
|  <p>Pipecolic acid</p> | Leaves of <i>B. crassifolia</i> Bejar et al. (1995) Spasmogenic activity Bejar et al. (1995) |
|  <p>5-Hydroxypipecolic acid</p> | Leaves of <i>B. crassifolia</i> Bejar et al. (1995) Spasmogenic activity Bejar et al. (1995) |

References

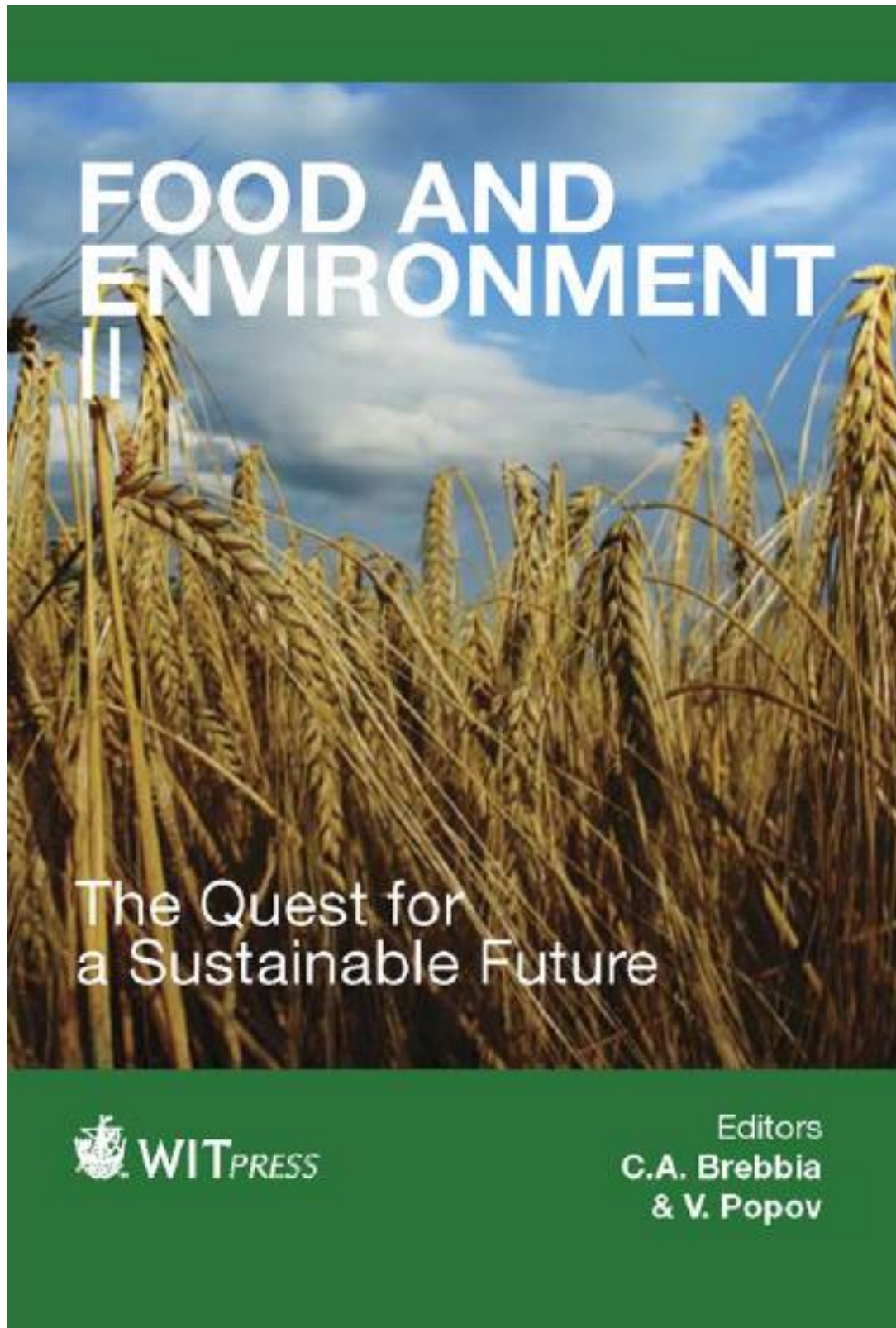
- Joly AB. 1998. Botánica: Introducao a Taxonomia Vegetal. Companhia Ed. Nacional Sao Paulo.
- Geiss F, Heinrich M, Hunkler D, Rimpler H. 1995. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry* 39: 635-643.
- Rastrelli L, Nunziatina de T, Berger I, Caceres A, Saravia A, De Simona F. 1997. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry* 45: 647-650.
- Little EL, Wadsworth FH. 1964. Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. *Agricultural Handbook No. 249*. USDA. Forest Service. Washington, D.C., USA. p. 338-340.
- Silva SR, Silva AP, Munhoz CB, Silva Jr, MC, Medeiros MB. 2001. Guia de plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros. WWF, Brasilia.

- Aguiar RM, David JP, David J.M., 2005. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. *Phytochemistry* 66: 2388-2392.
- Sannomiya M, Cardoso CRP, Figueiredo ME, Rodrigues CM, dos Santos LC, dos Santos FV, Serpeloni JM, Cólus IMS, Vilegas W, Varanda E.A. 2007. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. *J Ethnopharmacol* 112: 319-326.
- Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y. 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry* 101:1012-1018.
- Ticktin T, Dalle S. 2005. Medicinal plants use in the practice of midwifery in rural Honduras. *J Ethnopharmacol* 96: 233-248.
- Rezende CM, Fraga SRG. 2003. Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici. *J Braz Chem Soc* 14: 425-428.
- Andrade-Cetto A, Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 99: 325-348.
- Giovannini P, Heinrich M. 2009. Xki yoma' (our medicine) and xki tienda (patent medicine)-Interface between traditional and modern medicine among the Mazatecs of Oaxaca, Mexico. *J Ethnopharmacol* 121: 383-399.
- Bejar E, Malone MH. 1993. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. Part I. *J Ethnopharmacol* 39: 141-158.
- Elizabetsky E, Posey AD. 1989. Use of contraceptive and related plants by the Kayapo Indians (Brazil). *J Ethnopharmacol* 26: 299-316.
- Caceres A, Lopeza B, Lucirez X, Aguila I, Garcias S. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *J Ethnopharmacol* 40: 207-213.
- Williams LO. 1981. The useful plants of Central America. *Ceiba* 24: 152-237.
- Morton JF. 1981. Atlas of medicinal plants of middle America. Charles C. Thomas, Spring-field, pp 1420.
- Berger I, Ana Cecilia B, Armando C. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol* 62 107-115.
- Maldini M, Sosa S, Montoroa P, Giangaspero A, Balick MJ, Pizza C, Della Loggia R. 2009. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia comigera Willdenow*, *Byrsonima crassifolia Kunth*, *Sweetia panamensis Yakovlev* and the leaves of *Sphagneticola trilobata Hitchcock*. *J Ethnopharmacol* 122: 430-433.
- Coe FG, Anderson GJ. 2005. Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *J Ethnopharmacol* 96: 303-323.
- Ruysschaerta S, van Andel T, Van de Putteb K, Van Dammea 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.
- Vinson SB, Williamson HJ, Frankie GW, Shrum G. 1997. Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpigheaceae) and a use of floral lipids by Centris bees (Hymenoptera: Apidae). *Biotropica* 29: 76-83.
- Mac Leod AJ, Troconis NG. 1982. Volatile flavour components of *Byrsonima crassifolia*. *J Agric Food Chem* 30: 515-518.

24. Alves GL, Franco MRB. 2003. Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). Journal of Chromatography A, 985: 297-301.
25. Caseres A, Lopez BR, Giron MA, Logemann H. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections I. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. J Ethnopharmacol 31: 263-276.
26. Mata LJ, Gangarosa EJ, Caceres A, Perera DR, Mejicanos ML. 1970. Epidemic *Shiga* bacillus dysentery in Central America. I. Etiologic investigations in Guatemala, 1969. J Infectious Diseases 122: 170-180.
27. Perez Miravete A. 1973. Tifoidea en Mexico. Revista Latino-Americandde Microbiologia 15: 6-68.
28. Solorzano SF, Leños BM, Guiscafre HC. 1987. Resistencia antimicrobiana actual de *Salmonella Typha*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella* spp. Boletín Medico del Hospital infantil de Mexico 44, 448-455.
29. Martinez-Vazquez M, Gonzalez-Esquinca AR, Cazares Luna L, Moreno Gutierrez MN, Garcia-Argaez AN. 1999. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. Journal of Ethnopharmacology 66: 79-82.
30. Frankel EN, Meyer AS. 2000. The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. J Sc Food Agric 80: 1925-1941.
31. Prior RL, Cao GH. 1999. Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering *in vivo* antioxidant status. Proceedings Soc Exper Biol Med 220: 255-261.
32. Souza JNS, Silvaa EM, Loira A, Rees J, Rogez H, Larondelle Y. 2008. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. Food Chemistry 106: 331-339.
33. Sannomiya M, Vitor B, Fonseca MA, da Silva LRM, Rocha LC, dos Santos CA, Hiruma-Lima ARM, Souza BC, Vilegas W. 2005. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. J Etnopharmacol 97: 1-6.
34. Lima ZP, dos Santos RC, Torres TU, Sannomiya M, Rodrigues CM, dos Santos LC, Pellizzon CL, Rocha LRM, Vilegas W, Monteiro AR, Brito S, Cardoso CRP, Varanda EA, Moraes HP, Bauab TM, Carlos IZ, Hiruma-Lima CA. 2008. *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. J Ethnopharmacol 120: 149-160.
35. Cardoso CRP, Cólus IMS, Bemardi CC, Sannomiya M, Vilegas W, Varanda EA. 2006. Evaluation of the mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. Toxicology 225: 55-63.
36. Bejar E, Amarquaye A, Che C, Malone MH, Fong HS. 1995. Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. Int J Pharmacog 33: 25-32.
37. Kitchen I. 1984. Textbook of *in vitro* practical pharmacology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp.153.
38. Peraza-Sanchez SR, Cen-Pacheco F, Noh-Chimal A, May-Pat F, Sima-Polanco P, Dumonteil E, Garcia-Miss MR, Mut-Martin M. 2007. Leishinanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. Fitoterapia 78: 315-318.

39. Cifuentes CM, Gomez-Serranillos MP, Iglesias I, Villar del Fresno AM. 2001. Neuropharmacological profile of ethnomedicinal plants of Guatemala. J Ethnopharmacol 76: 223-228.
40. Xie D, Dixon RA. 2005. Proanthocyanidin biosynthesis-still more questions than answers?. Phytochemistry 66: 2127-2144.
41. Amarquaye A, Che C, Bejar E, Malone MH, Fong HS. 1994. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. Planta Med 60: 85-86.

A.3. Wound healing effect and flavonoid contents of three selected *Byrsonima* species



Wound healing effect and flavonoid contents of three selected *Byrsonima* species

A. Muñiz¹ & R. Perez²

¹Department of Biotechnology and Bioengineering,
Cinvestav-IPN, México

²Laboratory of Natural Products Research, ESIQIE-IPN, México

Abstract

The present study aimed to develop a methodology for quantification of prepared samples by analysis using capillary electrophoresis to analyze apigenin, apigalacatequin and kaempferol from methanol extract fruits and seeds of three selected *Byrsonima* species. The effect of methanolic extracts from these Malpighiaceae species was assayed in streptozotocin-induced diabetic rats. Methanol extract in a topical form accelerates the wound healing process by decreasing the surface area of the wound with a significant increase in the rate of wound contraction and tensile strength. *B. crassifolia* was most effective of the three species tested in promoting diabetic wound healing in rats through the processes of tissue regeneration.

Keywords: *Byrsonima crassifolia*, *B. bucidaefolia*, *B. bahiana*, capillary electrophoresis, wound healing, flavonoids.

1 Introduction

The *Byrsonima species* is a tropical tree, distributed widely in México, Central and South America. The fruit is edible and bright yellow when ripened; it has sweet taste and slightly bitter aftertaste. In México, the fruit is consumed as juice, liquor, jelly and candy. Since prehispanic times it has been used as medicine in treating various diseases [1]. Phytochemical studies indicate that these plants contain esters [2], epicatechins [3], glycolipids [4]. Studies aiming to describe the diverse biological activities of the *Byrsonima* species have shown promising results as spasmogenic [5], anti-inflammatory [6], antioxidant [7, 8], antibacterial [9], trypanocidal [10] and hypoglycemic [11]. Based on traditional



uses of seeds from *B. crassifolia* the objective of this work was to establish the chemical composition and wound healing activity of methanol extracts fruits and seeds of *B. crassifolia*, *B. bucidaefolia* and *B. bahiana*.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and standards solutions

Flavonoid standards, apigalacatequin, apigenin, and kaempferol were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

2.2 Plant material

Byrsonima crassifolia L., *B. bucidaefolia* and *B. bahiana* belong to the Malpighiaceae family, fruits were collected in Tlacomulco (México State), Alarcon (Guerrero State) and Cuautla (Morelos State) respectively in the month of July 2011 and were taxonomically authenticated in the Herbario of Escuela Nacional de Ciencias Biologicas, Instituto Politécnico Nacional. A voucher specimen of these plants is stored for reference.

2.3 Preparation of extracts

Air-dried and powdered fruit and seeds from *B. crassifolia* (400 g/batch) separately were extracted twice for 2 h with 1.5 l methanol in a Soxhlet apparatus. The extracts after filtered were concentrated under vacuum at 30°C in a rotary evaporator (Buchi XYZ Flawil, Switzerland).

2.4 Determination of phenolic content (PT)

The total phenolic content in the methanol extracts was measured using Folin-Ciocalteu reagent method [12].

2.5 Capillary electrophoresis analyses

The determination of flavonoids were carried out on a Beckman PACE/MDQ capillary electrophoresis system (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA), equipped with an on-column diode-array detection (DAD) system set at 214 nm and a temperature control device set at 25°C. Software for data acquisition and treatment (32 Karat™ Software v 7.0) was used for peak integration and data analysis. Samples were introduced onto the capillary via hydrodynamic injection by applying 0.5 psi for 10 s. A constant voltage of 15 kV was used for all experiments. Uncoated fused-silica capillaries (CAP Capillary Tubing Beckman Coulter) with an inner diameter of 75µm and a total length of 60 cm were used.

New capillaries were conditioned with a 1 mol NaOH solution (10 min), followed by deionized water for 5 min, and finally the BGE for 30 min. Between runs, the capillary was rinsed for 2 min with 1mol, NaOH, followed by water for 2 min and equilibrated with running buffer for 5 min and buffer. The extract was



dissolved in methanol/water (1:1 v/v) and filtered (pore size, 0.45 μm ; Millipore). The running buffer used was 40mM borate and 40mM sodium dodecyl sulfate, pH 9.0. The identification of apigenin, apigalacatequin and kaempferol in the samples was performed by comparing their retention times with those of authentic standard and by addition of standard solutions to the sample analyzed by capillary electrophoresis and by comparison of their UV-Vis spectrum.

2.6 Determination of the detection and quantification limits

The detection limits were determined by injecting ($n = 5$) solutions of apigenin, apigalacatequin and kaempferol of known concentration (10 μl each) and then decreasing the concentrations of the samples until a peak is detected having a signal/noise ratio of 3. The corresponding concentration was considered as being the minimal detectable concentration. The quantification limits were determined by performing the same methodology and thus, the quantification limit was considered to be the chromatographic peak having a signal/noise ratio of 10.

2.7 Analytical curves

The content estimation of the apigenin, apigalacatequin and kaempferol in the samples was performed by external calibration. The compounds in the study were dissolved separately in spectroscopy grade methanol in order to obtain stock solutions, which were appropriately diluted for each of the substances. Aliquots of 10 μl dilutions for each standard were analyzed via capillary electrophoresis with each determination being carried out five times. For each standard, the corresponding chromatogram was obtained and a graphical plot was constructed of the mean of areas of the chromatogram against the concentration for each substance. A linear least-square regression of the peak areas as a function of the concentrations was performed to determine the correlation coefficients. The equation parameters (slope and intercept) of each standard curve were used to obtain the concentration values for the samples. Specimens with an analytic concentration exceeding the analytical curve were reanalysed upon appropriate dilution of the samples.

2.8 Linearity

The analytical procedure was verified from the linearity of the assayed method in terms of the correlation coefficient obtained, which was evaluated by analyzing each sample with known amount of the analyte at low, medium and high concentrations. The aliquots (10 μl) were analyzed via capillary electrophoresis as described above. Each determination was carried out five times. For each spiked sample, the corresponding chromatograms were obtained and a plot of the average areas against their concentrations was constructed. Linear least-square regression was performed to determine the correlation coefficients.



2.9 Accuracy and precision

The accuracy of the assayed method was evaluated by performing replicate analyses against an analytical calibration curve and calculating the mean percentage differences between the theoretical values and the measured values.

The accuracy values in the inter-day variation studies using capillary electrophoresis at low, medium and high concentrations of apigenin, apigalacatequin and kaempferol were evaluated in the extracts. The precision of a method is expressed as the percentage of the coefficient of variation (CV) of the replicate measurements. The precision of the method was tested for inter-day repeatability via capillary electrophoresis. The inter-day variability of the method was determined from three different analysis ($n = 5$) for each sample with an addition of known amounts of analyte at low, medium and high concentrations.

2.10 Experimental animals

This study was conducted in Wistar rats with 150 to 200 g weight. All were procured from bioterio of ENCB-IPN and were housed in microlon boxes in a controlled environment (temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$) with standard laboratory diet and water *ad libitum*. Animals were acclimatized for three days in that new environment prior to the experiments. Litter was discarded from cages and the floor renewed thrice a week to ensure hygiene and comfort for animals. The ethical clearance in animal handling was observed as described in NIH publication No. 85-23 revised 1985.

2.11 Wound healing activity

Severe diabetes mellitus was induced in overnight fasted male rats by a single intraperitoneal injection of streptozotocin, at a dose of 50 mg/kg body weight dissolved in cold citrate buffer (pH 4.5) [13]. Rats with permanent high fasting blood glucose level > 300 mg/dl were included for the experiments. In the experiment a total 54 diabetic rats were divided into nine groups ($n = 6$ per group): Group I: normal control treated topically with simple ointment, Group II: diabetic control treated topically with simple ointment, Group III to VIII: diabetic treated topically with methanol extract of *B. crassifolia* fruit (NFC) and seeds (NSC), NFG (fruit) and NSG (seeds) for *B. bucidaefolia*, and *B. bahiana* NFT (fruit) and NST (seeds). Group IX: diabetic treated topically with nitrofurazone (0.2% w/w).

The back of each diabetic rat was shaved under Nembutal (35 mg/kg, ip) anesthesia and open circular wounds were produced on each rat by excising the skin. The wound area was measured immediately by placing transparent tracing paper over the wound and tracing it out [14]. After the wound creation, the rats were subdivided into nine groups: Group I: normal control treated with simple ointment, Group II: diabetic control treated with simple ointment, Group III: diabetic treated topically with nitrofurazone (0.2% w/w). Group IV–VIII: diabetic treated topically with methanol extract of fruits and seeds (10% w/w).



The rate of wound contraction was calculated by the use of a planimeter on respective days (3, 6, 9, 12, 14) after wound creation and were expressed as a percentage of the initial wound size. The number of days required for healing of the scar without any residual of the raw wound determined the period of epithelialization.

2.12 Statistical analysis

All values are expressed as means \pm S.D. and statistical analyses were performed by means of the Student's or by one-way ANOVA, and then differences among means were analyzed with Fisher's Protected Least Significant Difference multiple-comparison test. Differences at $p < 0.05$ were considered to be significant.

3 Results

Fruit diameter ranged from 0.7 cm to 1.5 cm, total polyphenols from 0.037 to 0.048 mg gallic acid equivalents (GAE)/g fruit and 0.046 to 0.068 mg gallic acid equivalents (GAE)/g seeds. In this study, three major flavonoids were detected in the methanolic extract of the fruits and seeds from *Byrsonima* different species.

A number of preliminary capillary electrophoresis experiments employing samples were performed to establish optimal conditions for the analysis of apigenin, apigalacatequin and kaempferol (Fig. 1). Calibration curves for flavonoids ranging from 0.10 to 50.0 $\mu\text{g/ml}^1$ were determined by linear regression. In some cases, resorcinol was added in the separation as an internal standard to ensure the system is in proper conditions during these analyses. The results of the regression equations of calibration curves and detection limits for the three flavonoids are summarized in Table 1.

The linearity of the method was determined by linear regression.

Table 1: Regression data of the analytical calibration curves for determination of apigenin, apigalacatequin and kaemferol via capillary electrophoresis.

| | Parameter values | | |
|-------------------------|------------------|-----------------|-----------|
| | Apigenin | Apigalacatequin | Kaemferol |
| LR ($\mu\text{g/ml}$) | 0.10-50 | 0.10-50 | 0.10-50 |
| <i>a</i> | 0.0638 | 0.0121 | 0.0567 |
| <i>b</i> | 0.0136 | 0.0115 | 0.0119 |
| <i>Sa</i> | 0.0034 | 0.0023 | 0.0024 |
| <i>Sb</i> | 0.0012 | 0.0015 | 0.0011 |
| <i>r</i> | 0.9996 | 0.9996 | 0.9996 |
| <i>n</i> | 10 | 10 | 10 |

LR: linear range, *b*: slope, *a*: intercept, *Sb*: standard deviation of the slope, *Sa*: standard deviation of the intercept, *r*: correlation coefficient, *n*: number of samples. Linear regression, formula: $y = a + bx$, where *y* = ratio of peak areas, *x* = concentration ($\mu\text{g/ml}$), *a* = intercept and *b* = slope.



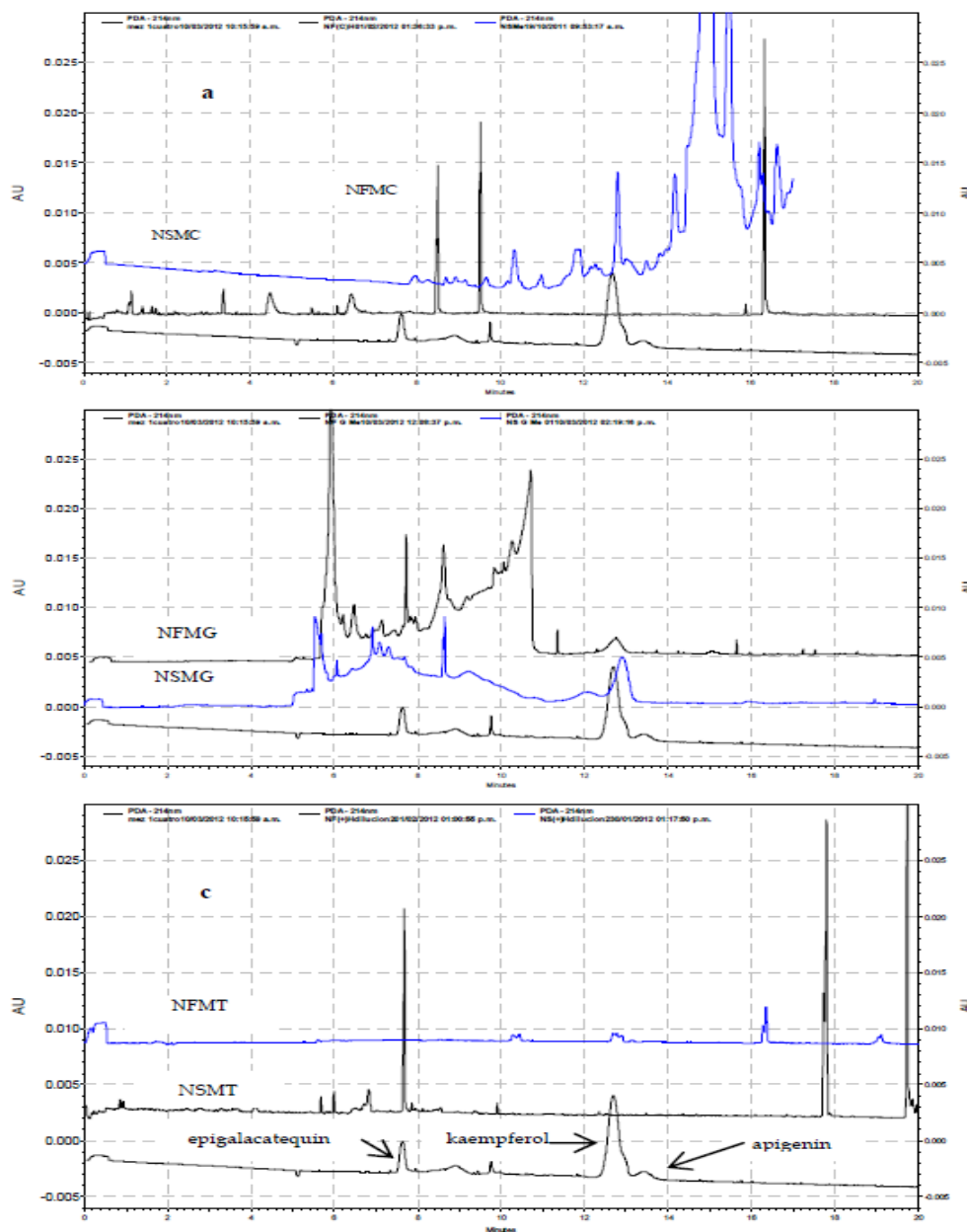


Figure 1: Analytical capillary electrophoresis of flavonoids recorded at 214 nm. Epigallocatequin ($Tr=7.16 \pm 0.15$ min); kaempferol ($Tr= 12.32 \pm 0.64$ min); apigenin ($Tr=11.37 \pm 0.52$ min). For the conditions, see the experimental section.

The analysis demonstrated samples with of the analytical

The precision variation (CV) than 5% (Table of variation v tested for the the assayed n. The results are reproducible. interfering m p value of 0.0

Table 3 n contents assa

Table 2:

| Apigenin (µg/ml) | |
|------------------|--------|
| Conc added | Co Fo |
| 1 | 0 ± 0 |
| 25 | 24 ± 1 |
| 50 | 49 ± 2 |

Conc: concen



contents of 0.481 ± 0.066 to 0.372 ± 0.091 mg GAE/g extract sapper low if compared with other fruits. Seeds presented low TP contents of 0.683 ± 0.007 to 0.468 ± 0.025 mg GAE/g extracts. Indeed, the profile of the phenolic compounds does not show significant differences when comparing fruits and seeds of *Byrsonima* of three different species.

The results of the present study revealed that the application of extract of *B. crassifolia* fruit (NFC) and seeds (NSC), NFG (fruit) and NSG (seeds) for *B. bucidaefolia*, and *B. bahiana* NFT (fruit) and NST (seeds) on the intentionally excised wound surface at doses of 10% w/w on streptozotocin-induced diabetic rats accelerated the wound healing process by decreasing the wound area. The wound contractions at different days are shown in Table 4.

It was also observed that epithelialization period of treated and standard group were better in comparison to simple ointment base treated group (Fig. 2). However, methanol extracts of *B. crassifolia* and *B. bahiana* reduced epithelialization period on day 14 ($p < 0.05$), nitrofurazone reduced epithelialization period on day 18 (data not shown) ($p < 0.05$) in comparison with the control group on day 22 (data not shown). It has been observed that the rate of healing of wounds in diabetic patients is slow compared to healthy patients. Due to the unknown molecular mechanism involved and lack of successful evidence, treatment of diabetic wounds remains one of the greatest challenges for the clinician, making it important to understand the mechanism involved in the impaired skin wound healing in diabetes. The results obtained from the present study showed positive signs in potentiating rate of wound healing in diabetic rats when compared with untreated rats (Fig 2). Methanol extract increase rate of wound contraction, rate of epithelialization period. The rate of wound contraction was found to be significant in topically treated rats. Furthermore, rate of contraction determines the period of epithelialization, which can be defined as the centripetal movement of the edges of a full-thickness wound to facilitate closure of the defect [15].

4 Discussion

In conclusion, the capillary electrophoresis analysis of the samples was developed for the simultaneous determination of apigenin, apigalacatequin and kaempferol fruits and seeds of *Byrsonima* of three different spices providing a method for their analysis. This method does not require tedious procedures to eliminate interfering materials. Validation experiments showed good precision and accuracy for the method with the coefficients of variation being less than $\pm 5\%$. The wound healing activity results presented here demonstrate that this methanol extracts from fruits and seeds of *Byrsonima crassifolia*, *B. bucidaefolia* and *B. bahiana* showed difference in the concentrations of the main bioactive compounds in fruits and seeds, can be opportunely defined on the basis of chemical, agricultural and environmental knowledge.



Table 4: Effect of topical application of hexane extract of fruits and seeds of *Byrsonima crassifolia*, *B. bucidifolia* and *B. bahiana* on the wound area (mm²) over a period of 14 days in rats.

| Days | Wound closure mm ² | | | | | | | | | |
|------|-------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--|
| | Control normal | Control Diabetic | NT | NFT | NST | NFG | NSG | NFC | NSC | |
| 3 | 130.6 ± 2.14 (48%) | 59.7 ± 7.18 (22%) | 165.4 ± 5.15 (51%) | 130.6 ± 4.87 (48%) | 130.0 ± 1.18 (48%) | 120.8 ± 4.85 (45%) | 140.8 ± 4.25 (52%) | 150.2 ± 7.21 (55%) | 147.8 ± 2.54 (55%) | |
| 5 | 138.6 ± 4.66 (51%) | 75.1 ± 3.46 (28%) | 168.2 ± 1.45 (63%) | 160.0 ± 5.41 (59%) | 144.5 ± 4.58 (53%) | 135.2 ± 5.01 (50%) | 153.2 ± 5.85 (57%) | 193.6 ± 5.46 (72%) | 166.2 ± 7.54 (61.5%) | |
| 7 | 144.4 ± 3.70 (53%) | 115.8 ± 2.87 (43%) | 204.0 ± 4.65 (75%) | 220.5 ± 2.14 (59%) | 218.1 ± 7.58 (81%) | 259.5 ± 7.12 (96%) | 242.7 ± 3.06 (90%) | 234.1 ± 3.04 (87%) | 190.5 ± 2.44 (70.5%) | |
| 9 | 158.0 ± 3.25 (55%) | 156.5 ± 5.64 (58%) | 215.5 ± 4.96 (80%) | 242.7 ± 6.41 (91%) | 222.4 ± 4.96 (82%) | 266.5 ± 5.07 (99%) | 264.5 ± 7.41 (98%) | 258.2 ± 1.07 (95%) | 220.5 ± 6.35 (82%) | |
| 12 | 182.0 ± 5.41 (67%) | 190.3 ± 4.57 (70%) | 248.2 ± 3.16 (90%) | 270.0 ± 1.28 (100%) | 260.7 ± 3.25 (96%) | 270.0 ± 4.15 (100%) | 270.0 ± 3.07 (100%) | 262.6 ± 5.06 (97%) | 260.0 ± 2.44 (96%) | |
| 14 | 242.4 ± 8.63 (90%) | 234.2 ± 4.12 (86%) | 270.0 ± 5.22 (100%) | 270.0 ± 5.22 (100) | 270.0 ± 5.22 (100%) | - | - | 270.0 ± 6.08 (100%) | 270 ± 2.41 (100%) | |

Calculated on the original wound size of 270 mm²; Value are mean ± S.D. (n = 6 animals in each group); Statistically significant p<0.05 compared to group control (ANOVA) followed by Dunnett's test. () percentage wound closure is calculated with respect to respective day 0 wound area. Nitrofurazone (NT) as positive control.



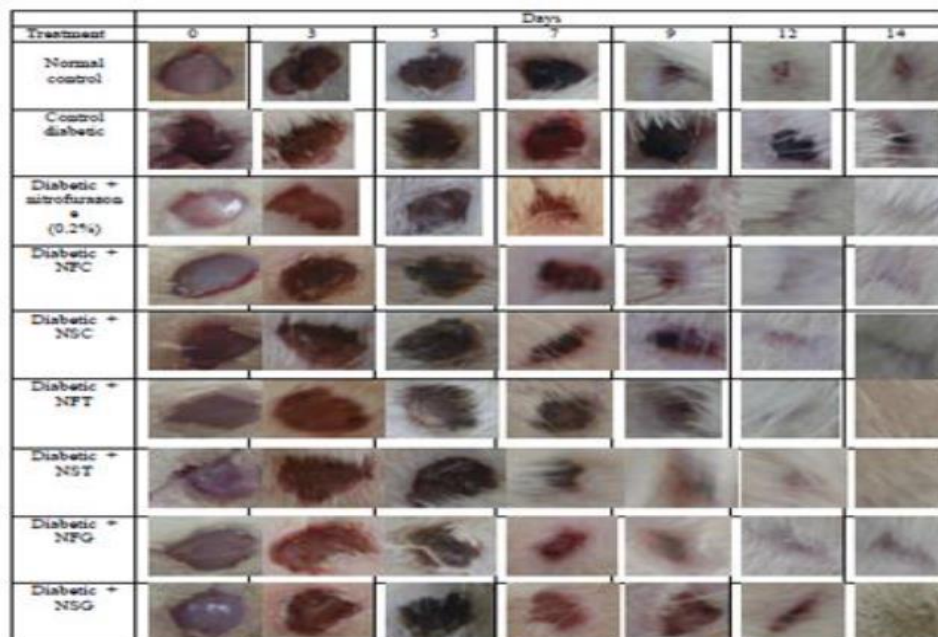


Fig 2: Images of the effect of methanol fruits and seeds extract of *B. crassifolia*, *B. bucidaefolia* and *B. bahiana*, on wound healing in rats on topical treatment.

Acknowledgement

The authors are immensely thankful to the Instituto de Ciencia y Tecnologia del Distrito Federal for their support.

References

- [1] Béjar, E. & Malone, M., Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia* a medicinal tree from México. *Journal Ethnopharmacology*, **39**, pp. 141-158, 1993.
- [2] Alves, G. & Franco, M., Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia*). *Journal of Chromatography A*, **985(1-2)**, pp. 297- 301, 2003.
- [3] Geiss, F. Heinrich, M. Hunkler, D. Rimplerl, H., Proanthocyanidins with (+) - epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry*, **39**, pp. 635-643, 1995.



- [4] Rastrelli, L. De Tommasi, N. Berger, I. Cáceres, A. Saravia, A. De Simona, F., Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry*, **45**, pp. 647-650, 1997.
- [5] Bejar, E. & Malone, M., Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. Part I. *Journal Ethnopharmacol*, **39**, pp. 141-158, 1993.
- [6] Maldini, M. Sosa, S. Montoro, P. Giangaspero, A. Balick, M. Pizza, C. Loggia, R., Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetiapanamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticolatrilibata* Hitchcock. *Journal of Ethnopharmacology*, **122**, pp. 430-433, 2009.
- [7] Silva, E. Souza, J. Rogez, H. Rees, J. Larondelle, Y., Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food chemistry*, **101**, pp.1012-1018, 2007.
- [8] Castillo, A. García, S. Peña, R. Antioxidants from the leaf extract of *Byrsonima bucidaefolia*. *Natural Products Communications*, **4**, pp. 83-86, 2009.
- [9] Martinez, V. Gonzalez, E. Cazares, L. Moreno, G. Garcia, A., Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.). H. B. K. *Journal of Ethnopharmacology*, **66**, pp. 79-82, 1999.
- [10] Berger, I. Barrientos, A. Cáceres, A. Hernández, M. Rastrelli, L. Passreiter, C. Kubelka, W., Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: Activity of extracts and fractions of five Guatemala plants against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, **62**, pp. 107-115, 1998.
- [11] Perez, G. Muñoz, R. Gomez, G. Bautista, R., Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiglycation of *Byrsonima crassifolia* fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, **20**, pp. 717-728, 2010.
- [12] Sahgal, G. Ramanathan, S. Sasidharan, S. Mordi, M. Ismail, S. Mansor, S., In vitro antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic *Swieteniamahagoni* seed extracts. *Molecules*, **14**, pp. 4476-4485, 2009.
- [13] Mohammadi, J. & Naik, P., Evaluation of hypoglycemic effect of *Morus alba* in an animal model. *Indian Journal of Pharmacology*, **40**, pp. 15-18, 2008.
- [14] Palu, A. Kalisi, T. Palu, K. Palu, A. Hifo, T. Fakatafe., A forgotten art of traditional wound-healing using nonu leaves in the Friendly Islands of Tonga. *Journal of Medicinal Food Plants*, **2**, pp. 27-33, 2010.
- [15] Wang, Z. & Li, L., The plasmid encoding Hsp47 enhances collagen expression and promotes skin wound healing in an alloxan-induced diabetic model. *Cell Biology International*, **20**, pp. 1-6, 2009.



ORIGINAL ARTICLE

Hexane Extract of the Seeds of *Byrsonima Crassifolia* Accelerates Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic RatsRosa Martha Pérez Gutiérrez¹ and Alethia Muñiz Ramírez²

ABSTRACT **Objective:** To study the effect of seeds of *Byrsonima crassifolia* in diabetic wound healing. **Methods:** Wound healing potential of hexane extract in the form of simple ointment for the treatment of dermal wounds was studied in streptozotocin-induced diabetic rats on excision wound, incision wound and dead space wound. Various parameters such as epithelization period, scar area, tensile strength, hydroxyproline, total protein, DNA, hexosamine, uronic acid, antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD) and catalase activity (CAT) were used to evaluate the effect of *B. crassifolia* on wound healing. **Results:** Hexane extract in form topical accelerates the wound healing process by decreasing the surface area of the wound with a significant increase in the rate of wound contraction and tensile strength; increase granulation tissue dry weight, hydroxyproline, total protein, DNA and SOD and CAT when compared with diabetic control. **Conclusion:** *B. crassifolia* was effective in promoting diabetic wound healing in rats through the processes of tissue regeneration.

KEYWORD *Byrsonima crassifolia*, seed, hexane, healing process, diabetic rats, traditional medicine

Wound healing is a dynamic process which includes biochemical and physiological phenomena that behave in a harmonious manner involving progression of various sequential events (stages) in order to guarantee tissue restoration. Immediately after injury the inflammatory phase begins with vasoconstriction favoring homeostasis and releasing inflammation mediators. The proliferative phase is characterized by granulation tissue proliferation formed mainly by fibroblasts and the angiogenesis process. Reformulation and improvement in the collagen fiber components, which increases the tensile strength, involves the remodeling phase.⁽¹⁾ Alterations in any of these steps can lead to healing delay or impaired healing which may be due to consequence of pathological states associated with diabetes, immune disorders, ischemia, venous stasis, and in injuries such as burn, frostbite, and gunshot wounds.

Diabetes mellitus is a condition which is known to be associated with a variety of connective tissue abnormalities. Abnormalities associated with diabetic wounds include prolonged inflammation, impaired neovascularization, decreased synthesis of collagen, increased levels of proteases, and defective macrophage function, therefore delaying wound healing processes.⁽²⁾ Delayed wound healing in diabetes has become one of the greatest challenges for physicians and health care workers; an estimated 15% of diabetic patients will have a non-healing

wound at some stage in their lives, resulting in poor quality of life, prolonged hospitalization, and possibly finally leading to amputation.⁽³⁾ It has been suggested by Davison, et al⁽⁴⁾ that patients with diabetes mellitus are susceptible to higher levels of oxidative stress. This oxidative stress causes imbalance between the oxidant and antioxidant defense mechanisms resulting in lipid peroxidation, DNA damage, and enzyme inactivation, including free radical scavenger enzymes contributing to tissue damage, thus delaying the healing process.⁽⁵⁾

Byrsonima crassifolia, a tropical tree commonly known as nanche widely distributed in Mexico, Central and South America, which has been used as food and for its medicinal health benefits since prehispanic time. Its medicinal usage included the treatment of diabetes, wound healing, burn, anti-inflammatory and other internal ailments.⁽⁶⁾ Many investigators have evaluated the bioactivity of plant extract and its constituents as

©The Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine Press and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

1. Research Laboratory of Natural Products, School of Chemical Engineering and Extractive Industries, National Polytechnic Institute, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco, CP 07758, Mexico D.F.; 2. Department of Biotechnology and Bioengineering, Cinvestav, National Polytechnic Institute, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, CP 07360, Mexico D.F. Correspondence to: Dr. Rosa Martha Pérez Gutiérrez, Tel: 55-57296000 Ext 55142, E-mail: rmpg@prodigy.net.mx DOI: 10.1007/s11655-013-1556-x

esters,⁽⁷⁾ epicatechins,⁽⁸⁾ and glycolipids.⁽⁹⁾ Extract from leaf, fruits and bark exhibit spasmogenic effects,⁽¹⁰⁾ antioxidant,⁽¹¹⁾ antibacterial,⁽¹³⁾ anti-inflammatory⁽¹³⁾ and anti-trypanocidal activities.⁽¹⁴⁾ In previous studies we evaluated hypoglycemic effects of a hexane extract of *B. crassifolia*.⁽¹⁵⁾ Based on traditional uses of seeds from *B. crassifolia*, the objective of this work was to study the wound healing activity of nanche-seed extracts obtained with hexane and establish the role of various biochemical and antioxidant parameters in different phases of diabetic wound healing.

METHODS

Plant Material and Extract Preparation

Byrsonima crassifolia L., belonging to the Malpighiaceae family, its fruit were collected in Morelos state and were taxonomically authenticated in the Herbario of Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. A voucher specimen of the plant is stored for reference (No. 8976). The seeds of *B. crassifolia* (300 g) were dried and powdered in a mechanical grinder. The powdered material was extracted by 500 mL of hexane using soxhlet apparatus. These extracts were filtered and concentrated by rotary vacuum evaporator and kept in a vacuum dessicator for complete removal of solvent. Simple ointment containing the extracts in a solution of Tween-80 (2%) was incorporated into soft paraffin ointment base. For topical treatment a 10% (w/w) ointment of three extracts was prepared as per the British Pharmacopoeia and a 0.2% (w/w) nitrofurazone was taken as standard.⁽¹⁶⁾ The application of ointment was fixed once a day from the starting day and was maintained up to day 16.

Experimental Animals

A total of 32 male Wistar rats, with certification numbers: 1200–3412, were provided by the Bioterio of the National School of Biological Sciences, Mexico. The rats were housed in a cage under conditions of standard light (light on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.), with temperature of 22 ± 1 °C and room humidity of $60\% \pm 10\%$ conditions for one week before the experimental sessions. The rats were given a commercial feed prepared by Purina and allowed tap water *ad libitum*. All experimental protocols were conducted in accordance with accepted standard international guidelines for care and use of laboratory animals.

Streptozotocin-Induced Diabetic Model

Severe diabetes mellitus was induced in overnight

fasted male rats by a single intraperitoneal injection (ip) of streptozotocin (STZ), with a dose of 50 mg/kg body weight dissolved in cold citrate buffer (pH 4.5).⁽¹⁷⁾ The elevated blood glucose level in the blood at 72 h and then on day 7 after injection confirmed hyperglycemia. Rats found with permanent high fasting blood glucose level > 300 mg/dL were included for the wound healing studies.

Creation of Excision Wound

The back of each rat was shaved under nembutal (35 mg/kg, ip) anesthesia and open circular wounds were produced on each rat by excising the skin. The wound area was measured immediately by placing transparent tracing paper over the wound and tracing it out. The wounded animals were housed separately in different cages.⁽¹⁸⁾

After the wound creation, the experimental rats were divided into the following 4 groups of 8 rats each: normal group (simple ointment-treated normal control), model group, (diabetic model control treated with simple ointment), nitrofurazone group [diabetic wounds treated topically with nitrofurazone (0.2%, w/w)] and hexane extract group [diabetic model treated topically with hexane extract at a dose of 10% (w/w)]. The rate of wound contraction was estimated by measuring the wound area, which was marked on tracing paper by placing the paper on the wound on respective days (3, 6, 9, 12, 14 and 16) after wound creation. The area of the traced wounds was calculated by the use of a planimeter and the percentage rate of wound contraction was calculated. The number of days required for healing of the scar without any residual of the raw wound determined the period of epithelialization.

Biochemical Analyses of Excision Wounds

The rats were killed by cervical dislocation on days 4, 8, 12 and 16 in batches after wound creation, and the entire wound on each animal was cut out and stored at -70 °C until analysis. For estimations of collagen, the weighed granulation tissues were first defatted in chloroform: methanol mixture (2:1, v/v), hydrolyzed in 6.0 mol/L HCl for 18 h at 110 °C, evaporated to dryness, and then made up with a known volume of water. Collagen content of granulation tissues was made by hydroxyproline determination, as described by Woessner.⁽¹⁹⁾ For hexosamine estimations, wound tissues were processed as described above, except that the samples were lyophilized before hydrolysis.

The hexosamine content of granulation tissues were then estimated by the method of Elson and Morgan's.⁽²⁰⁾ Uronic acid was estimated by the method of Schneider WC.⁽²¹⁾

Total protein and DNA in wet granulation tissues were first homogenized in 5% trichloroacetic acid (TCA) followed by centrifugation.⁽²²⁾ Supernatant was used for the determination of DNA content by the method of Burton.⁽²³⁾ The precipitated proteins were suspended in 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.4, and the protein content estimated by the method of Lowry, et al.⁽²⁴⁾

Estimation of Antioxidant Enzymes

For estimation of superoxide dismutase (SOD) and catalase activity (CAT) granulation, tissues were homogenized using 0.02 mol/L potassium phosphate buffer pH 7.6 and centrifuged at 6,000 r/m. The obtained clear supernatant was assayed using commercial kits: SOD assay kit Bioxytech SOD-525 for SOD activity (Oxis International, Portland, USA), catalase assay kit for CAT (Cayman Chemical, Cayman Chemical, MI, USA).

Incision Wound

This assay was carried out on 48 male Wistar rats, with certification numbers: 1200–3412, provided by the Bioterio of the National School of Biological Sciences, Mexico. In the incision wound model, 6 cm-long para vertebral incisions were made through the skin on either side of the vertebral column of the rat. Care was taken to see that incision was at least 1 cm lateral to vertebral column. The wounds were closed with interrupted sutures 1 cm apart using a surgical thread and curved needle. The wounds were left undressed and drugs were topically applied to the wound once a day, until complete healing.

Measurement of Tensile Strength

Tensile strength is the resistance to breaking under tension. It indicates how much the repaired tissue resists to breaking under tension and may indicate in part the quality of repaired tissue. Sutures

were removed on the day 9 after wound creation and the tensile strength was measured. For this purpose, the newly formed tissue including scar was excised and tensile strength was measured with the help of tensiometer, which is based on method of Kuwano, et al.⁽²⁵⁾ In this method wound breaking strength was measured as the weight of water at the time of wound breaking per area of the specimen.

Statistical Analysis

All wound area measurements were expressed as percentage of the initial wound size. All values are expressed as mean \pm standard deviation. Parametric data were assessed by the method of one-way ANOVA, and then differences among means were analyzed with Fisher's protected least significant difference multiple-comparison test. Differences at $P < 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

Effect on Wound Healing

The wound contractions at different days are shown in Figure 1. Application of the hexane seeds extract of *B. crassifolia* resulted in complete wound healing within 15 days as opposed to only 60% surface healing in controls. On day 3, the hexane seeds extract at 10%-treated animals exhibited a considerable increase (52%). Significant increases in wound contraction were observed in the subsequent days after treatment with seeds extract as compared with the control. On day 14, 100% contraction was observed against only 61% and 90% in controls. It was also observed that epithelialization period of treated and standard group were better in comparison to simple ointment base-treated group. The epithelialization period of the treated wounds was reduced on day 14 ($P < 0.05$). However, nitrofurazone reduced epithelialization period on day 16 ($P < 0.05$) in comparison with the control group on day 22.

As shown in Table 1, in the incision wound model, a significant increase in the skin breaking strength was

Table 1. Effect of Hexane Extract on Incision and Dead Wound Space Wounds Model in Rats ($\bar{x} \pm s$)

| Group | n | Incision wound tensile strength (g) | Granuloma dry weight (mg/100 g) | Tensile strength (g) |
|----------------|---|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Normal | 6 | 381.16 \pm 4.37 | 53.75 \pm 2.41 | 331.03 \pm 4.18 |
| Model | 6 | 325.23 \pm 0.98* | 40.16 \pm 1.65* | 186.21 \pm 1.52* |
| Nitrofurazone | 6 | 599.67 \pm 1.87 ^Δ | 146.54 \pm 1.78 ^Δ | 474.23 \pm 5.88 ^Δ |
| Hexane extract | 6 | 612.10 \pm 1.45 ^Δ | 159.20 \pm 3.54 ^Δ | 483.95 \pm 5.16 ^Δ |

Notes: * $P < 0.01$, compared with the normal group; ^Δ $P < 0.01$, compared with the model group

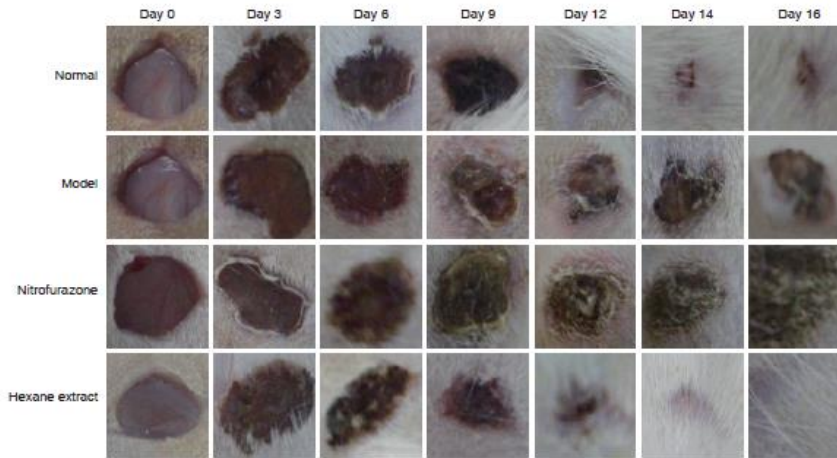


Figure 1. Images of Different Topical Treatments on Wound Healing in Rats

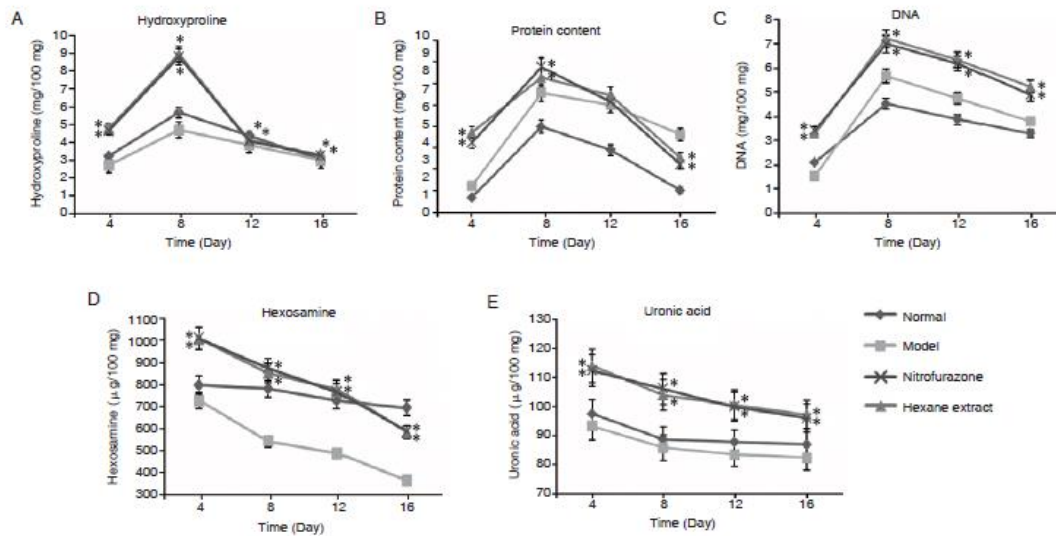


Figure 2. Comparison of Hydroxyproline, Total Protein, DNA Content, Hexosamine and Uronic Acid in Granulation Tissues of Rats among Groups ($\bar{x} \pm s$)

Notes: n=8; each experiment was done in triplicate. *P<0.01, compared with the model group

observed in rats treated with hexane extract followed by nitrofurazone reflecting the effect on collagen turnover. The effect of topically administration of the hexane extract on the dead space wound model was assessed by the increase in the weight of granulation tissue and the increase in its tensile strength.

Effect of Hexane Extract on Biochemical Parameters of Incision Wound

Figure 2 shows the collagen content (hydroxyproline), protein and DNA contents in granulation

tissues of topically treated rats. The results showed that hexane extract possesses a definitive prohealing action with a significant increase in hydroxyproline content (collagen levels), total protein and DNA. The synthesis of ground substance (hexosamine and uronic acid levels) was increased up to day 8 post-wounding in the treated group, where after the levels fell back to normal.

Effect of Hexane Extract on Enzymatic Antioxidants of Healing Wound

Estimation of antioxidant enzymes SOD and

CAT in the granulation tissues showed a significant increase in their levels up to day 8 followed by a gradual reduction up to day 16 when compared with diabetic model (Figure 3).

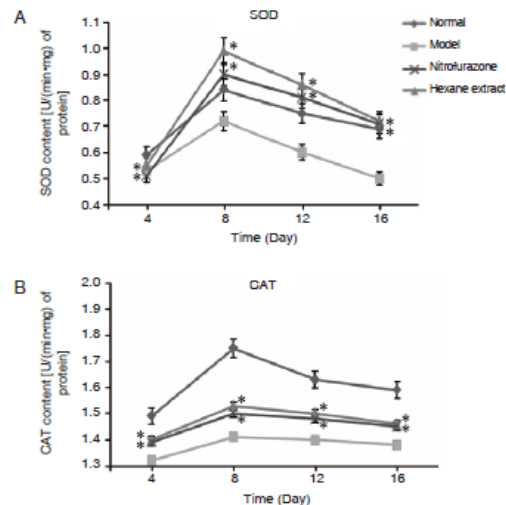


Figure 3. Effect of Topical Treatment of Hexane Extract on SOD and CAT ($\bar{x} \pm s$)

Note: * $P < 0.01$, compared with the model group

DISCUSSION

It has been observed that the rate of healing of wounds in diabetic patients is slow compared with healthy patients. Due to the unknown molecular mechanism involved and lack of successful evidence, treatment of diabetic wounds remains one of the greatest challenges for the clinician, making it important to understand the mechanism involved in the impaired skin wound healing in diabetes.

The results obtained from the present study showed positive signs in potentiating rate of wound healing in diabetic rats when compared with untreated rats. Hexane extract increase rate of wound contraction, and rate of epithelialization period. The rate of wound contraction was found to be significant in topically treated rats. Furthermore, rate of contraction determines the period of epithelialization, which can be defined as the centripetal movement of the edges of a full-thickness wound to facilitate closure of the defect.⁽²⁸⁾ The rate of contraction is associated with the amount of collagen deposited.

Collagen not only confers strength and integrity to the tissue matrix but also plays an

important role in homeostasis and in epithelialization at later phase of wound healing; hence enhanced collagen synthesis by *B. crassifolia* may significantly contributes to healing and also provides necessary strength to repaired tissue. Hexane extract increase hydroxyproline content of the granulation tissue. Elevated hydroxyproline levels in regenerated tissue suggests enhanced collagen synthesis, an important constituent of extracellular matrix.⁽²⁷⁾

Since wounds treated with the *B. crassifolia*, showed greater tensile strength, it may be inferred that it not only increases collagen synthesis per cell, but also aids in cross-linking of the protein. *B. crassifolia*-treated wounds also showed an increased rate of wound contraction, leading to quicker healing as confirmed by decreased period of epithelialization when compared to untreated control wounds.⁽²⁸⁾ Synthesized collagen molecules are laid down at the wound site and become cross-linking to form fibers. Wound strength is acquired from both, remodeling of collagen, and the formation of stable intra- and inter-molecular cross-linking. This indicated improved collagen maturation by increase cross-linking while an increase in dry granuloama weight indicated higher protein content.⁽²⁹⁾

The increase in DNA content in the treated wounds indicates cellular hyperplasia. Concomitant with this, there is an increase in the total protein content indicating active synthesis and deposition of matrix proteins in the granulation tissues. Collagen forms an essential component of the extracellular matrix and the healing process depends, to a large extent, on the regulated biosynthesis and deposition of new collagens and their subsequent maturation. The levels of type III collagen are particularly increased during early stages of healing. Assessment of collagen content in granulation tissues of the control and experimental wounds clearly suggests that *B. crassifolia* enhanced the production of new collagens.⁽³⁰⁾

Hexosamine and uronic acid are matrix molecules which act as ground substance for the synthesis of new extracellular matrix. It is reported that there is an increase in the levels of these components during the early stages of wound healing, following which normal levels are restored.⁽³⁰⁾ A similar trend was observed in *B. crassifolia* treated wounds wherein the levels of hexosamine and uronic acid increased up to day 8 post-wounding and decreased thereafter.

SOD and CAT play a major role in detoxifying free radicals and other cytotoxic chemical species, which resulted in potentiation of healing processes. The results obtained from the present study showed increases in the levels of SOD and CAT up to day 8 of treatment, tending to normalize gradually on day 16. The levels of both enzymes were found to be higher in the treated rats. Diabetic model group showed decreased enzymatic activities which may be attributed to overproduction of reactive oxygen species, thus delayed healing response.

In conclusion, the results of study showed that the hexane extract ointment of *B. crassifolia* may be a potential candidate for dermal wound healing because its positive influence on various phases of the healing process. Wound healing properties of the plant validate their use in traditional medicine for treating injuries. Results obtained encourage us to carry out a wider and a deeper study of this plant to obtain a better understanding of its therapeutic possibilities.

Acknowledgement

The authors are immensely thankful to the Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal for their support.

REFERENCES

- Nayak BS, Raju SS, Eversley M, Ramsubhag A. Evaluation of wound healing activity of *Lantana camara* L. A preclinical study. *Phytother Res* 2009;23:241-245.
- Gupta A, Upadhyay NK, Sawhney Kumar RC. A poly-herbal formulation accelerates normal and impaired diabetic wound healing. *Phytother Res* 2008;16:223-227.
- Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnason-Tennvall G, Alpelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* 2005;306:1719-1742.
- Davison GW, George L, Jackson SK, Young IS, Davies B, Bailey DM, et al. Exercise, free radicals and lipid peroxidation in type I diabetes mellitus. *Free Rad Biol Med* 2002;33:1543-1551.
- Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M Roy S. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. *Ann NY Acad Sci* 2002;957:239-249.
- Bejar E, Malone MH. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. Part I. *J Ethnopharmacol* 1993;39:141-158.
- Alves GL, Franco MRB. Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia*). *J Chromatogr A* 2003;985:297-301.
- Geiss F, Heinrich M, Hunkler D, Rimpler H. Proanthocyanidins with (+)- epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry* 1995;39:635-643.
- Rastrelli L, De Tommasi N, Berger I, Cáceres A, Saravia A, De Simona F. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry* 1997;45:647-650.
- Berger I, Barrientos AC, Cáceres A, Hernández M, Rastrelli L, Passreiter CM, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol* 1998;62:107-115.
- Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem* 2007;101:1012-1018.
- Martinez-Vazquez M, Gonzalez-Esquinca AR, Cazares LL, Moreno GMN, Garcia-Argaer AN. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *J Ethnopharmacol* 1999;66:79-2.
- Maldini M, Sosa S, Montoro P, Giangaspero A, Balick MJ, Pizza CD, et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. *J Ethnopharmacol* 2009;122:430-433.
- Cacers A, Lopez B, Gonzalez S, Berger I, Tada I, Maky J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants *J Ethnopharmacol* 1998;62:195-202.
- Perez-Gutierrez RM, Muñiz-Ramirez A, Gomez YG, Bautista-Ramirez E. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiglycation of *Byrsonima crassifolia* fruits. *Plant Foods Hum Nutr* 2010;18:2071-2078.
- Soulsby J. The new ointment bases of the British Pharm. *Br Dermatol* 2006;61:206-210.
- Biswas M, Kar B, Bhattacharya S, Kumar S, Ghosh AK, Haldar PK. Antihyperglycemic activity and antioxidant role of *Terminalia arjuna* leaf in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol* 2011;49:335-340.
- Palu AK, Kalisi T, Palu K, Palu A, Hifo T. Fakatafe: A forgotten art of traditional wound-healing using nonu leaves in the Friendly Islands of Tonga. *J Med Food Plants* 2010;2:27-33.
- Woessner JR Jr. The determination of hydroxyproline in tissues and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961;93:440-447.
- Elson LA, Morgan WTJ. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem J* 1933;27:1824-1828.

21. Schneider WC. Nucleic acids and derivatives. *Methods Enzymol* 1957;3:680-684.
22. Schiller S, Slover G, Dorfman AA. A method for separation of acid mucopolysaccharides: Its application for the isolation of heparin from the skin of rats. *J Biol Chem* 1961;236:983-987.
23. Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Bioch J* 1956;62:315-323.
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RT. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-276.
25. Kuwano H, Vano K, Ohano S, Ikebe M, Kitampura K, Toh Y, et al. Dipyridamole inhibits early wound healing in rat skin incisions. *J Surg Res* 1994;56:267-270.
26. Wang Z, Li L. The plasmid encoding Hsp47 enhances collagen expression and promotes skin wound healing in an alloxan-induced diabetic model. *Cell Biol Int* 2009;20:1-6.
27. Manjunatha BK, Vidya SM, Krishna V, Mankani KL, Jagadeesh S, manohara YN. Comparative evaluation of wound healing potency of *Vitex L.* and *Vitex altissima L.* *Phytother Res* 2007;21:457-461.
28. Rathi B, Pathi PA, Baheti AM. Evaluation of aqueous extract of pulp and seeds of *Moringa oleifera* for wound healing in albino rats. *J Natur Rem* 2004;4:145-149.
29. Kwon AH, Qiu Z, Hashimoto M, Yamamoto K, Kimura T. Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin induced diabetic rats. *Am J Surg* 2009;197:503-509.
30. Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1031-1037.

(Received July 26, 2011)
Edited by YUAN Lin

ANEXO B. Artículo en prensa

B.1. Antimicrobial activities of diterpene labdane from seeds of *Byrsonima crassifolia*

De: "Jose Luis Martinez" editor.blacpma@usach.cl

Para: "rmpg" rmpg@prodigy.net.mx

Cc:

Fecha: Wed, 08 May 2013 01:23:36 -0400

Asunto: RE: Desde BLACPMA

Dra. Perez Gutierrez:

Con mucho agrado le informo que su artículo BLACPMA 665 ha sido aceptado para ser publicado en nuestra revista.

Le saluda

José Luis Martínez

Editor Jefe

Antimicrobial activities of diterpene labdane from seeds of *Byrsonima crassifolia*

[Actividad antimicrobial de diterpenos labdanos de la semilla de *Byrsonima crassifolia*]

Alethia Muñiz-Ramirez¹, Rosa Martha Perez Gutierrez², Efren Garcia Baez³, Jose Maria Mota Flores²

¹Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav-IPN, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Mexico D.F., CP 07360. D.F.

²Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, IPN. Av. Instituto Politecnico Nacional S/N Unidad Profesional Adolfo Lopez Mateos, Col. Zacatenco, CP 07758, Mexico D.F.

³Departamento de Biotecnología, UPIBI-IPN, Col. San Pedro Zacatenco, Mexico D.F., CP 07360.

Contactos | Contacts: Rosa Martha PEREZ GUTIERREZ - E-mail address: rmpg@prodigy.net.mx

Corresponding author: Rosa Martha Perez Gutierrez· Laboratorio de Investigación de productos naturales.

Abstract

Two compounds from the hexane extract of seeds of *Byrsonima crassifolia* were isolated and their structures elucidated using extensive spectroscopic analyses. These compounds are derived from the new labdane diterpene Labda-17-(**1**) and the known antimicrobial Labda-8 (17)-(2). The present study was aimed to study the effect antimicrobial of novel diterpene **1** against bacterial pathogens showed a moderate activity with MIC values 18.79-70.12 µg/ml and a MBC ranging between 250-1000 µg/ml against all assayed microorganisms.

Keyword: *Byrsonima crassifolia*, diterpene, labdane, antimicrobial

Resumen

Se aislaron dos compuestos del extracto de hexano de semillas de *Byrsonima crassifolia* y sus estructuras se dilucidaron por medio de extensos análisis espectroscópicos. Estos compuestos derivados del labdano corresponden al nuevo diterpeno Labda-17- (**1**) y el conocido antimicrobiano Labda-8(17)-(**2**). En el presente estudio se estudió el efecto antimicrobiano del nuevo diterpeno **1** sobre algunas bacterias patógenas mostrando sobre de estas una actividad moderada, con valores de MIC de 18.79-70.12 µg/ml y un rango de MBC que oscila entre 250-1000 µg/ml frente a todos los microorganismos ensayados.

Palabras clave: *Byrsonima crassifolia*, diterpeno, labdano, antimicrobiano

INTRODUCTION

Byrsonima crassifolia is a tropical tree, commonly known as “nanche”, distributed widely in México, Central and South America (Holmgren et al., 1990). Nanche fruit is edible and bright yellow when after ripened, it has sweet taste and slightly bitter taste. In México, nanche is consumed as juice, liquor, jelly and candy. Since prehispanic times it has been used as medicine, reports on ethnobotanical uses include: bark, to promote bleeding in females, to facilitate childbirth and snakebite treatment; aerial parts, used as diuretic, febrifuge, to expel placenta and for diarrhea treatment; fruit, used for fever treatment and to induce a pleasant dizziness; bark and branches, assist in tightening loose teeth and fish poison; and finally, seeds for dysentery, infections, wound healing and anti-inflammatory (Bejar and Malone, 1993). Phytochemical studies indicate that nanche plant contains esters (Alves and Franco, 2003), epicatechins (Geiss et al., 1995), glycolipids (Rastrelli et al., 1997). A pharmacological study of leaf and bark extracts displayed spasmogenic effects (Bejar and Malone, 1993). In another study, a chloroformic extract from bark showed anti-inflammatory activity when evaluated by the Croton oil model (Silva et al., 2007). Furthermore, the antioxidant activity of extracts from leaves, fruits and bark has been determinate (Maldini et al., 2009). The ethyl-acetate extract of roots exhibited antibacterial activity (Martinez-Vazquez et al., 1999). Also, the aqueous extract of leaves inhibited some dermatophytes (Caceres et al., 1993). The ethanol extract of leaves showed trypanocidal activity against *Leishmania mexicana* promastigotes

(Berger et al., 1998). The hypoglycemic activity of hexane extract have previously been reported (Perez-Gutierrez et al., 2010). Based on traditional uses of seeds from *B. crassifolia* and given the lack of scientific studies on its potential pharmacological properties, the aim of this study was to investigate the potential antibacterial activity of a new diterpene labdane from seed of *B. crassifolia*.

MATERIALS AND METHODS

General experimental procedures

IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer FTIR 1720X. Optical rotations were measured by a Perkin-Elmer 192 polarimeter equipped with a sodium lamp (589 nm). ¹H-NMR and ¹³CNMR spectra were taken at a Bruker DRX-300 NMR spectrometer, with UXP software package, was used for NMR experiments; chemical shifts are reported in δ (ppm), downfield relative to TMS as an internal standard. The NMR experiments were carried out using the conventional pulse sequences as described in the literature. HREIMS were measured on a JEOL HX 110 mass spectrometer. Precoated TLC silica gel 60 F254 aluminum sheets and Sephadex LH-20 from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) were used. Column chromatography was carried on Silica gel 60 (230-400 mesh, Merck Co. New Jersey (USA), solvents used as eluents from Fermont (California, USA).

Plant material

B. crassifolia L. belong to the Malpighiaceae family, fruit were collected in Morelos state and were taxonomically authenticated in the Herbarium of Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. A voucher specimen of the plant is stored for reference (No. 8976).

Extraction, isolation and characterization of the B. crassifolia diterpene derived
Seeds was air dried and the ground (4 kg) was extracted twice with hexane for 3 h. The seeds extracts were combined and evaporated *in vacuum* to generate a residue

(225 g). The resulting extract was loaded onto a silica gel column chromatography and eluted with petroleum ether-acetone-hexane 2:1:0.5 and 7 fractions (F1-F-7) have been obtained. These fractions were then tested for antimicrobial activity. Active fractions were pooled together according to their similarities provides by thin layer chromatography analysis. The fraction F3 was the fraction that showed antimicrobial properties. F3 was subjected to silica gel column chromatography eluted with CHCl₃-EtOAc (11:2) to produce five fractions (F3-1 to F3-5). The active fraction F3-4 was subjected to chromatographed over silica gel column using CH₂Cl₂-CHCl₃ 3:1.5 to yield four subfractions (F34-1 to F34-4). The F34-1 fraction was further purified by preparative plate using petroleum ether-EtOAc 1:4 and visualized with UV at 254 nm. Fraction F341-2 was separated by Sephadex LH-20 using a gradient of CHCl₃-MeOH (from 10:1 to 5:1) to yield **1** (80 mg) and **2** (67 mg).

Compound **1**: Yellowish oil; $[\alpha]_D^{24}$ -21.4° (CHCl₃, c 0.68); IR ν_{\max} 2924, 2854, 1710, 1645, 1460, 1375, 1163, 1096, 895 cm⁻¹; m/z 588.9254 [M+H]⁺, (calc, for C₃₈H₆₈O₄, 588.9217); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 1.55 (m, H-1a), 1.76 (dd, J = 13.1, 3.4 Hz, H-1b), 1.46 (dd, J = 13.1, 3.4 Hz, H-2a), 1.66 (m, H-2b), 1.22 (m, H-3a), 1.58 (m, H-3b), 1.34 (m, H-5), 1.70 (m, H-6), 1.33 (1H, m, 7a), 1.39 (m, H-7b), 1.84 (m, H-8), 1.96 (m, H-9), 1.39 (m, H-11a), 1.59 (m, H-11b), 2.16 (m, H-12a), 1.76 (m, H-12b), 5.3 (t, J = 6.4 Hz, H-14), 3.74 (2H, d, J = 7.2 Hz, H-15), 0.96 (3H, s, H-16), 4.08 (2H, d, J = 2.8 Hz, H-17), 1.17 (s, H-18), 1.18 (s, H-19), 0.75 (s, H-20), 2.02 (s, COOMe), 2.04, (s, COOMe), 1.18-1.25 (CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 33.21 (C-1), 18.23 (C-2), 34.65 (C-3), 41.64 (C-4), 52.24 (C-5), 25.71 (C-6), 39.89 (C-7), 37.82 (C-8), 54.32 (C-9), 36.81 (C-10), 24.16 (C-11), 43.21 (C-12), 129.89 (C-13), 131.18 (C-14), 68.72 (C-15), 16.52 (C-16), 62.54 (C-17), 33.71 (C-18), 22.35 (C-19), 14.23 (C-20), 172.13 (COOMe), 20.98 (COOMe), 173.07 (CH₂-COO-CH₂).

Screening for antibacterial activity

Compound **1** was dissolved in DMSO at a final concentration of 10 mg/ml and serial dilutions were prepared using the same solvent which were aseptically dispensed onto sterilized 6 mm filter paper discs and dried. The disk-diffusion method (

Gaydos., 1982) was used to measure the antimicrobial activity of the compounds. The different organisms were seeded over previously sterilized Mueller-Hinron agar for bacteria. The zones of growth inhibition were observed around dried disks (Whatman 6 mm diameter). Each plate was inoculated with 0.1 ml of a bacterial culture directly from the 24 h broth culture diluted to match 0.5 MacFarland standard (108 Colony Forming Units (CFU)/ml). Inoculums on the plates were aseptically spread using a sterile glass rod to avoid contamination and allowed to stand for 2-3 minutes in a refrigerator at 4°C. The discs loaded with **1** were then placed onto the seeded plates. The bacterial cultures were incubated at 37°C for 24hr. After the incubation period, the zones of inhibition were measured and recorded in mm as described by Elgayyar et al., (2000). Negative controls were done by using sterile 6mm discs soaked in 10 ml of DMSO and dried.

Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC)

Compound **1** from the antibacterial screening was tested for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The MIC was determined on 96-well microdilution plates according the published protocols (Micheal et al., 2003). The MBC were determined by sub-culturing 0.1 ml of all the tubes showing no growth on Nutrient Agar (NA). After 24 h incubation at 37°C, the first plate showing no growth was recorded as the MBC. The MICs accuracy was checked against standard antibiotics. Sterility of the media was controlled by use of broth only in a negative control tube, and growth of the organism was checked by broth plus microorganism in question in a positive control tube. All the controls were subjected to the same conditions as the tests. Antimicrobial sensitivity and resistance were confirmed by use of standard discs containing ciprofloxacin (10 µg/ml).

RESULTS AND DISCUSSION

Two compounds were isolated from hexane extract of seeds of *B. crassifolia* after purification through silica gel column chromatography. Compound **1** showed a molecular ion at m/z 588.9254 in its HREIMS and the presence of 24 carbons on the ^{13}C NMR spectrum suggested a molecular formula $\text{C}_{38}\text{H}_{68}\text{O}_4$. DEPT experiments classified the protonated carbon signals to six methyls, twenty three methylenes, four methines and five quaternary carbons. The IR spectrum of **1** showed absorption bands at ν_{max} 1645 cm^{-1} to double bond and 1710 and 1163 cm^{-1} corresponding to an ester group, it was supported by the presence of signal of quaternary carbons at δ_{C} 172.13 and δ_{C} 173.07 in its ^{13}C NMR spectrum. Its ^1H NMR spectrum showed signals for four tertiary methyl groups (δ_{H} 0.96, s; 1.17, s; 1.18, s; 0.75, s), one trisubstituted double bonds (δ_{H} 5.3, t, $J=6.4\text{ Hz}$) and two acetoxy groups (δ_{H} 2.02, s and 2.04, s). In the ^{13}C NMR spectrum, two acetoxy carbonyl carbons (δ_{C} 172.13, and 173.07), and the one 129.89, trisubstituted double bonds characterized by the presence of the two olefinic carbons (δ_{C} and 131.18). Inspection of the 2D NMR data (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, HSQC and HMBC) allowed the assignments of all the signals observed in the 1D NMR spectra and revealed the labdane skeleton of the diterpene **1** (Bohlmann and Czerson, 1979; Timmermann et al., 1986). Connectivities in the HMBC spectrum from H-17 to C-7, C-8 and C-9 (δ_{C} 54.32) corroborated the location of the side chain to be at C-9, whose methine proton H-9 (δ_{H} 1.96) formed an isolated proton spin system with H-11 (δ_{H} 1.39 and δ_{H} 1.59) and H-12 (δ_{H} 1.76 and 2.16) as deduced from the COSY and TOCSY spectra (Itokawa et al., 1988). A trisubstituted double bond was located at C-13 (δ_{C} 129.89) and C-14 (δ_{C} 131.18) on the basis of $^2\text{J}_{\text{C-H}}$ and $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ HMBC correlations from Me-16 (δ_{H} 0.96) to C-12 (δ_{C} 43.21), C-13 and C-14, and from the olefinic proton H-14 (δ_{H} 5.3) to C-12 (Fig. 1). The double bond at C-13 was assigned as the E configuration because of the ROESY correlation observed between H-15 and Me-16, and by comparison of NMR data with those of related compounds (Urones et al., 1995; Su et al., 1996). Large number of methylene groups (22.7-34.4),

suggesting the presence of fatty acid esterified with the labdane derivative at C-15 . It is supported by the HMBC correlation between methylene protons H₂-15 (δ_{H} 4.08, 2H,d, J= 7.2 Hz) and methylene chain and the quaternary carbon δ_{C} 173.07. Analysis of ¹H-¹H COSY showed clear correlation between H5/H6, H6/H7, H11/H12. One methyl group (δ_{C} 16.52), and large number of methylene groups (δ_{C} 22.6-34.5) (DEPT) suggesting the presence of monoenic fatty acid esterified with a labdane derivative at C-15 . The NMR data of the long-chain moiety were in good accordance with those for Δ^9 -18:1 *cis* fatty acid esters (Mannina et al., 1999). Therefore, compound **1** was identified as labda-17-acetoxi-13E-en-15-palmitate. All data of ¹H NMR and ¹³CNMR spectra, ¹H-¹H, COSY and HMBC connectivities of **2** allowed the identification of labda-8(17),13E-dien-19-carboxy-15-yl palmitate which was previously isolated from *Cretan propolis* (Peopova et al., 2009) exhibited a weak antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata*. Screening of the *in vitro* antimicrobial activity of diterpenoid **1** was studied against Gram positive microorganisms *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and Gram negative microorganisms as *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Pseudomonus aeruginosa*, *Salmonella Typhi*, *Shigella boydii*, *Salmonella dysenteriae*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio parahemolyticus* of significant importance using the filter paper disc agar diffusion technique. All the tested bacteria were standard strains from ATCC (American type culture collection). The results showed variations in the antimicrobial properties of diterpene labdane **1** (Table 1). Compound **1** had strong activity (inhibition zone \geq 20 mm), moderate activity (inhibition zone < 20-12 mm) and no inhibition (zone < 12 mm). The most effective **1** was that of, *S. paratyphi* (23.87 ± 0.65 mm, zdi), followed by *P. aeruginosa* (21.45 ± 0.53 mm, zdi), *S. Typhi* (20.72 ± 0.56 mm, zdi), *B. subtilis* (20.89 ± 2.90 mm, zdi). In contrast, showed a moderate activity against *B. megaterium* (19.20 ± 3.42 mm, zdi), *B. cereus* (18.76 ± 0.68), *Staphylococcus aureus* (17.95 ± 1.78), *Escherichia coli* (13.35 ± 1.43), and *S. dysenteriae* (16.52 ± 1.88). However, no significant antimicrobial effect against *Vibrio*

mimicus (12.08 ± 4.12), *Sarcinia lutea* (12.17 ± 1.23), *V. parahemolyticus* (11.87 ± 4.20) and *Shigella boydii* (0.0 mm) was observed. Gram-positive bacterial cells were, in general, more resistant to the presence of antimicrobial than Gram-negative.

However, more precise data on antimicrobial properties were obtained through determinations of bacteriostatic and bactericidal concentrations. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) the results are shown in Table 1. The most bacteriostatic properties was against all Gram-negative strains assayed. Martinez-Vazques et al (1999) studied ethyl acetate, methanol extracts of roots and stems of *B. crassifolia* against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Micrococcus luteus*. The ethyl acetate of roots was the most active. In another research had been previously studied methanol extract from *B. crassifolia* against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans* (Navarro et al., 1996). The results obtained by us indicate the existence of antimicrobial compounds in this plant, and show a good correlation between the reported studies of *B. crassifolia* uses in traditional medicine against infectious diseases and the experimental data of such extracts toward the most common pathogens. Also results indicate the existence of antimicrobial compounds in the hexane extract of *B. crassifolia*, the phytochemical isolation and identification of two active compounds indicates that the antimicrobial activity of the seed of *B. crassifolia* is due mainly to the presence of compounds labdane diterpene.

In conclusion the present study shows that antimicrobial activity is present in the seeds of *B. crassifolia*. Bioassay with the purified diterpene **1** indicated that exhibited strong activity against Gram negative bacterias. The results suggest that further investigations against other enteric Gram-positive and Gram-negative bacteria, which are frequently resistant to drugs commonly used in therapy, may be carried out.

Acknowledgement

The authors are immensely thankful to the Instituto de Ciencia y Tecnologia del Distrito Federal for their support.

References

- Alves GL. Franco MRB. 2003. Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia*). **J. Chromatogr. A** 985: 297 - 301.
- Bejar E. Malone MH. 1993. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia* a medicinal tree from México. Part I. **J. Ethnopharmacology** 39: 141 - 158.
- Berger I. Barrientos AC. Cáceres A. Hernández M. Rastrelli L. Passreiter C.M. Kubelka W. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacol** 62: 107 - 115.
- Bohlmann F. Czerson H. 1979. Neue labdan- und pimaren-derivate aus *Palafoxia rosea*. **Phytochemistry** 18: 115 - 118.
- Caceres A. Brenda B. Lopez R. Giron MA. Logemann H. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. I. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. **J. Ethnopharmacol** 40: 207 - 213.
- Elgayyar M. Draughon FA. Golden DA. Mount JN. 2000. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **J. Food Prot** 64: 1019 - 1024.
- Gaydos JM. Harrington BJ. 1982. Agar disk diffusion for the quality control testing of
Autobac elution disks. **Antimicrob. Agents Chemother** 21: 516 - 518.
- Geiss F. Heinrich M. Hunkler D. Rimplerl H. 1995. Proanthocyanidins with(+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. **Phytochemistry** 39: 635 - 643.
- Holmgren KH. Holmgren NH. Barnett LC. 1990. **Index Herbariorum**. Part 1: The herbaria of the world. 8a ed. New York Botanical Garden. Nueva York. 693-694.
- Itokawa H. Yoshimoto S. Morita H. 1988. Diterpenes from the rhizomes of *Alpinia formosana*. **Phytochemistry** 27: 435 - 438.
- Maldini M. Sosa S. Montoro P. Giangaspero A. Balick MJ. Pizza CD. Loggia R. 2009. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **J. Ethnopharmacol** 122: 430 - 433.
- Mannina L. Luchinat C. Emanuele MC. Segre A. 1999. Acyl positional distribution of glycerol tri-esters in vegetable oils: a ¹³C-NMR study. **Chem. Phys. Lipids** 103: 47 - 55.
- Martinez-Vazquez M. Gonzalez-Esquinca AR. Cazares LL. Moreno GMN. Garcia-Argaer AN. 1999. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.). H.B.K. **J. Ethnopharmacol** 66: 79-82.

- Micheal JP. Chan ECS. Krieg NR. 2003. Microbiology. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi, 510-539.
- Navarro V. Villarreal ML. Rojas G. Lozoya X. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. J Ethnopharmacol. 53:143-147.
- Rastrelli, L. De Tommasi N. Berger I. Caceres A. Saravia A. De Simona F. 1997. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry** 45: 647 - 650.
- Silva EM. Souza JNS. Rogez H. Rees, JF. Larondelle Y. 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chem** 101: 1012 - 1018.
- Su W. Fang J. Cheng Y. 1996. Diterpenoids from leaves of *Cryptomeria japonica*. **Phytochemistry** 41: 255 - 261.
- Peopova MP. Chinou IB. Marekov IN. Bankova VS. 2009. Terpenes with antimicrobial activity from *Cretan propolis*. **Phytochemistry** 70: 1262 - 1271.
- Perez-Gutierrez RM. Muñoz-Ramirez A. Gomez Gomez Y. Bautista-Ramirez E. 2010. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiglycation of *Byrsonima crassifolia* fruits. Plant Foods Hum Nutr Aug 18, 20717728.
- Timmermann BN. Hoffmann JJ. Jolad SD. Bates RB. Stahaan TJ. 1986. Labdane diterpenoid from *Grindella discoidea* (Asteraceae). **Phytochemistry** 25: 1389 - 1392.
- Urones JG. Isidro S. Marcos IM. Oliva NM. Garrido JH. Vanessa MH. 1995. Labdane diterpenes from *Halimium viscosum*. **Phytochemistry** 38: 663-666.

Table 1

Antimicrobial activity of the compound 1 obtained from seeds of *Byrsonima crassifolia*

| Test microorganisms | Inhibition zone diameter (mm) | MIC (µg/ml) | MBC (µg/ml) |
|--|-------------------------------|--------------|-------------|
| Gram positive bacteria | 18.76 ± 0.68 | | |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 | | 38.34 ± 1.87 | 500 |
| <i>B. megaterium</i> ATCC 12872 | 19.20 ± 3.42 | 43.26 ± 2.76 | 500 |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | 20.89 ± 2.90 | 41.28 ± 3.29 | 500 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | 17.95 ± 1.78 | 36.79 ± 1.87 | 500 |
| <i>Sarcinia lutea</i> ATCC 9341 | 12.17 ± 1.23 | 58.84 ± 4.76 | 1000 |

| Gram negative bacteria | | | |
|---|--------------|--------------|------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 13.35 ± 1.43 | 69.20 ± 2.76 | 1000 |
| <i>Pseudomonus aeruginosa</i> ATCC 9027 | 21.45 ± 0.53 | 32.41 ± 4.11 | 500 |
| <i>Salmonella paratyphi</i> ATCC 6539 | 23.87 ± 0.65 | 20.27 ± 1.04 | 250 |
| <i>S. Typhi</i> ATCC 43971 | 20.72 ± 0.56 | 18.79 ± 2.54 | 250 |
| <i>Shigella boydii</i> ATCC 9207 | 0.0 | - | - |
| <i>S. dysenteriae</i> ATCC 13313 | 16.52 ± 1.88 | 45.67 ± 3.87 | 500 |
| <i>Vibrio mimicus</i> ATCC 33654 | 12.08 ± 4.12 | 66.78 ± 5.14 | 1000 |
| <i>V. parahemolyticus</i> ATCC 43996 | 11.87 ± 4.20 | 70.12 ± 4.98 | 1000 |

Zone diameter inhibition (ZDI) of compound 1 (20 µg) per disk

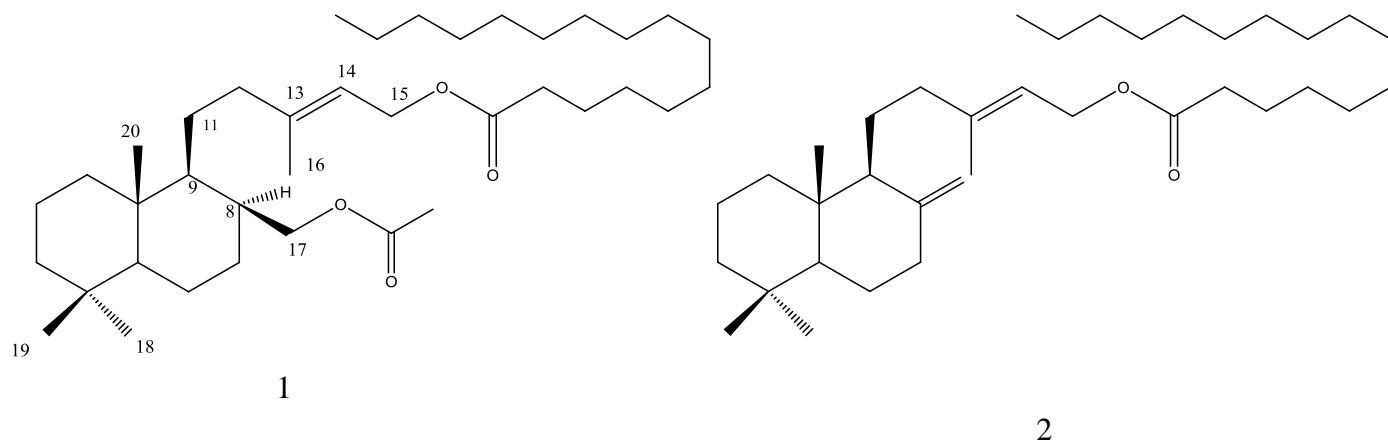


Fig 1. Compounds 1 and 2 isolated from *B. crassifolia*

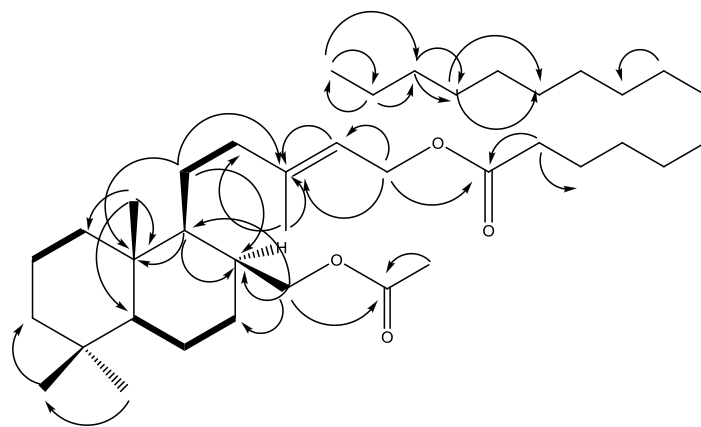
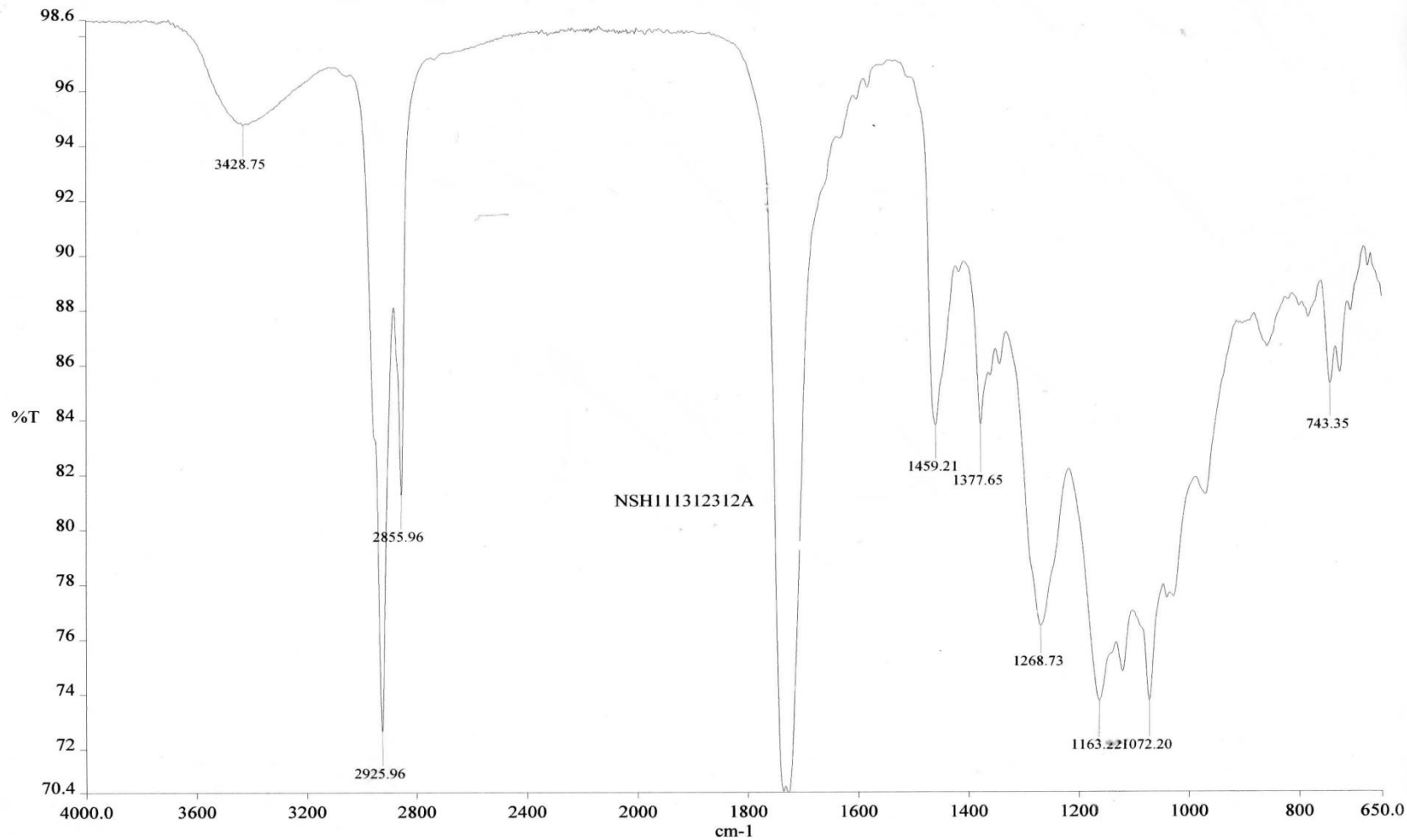


Fig 2. Selected ^1H - ^1H COSY (bold) and ^1H - ^{13}C HMBC (arrow) correlations of **1**

ANEXO C. Espectros de birsonina A

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERIA QUIMICA E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS

LABORATORIO DE INVESTIGACION QUIMICA ORGANICA Y POLIMEROS



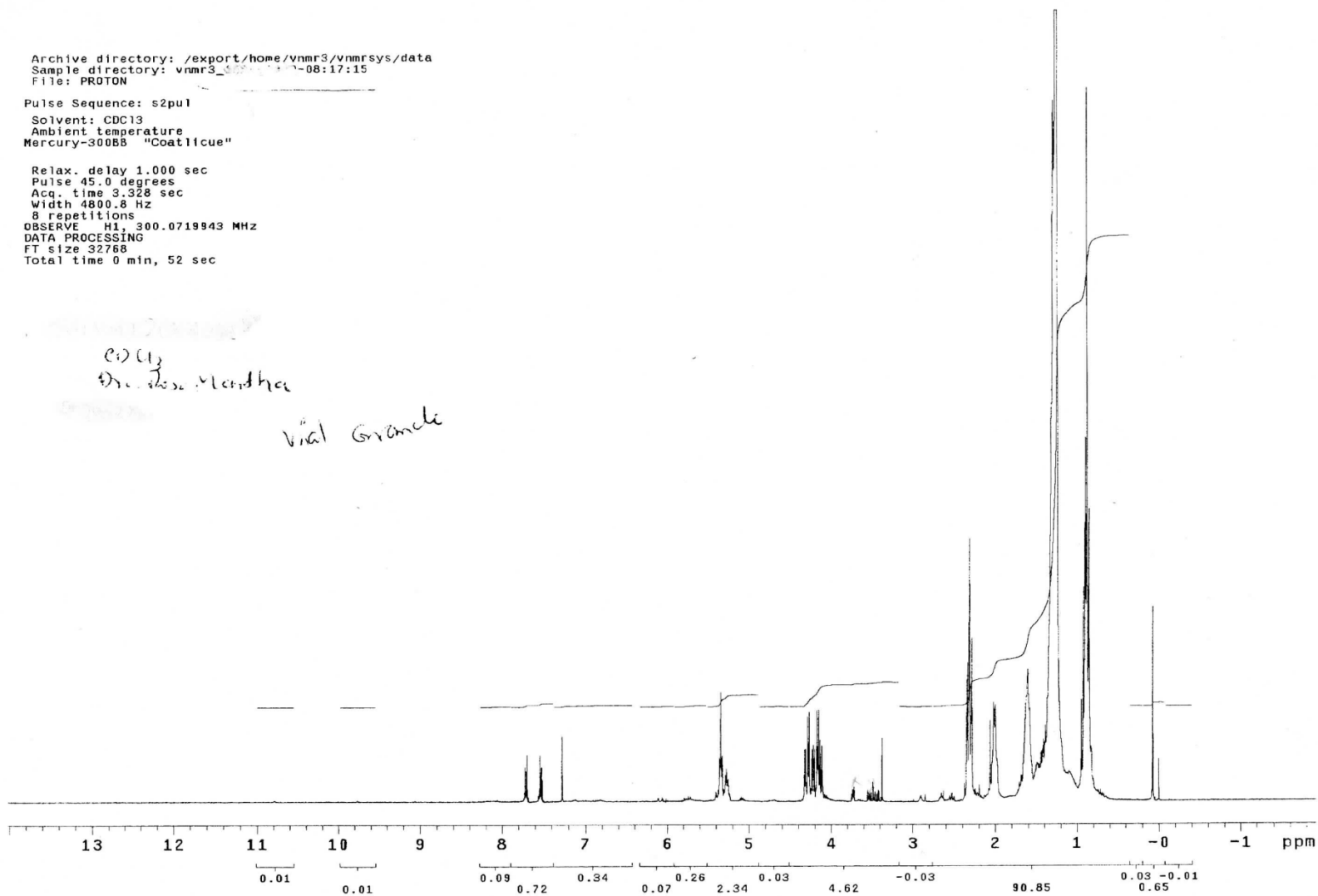
Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Sample directory: vnmr3_000001-08:17:15
File: PROTON

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatlilcue"

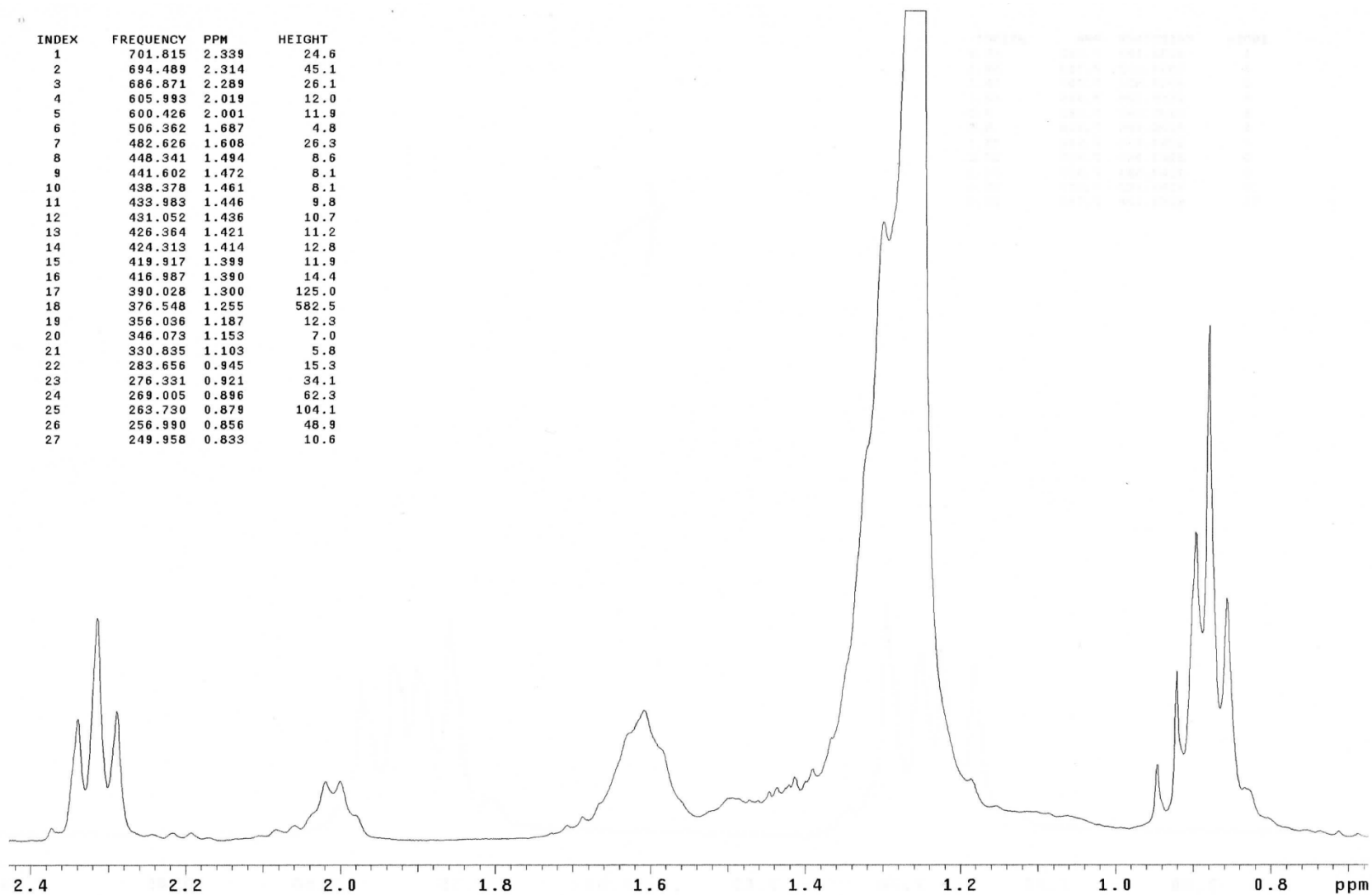
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.328 sec
Width 4800.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 300.0719943 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min, 52 sec

CDCl₃
Dr. Jose Mendez

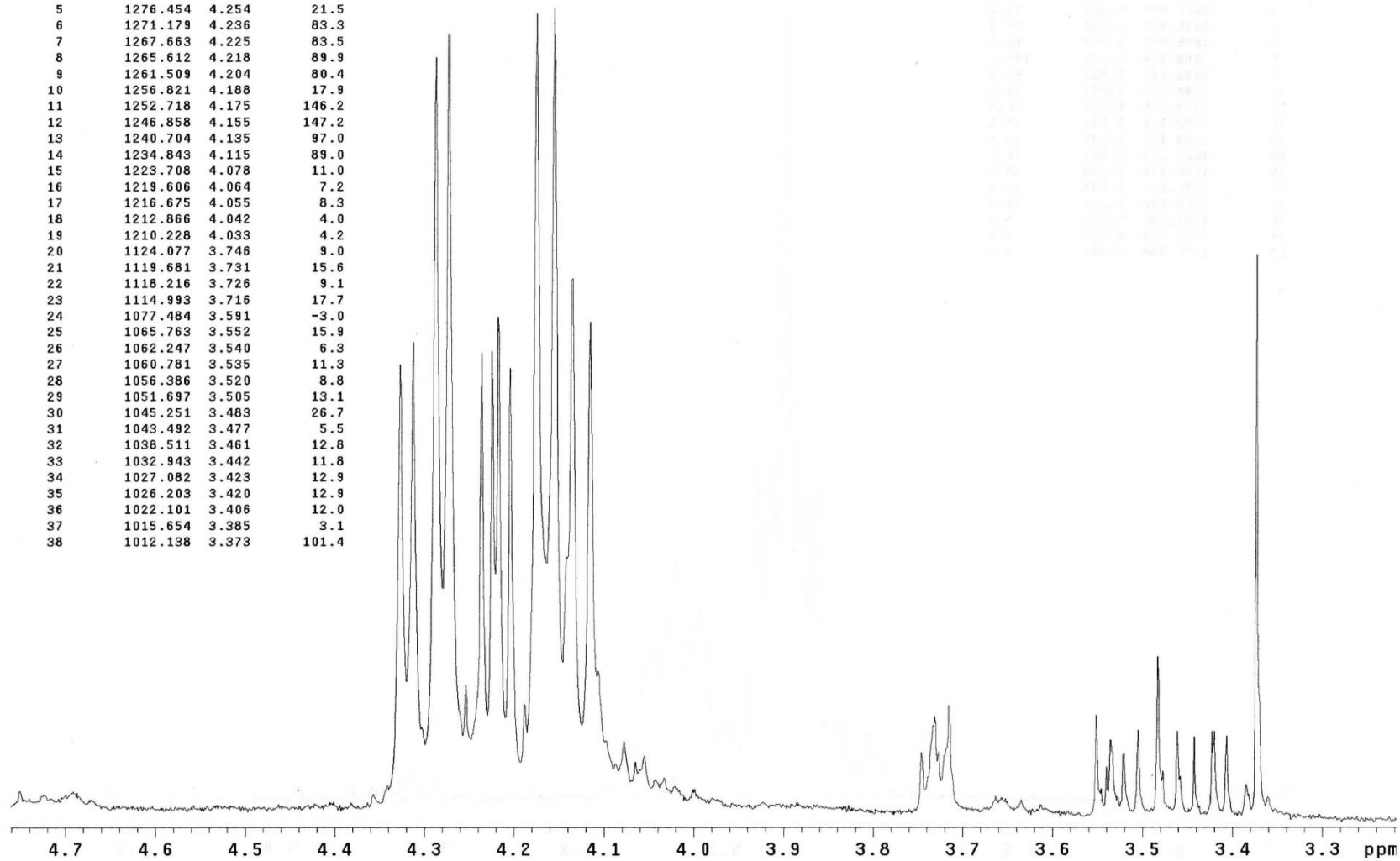
Vial Grande



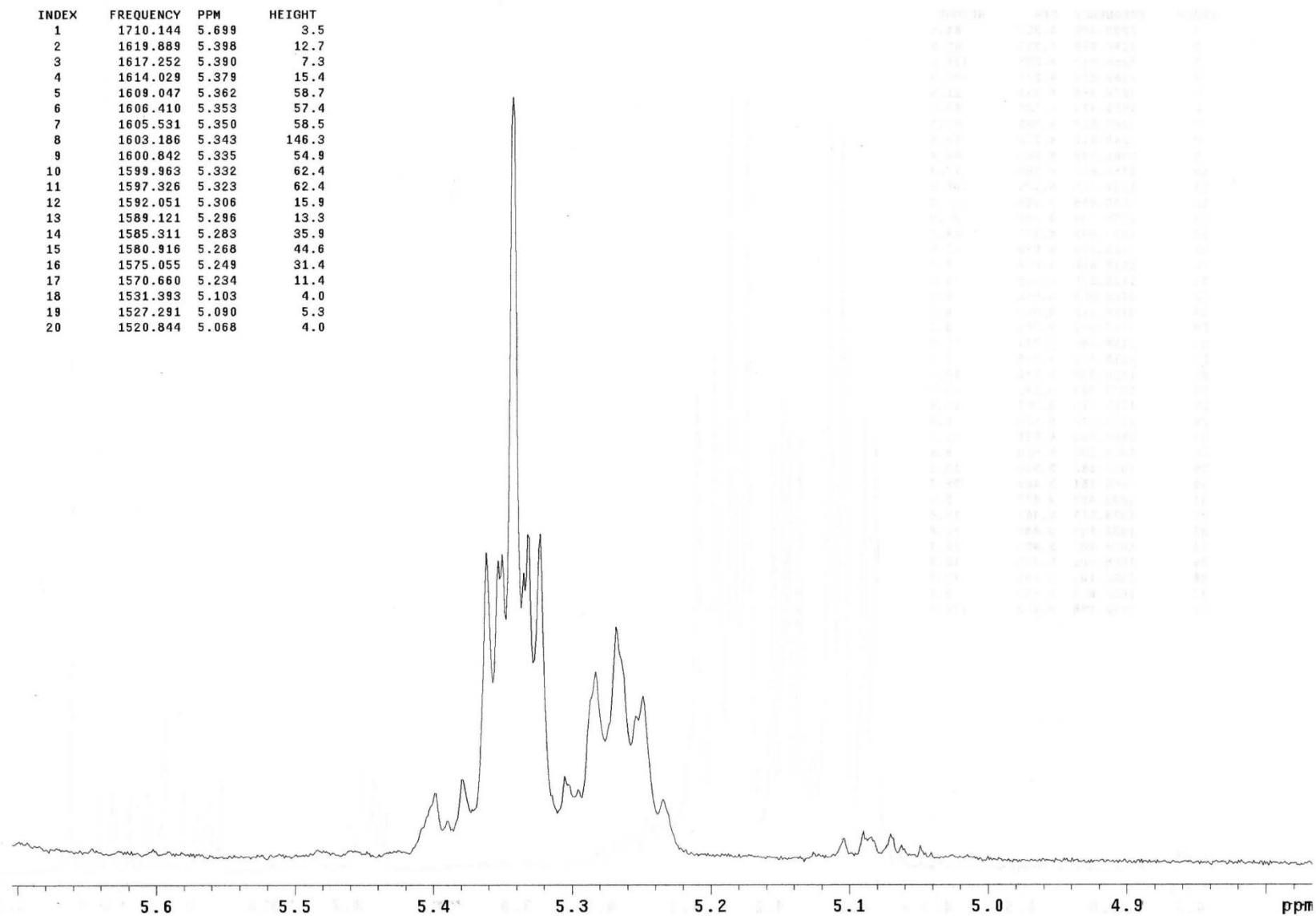
| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|--------|
| 1 | 701.815 | 2.339 | 24.6 |
| 2 | 694.489 | 2.314 | 45.1 |
| 3 | 686.871 | 2.289 | 26.1 |
| 4 | 605.993 | 2.019 | 12.0 |
| 5 | 600.426 | 2.001 | 11.9 |
| 6 | 506.362 | 1.687 | 4.8 |
| 7 | 482.626 | 1.608 | 26.3 |
| 8 | 448.341 | 1.494 | 8.6 |
| 9 | 441.602 | 1.472 | 8.1 |
| 10 | 438.378 | 1.461 | 8.1 |
| 11 | 433.983 | 1.446 | 9.8 |
| 12 | 431.052 | 1.436 | 10.7 |
| 13 | 426.364 | 1.421 | 11.2 |
| 14 | 424.313 | 1.414 | 12.8 |
| 15 | 419.917 | 1.399 | 11.9 |
| 16 | 416.987 | 1.390 | 14.4 |
| 17 | 390.028 | 1.300 | 125.0 |
| 18 | 376.548 | 1.255 | 582.5 |
| 19 | 356.036 | 1.187 | 12.3 |
| 20 | 346.073 | 1.153 | 7.0 |
| 21 | 330.835 | 1.103 | 5.8 |
| 22 | 283.656 | 0.945 | 15.3 |
| 23 | 276.331 | 0.921 | 34.1 |
| 24 | 269.005 | 0.896 | 62.3 |
| 25 | 263.730 | 0.879 | 104.1 |
| 26 | 256.990 | 0.856 | 48.9 |
| 27 | 249.958 | 0.833 | 10.6 |



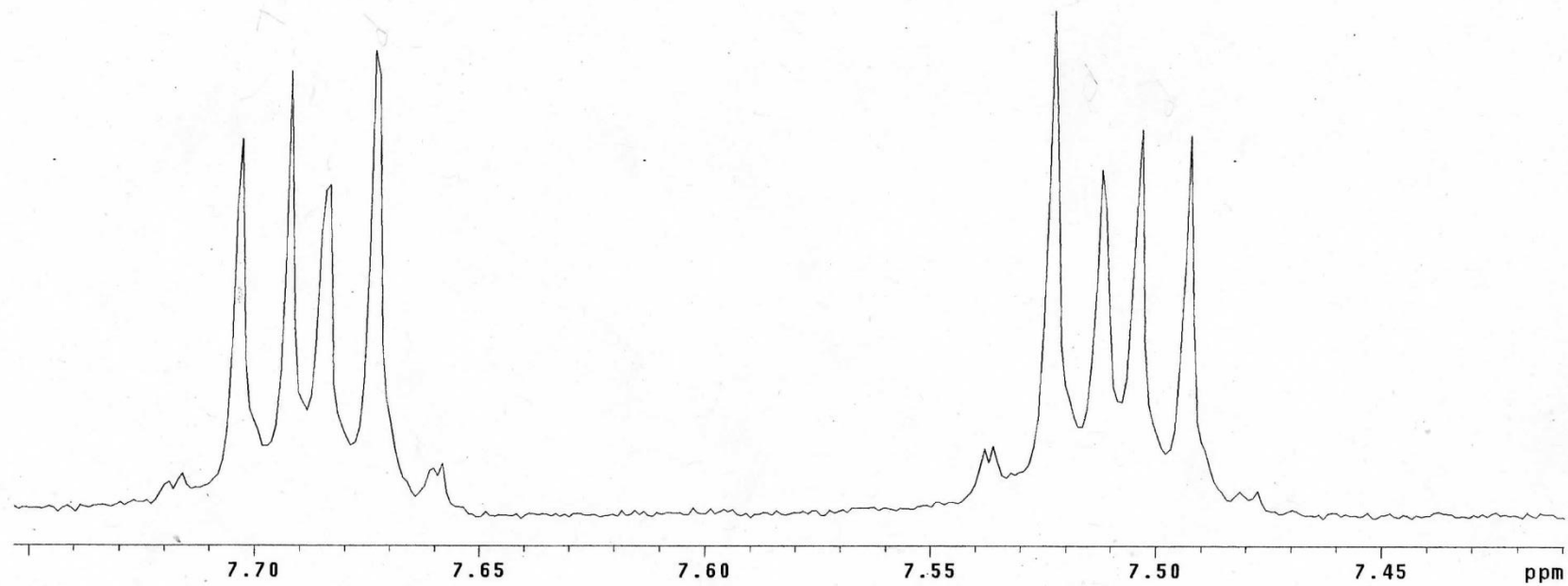
| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|--------|
| 1 | 1298.432 | 4.327 | 81.0 |
| 2 | 1294.036 | 4.312 | 85.2 |
| 3 | 1286.417 | 4.287 | 138.2 |
| 4 | 1282.022 | 4.272 | 142.5 |
| 5 | 1276.454 | 4.254 | 21.5 |
| 6 | 1271.179 | 4.236 | 83.3 |
| 7 | 1267.663 | 4.225 | 83.5 |
| 8 | 1265.612 | 4.218 | 89.9 |
| 9 | 1261.509 | 4.204 | 80.4 |
| 10 | 1256.821 | 4.188 | 17.9 |
| 11 | 1252.718 | 4.175 | 146.2 |
| 12 | 1246.858 | 4.155 | 147.2 |
| 13 | 1240.704 | 4.135 | 97.0 |
| 14 | 1234.843 | 4.115 | 89.0 |
| 15 | 1223.708 | 4.078 | 11.0 |
| 16 | 1219.606 | 4.064 | 7.2 |
| 17 | 1216.675 | 4.055 | 8.3 |
| 18 | 1212.866 | 4.042 | 4.0 |
| 19 | 1210.228 | 4.033 | 4.2 |
| 20 | 1124.077 | 3.746 | 9.0 |
| 21 | 1119.681 | 3.731 | 15.6 |
| 22 | 1118.216 | 3.726 | 9.1 |
| 23 | 1114.993 | 3.716 | 17.7 |
| 24 | 1077.484 | 3.591 | -3.0 |
| 25 | 1065.763 | 3.552 | 15.9 |
| 26 | 1062.247 | 3.540 | 6.3 |
| 27 | 1060.781 | 3.535 | 11.3 |
| 28 | 1056.386 | 3.520 | 8.8 |
| 29 | 1051.697 | 3.505 | 13.1 |
| 30 | 1045.251 | 3.483 | 26.7 |
| 31 | 1043.492 | 3.477 | 5.5 |
| 32 | 1038.511 | 3.461 | 12.8 |
| 33 | 1032.943 | 3.442 | 11.8 |
| 34 | 1027.082 | 3.423 | 12.9 |
| 35 | 1026.203 | 3.420 | 12.9 |
| 36 | 1022.101 | 3.406 | 12.0 |
| 37 | 1015.654 | 3.385 | 3.1 |
| 38 | 1012.138 | 3.373 | 101.4 |

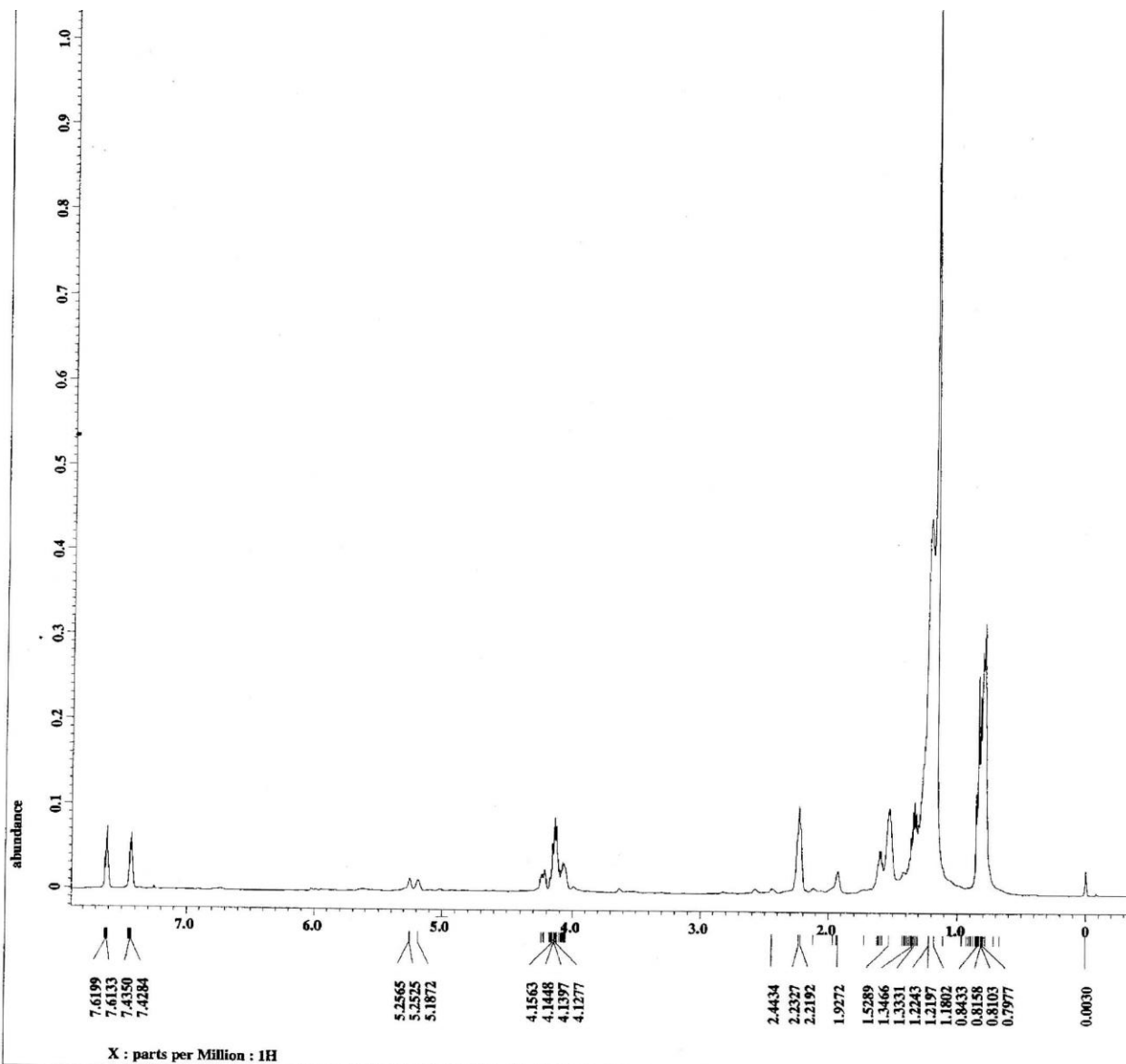


| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|--------|
| 1 | 1710.144 | 5.699 | 3.5 |
| 2 | 1619.889 | 5.398 | 12.7 |
| 3 | 1617.252 | 5.390 | 7.3 |
| 4 | 1614.029 | 5.379 | 15.4 |
| 5 | 1609.047 | 5.362 | 58.7 |
| 6 | 1606.410 | 5.353 | 57.4 |
| 7 | 1605.531 | 5.350 | 58.5 |
| 8 | 1603.186 | 5.343 | 146.3 |
| 9 | 1600.842 | 5.335 | 54.9 |
| 10 | 1599.963 | 5.332 | 62.4 |
| 11 | 1597.326 | 5.323 | 62.4 |
| 12 | 1592.051 | 5.306 | 15.9 |
| 13 | 1589.121 | 5.296 | 13.3 |
| 14 | 1585.311 | 5.283 | 35.9 |
| 15 | 1580.916 | 5.268 | 44.6 |
| 16 | 1575.055 | 5.249 | 31.4 |
| 17 | 1570.660 | 5.234 | 11.4 |
| 18 | 1531.393 | 5.103 | 4.0 |
| 19 | 1527.291 | 5.090 | 5.3 |
| 20 | 1520.844 | 5.068 | 4.0 |



| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|--------|
| 1 | 2311.567 | 7.703 | 61.5 |
| 2 | 2308.339 | 7.693 | 72.4 |
| 3 | 2305.698 | 7.684 | 54.0 |
| 4 | 2302.763 | 7.674 | 75.7 |
| 5 | 2257.571 | 7.523 | 82.3 |
| 6 | 2254.343 | 7.513 | 56.5 |
| 7 | 2251.702 | 7.504 | 63.1 |
| 8 | 2248.474 | 7.493 | 62.2 |





```

Filename      = Efren_1698_
Author        = CInvstev
Experiment    = single_pulse.ex2
Sample_id     = 1698
Solvent       = CHLOROFORM-D
Creation_time = 13:13:52
Revision_time = 12:39:34
Current_time  = 12:40:19
  
```

```

Comment       = single_pulse
Data_format   = 1D COMPLEX
Dim_size      = 52428
Dim_title     = 1H
Dim_units     = [ppm]
Dimensions    = X
Site          = ECA 500
Spectrometer  = DELTA2 NMR
  
```

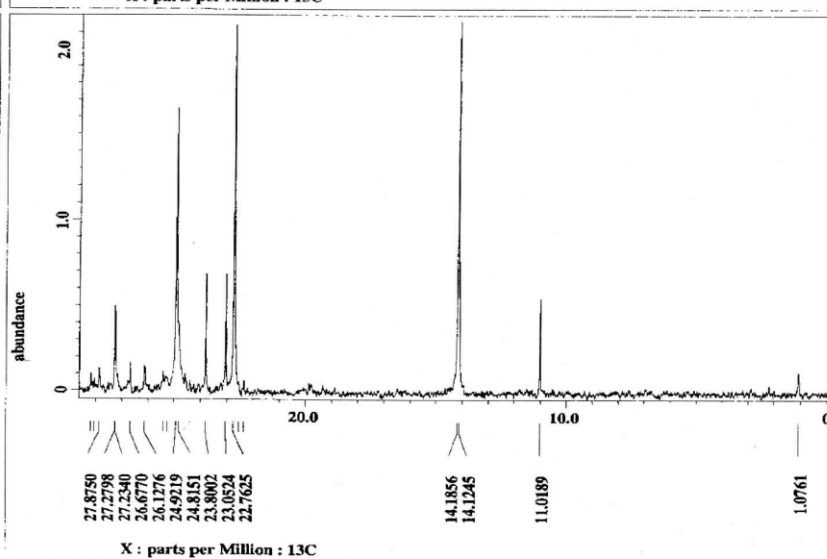
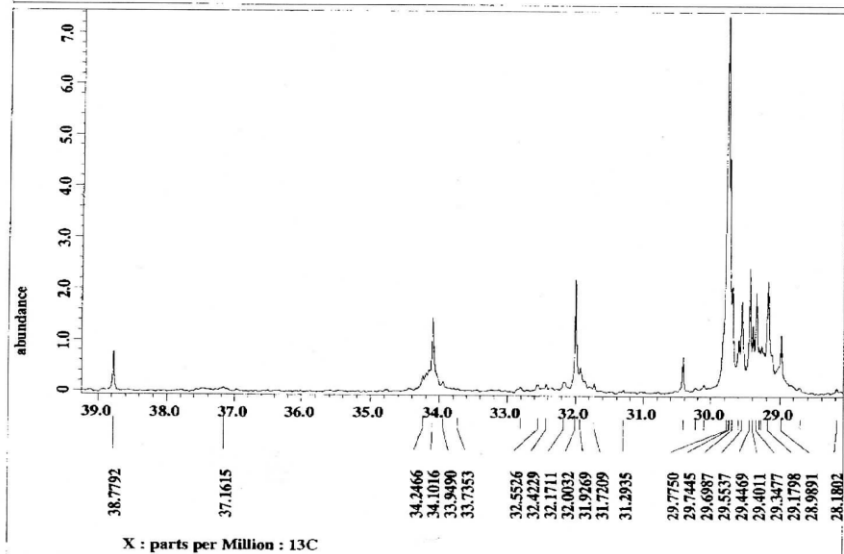
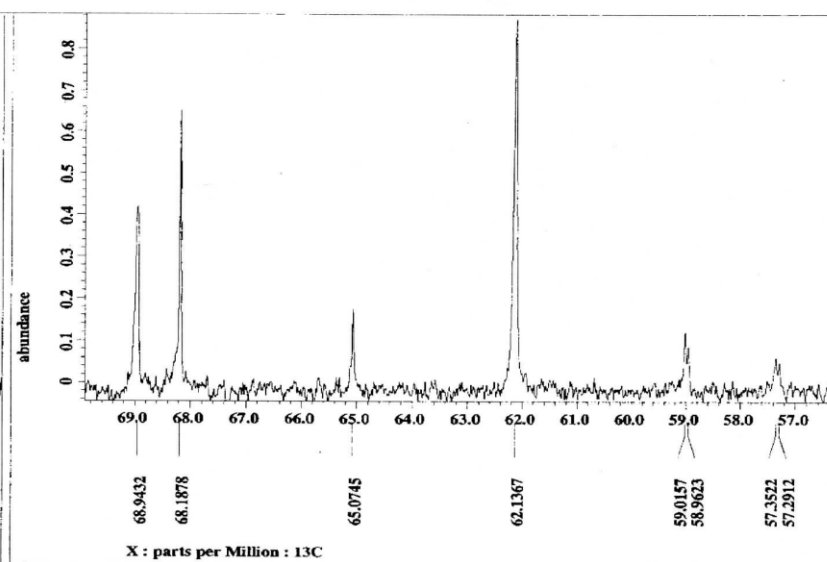
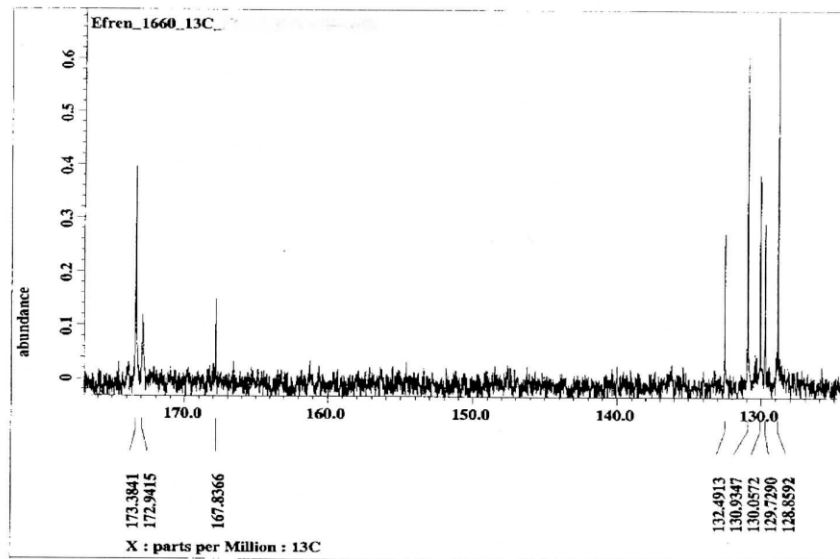
```

Field_strength = 11.7473579 [T] (500[MH
X_acq_duration = 6.98351616 [s]
X_domain       = 1H
X_freq         = 500.15991521 [MHz]
X_offset       = 5.0 [ppm]
X_points       = 65536
X_prescans     = 1
X_resolution   = 0.14319434 [Hz]
X_sweep        = 9.38438438 [kHz]
Irr_domain     = 1H
Irr_freq       = 500.15991521 [MHz]
Irr_offset     = 5.0 [ppm]
Tri_domain     = 1H
Tri_freq       = 500.15991521 [MHz]
Tri_offset     = 5.0 [ppm]
Clipped        = FALSE
Mod_return     = 1
Scans          = 16
Total_scans    = 16
  
```

```

X_90_width    = 14.5 [us]
X_acq_time     = 6.98351616 [s]
X_angle        = 45 [deg]
X_atn          = 6 [dB]
X_pulse        = 7.25 [us]
Irr_mode       = Off
Tri_mode       = Off
Dante_preset   = FALSE
Initial_wait   = 1 [s]
Recvr_gain     = 16
Relaxation_delay = 1 [s]
Repetition_time = 7.98351616 [s]
Temp_get       = 19.5 [dc]
  
```

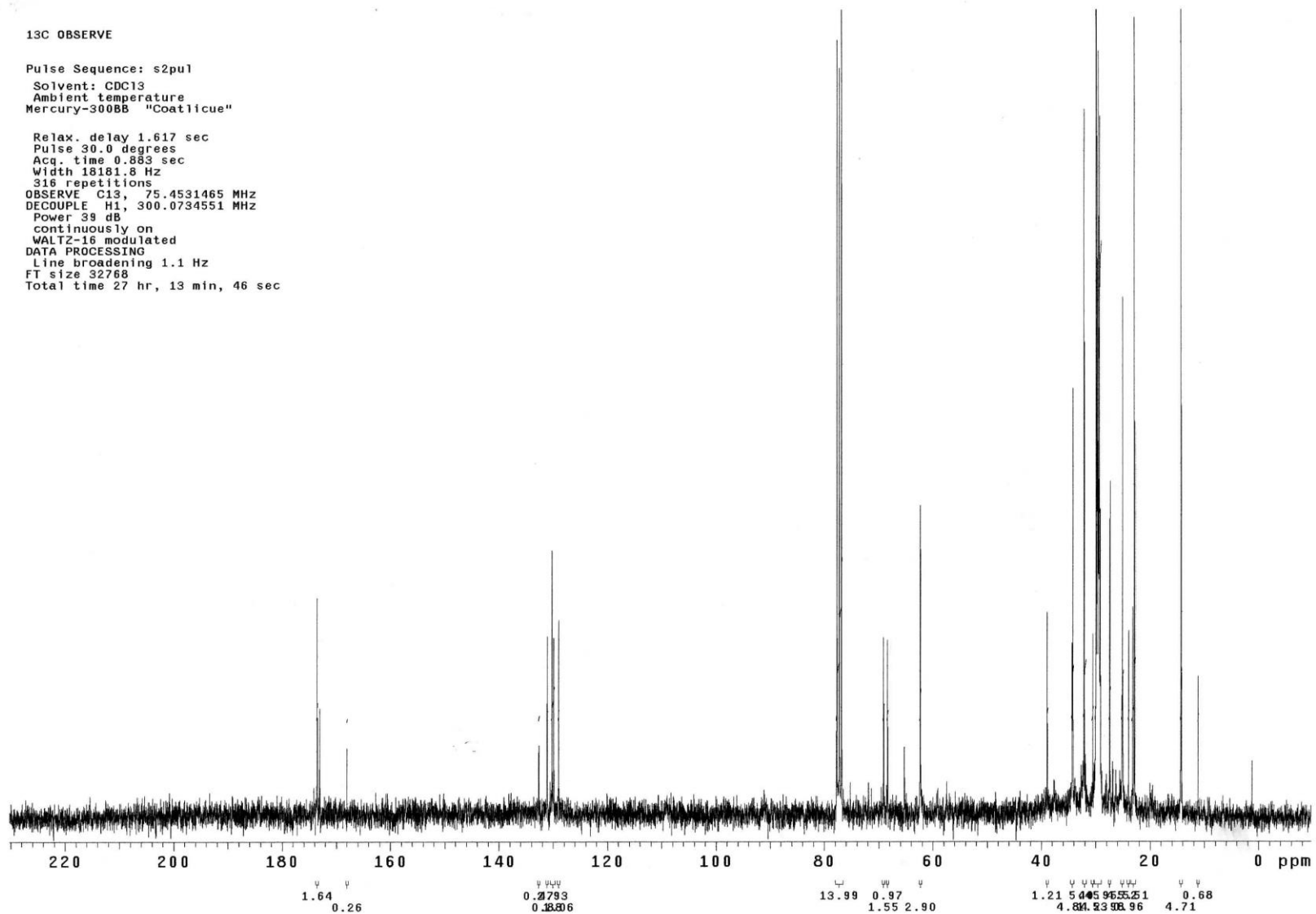
RMN 500 MHz

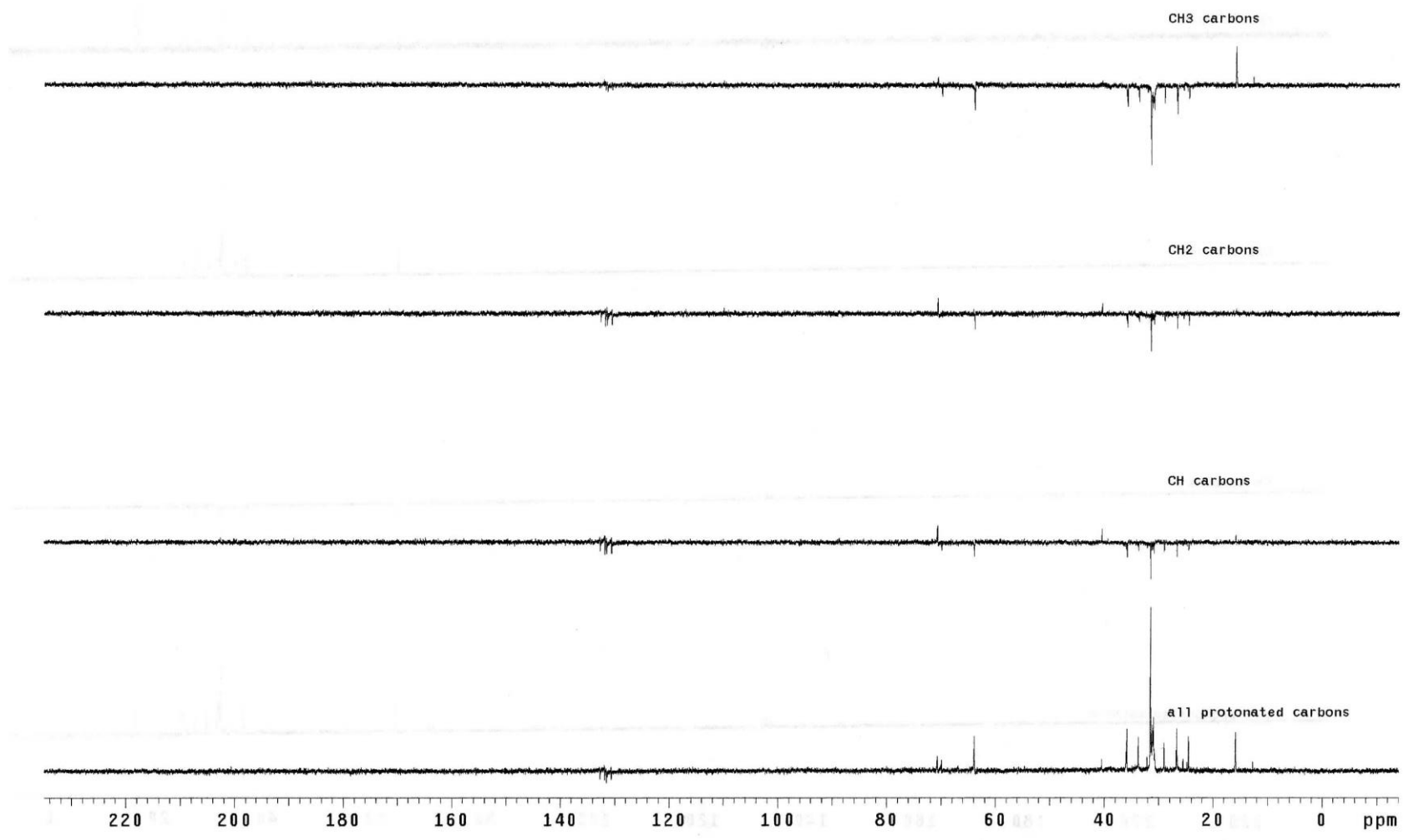


13C OBSERVE

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatlicue"

Relax. delay 1.617 sec
Pulse 30.0 degrees
Acq. time 0.883 sec
Width 18181.8 Hz
316 repetitions
OBSERVE C13, 75.4531465 MHz
DECOUPLE H1, 300.0734551 MHz
Power 39 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.1 Hz
FT size 32768
Total time 27 hr, 13 min, 46 sec

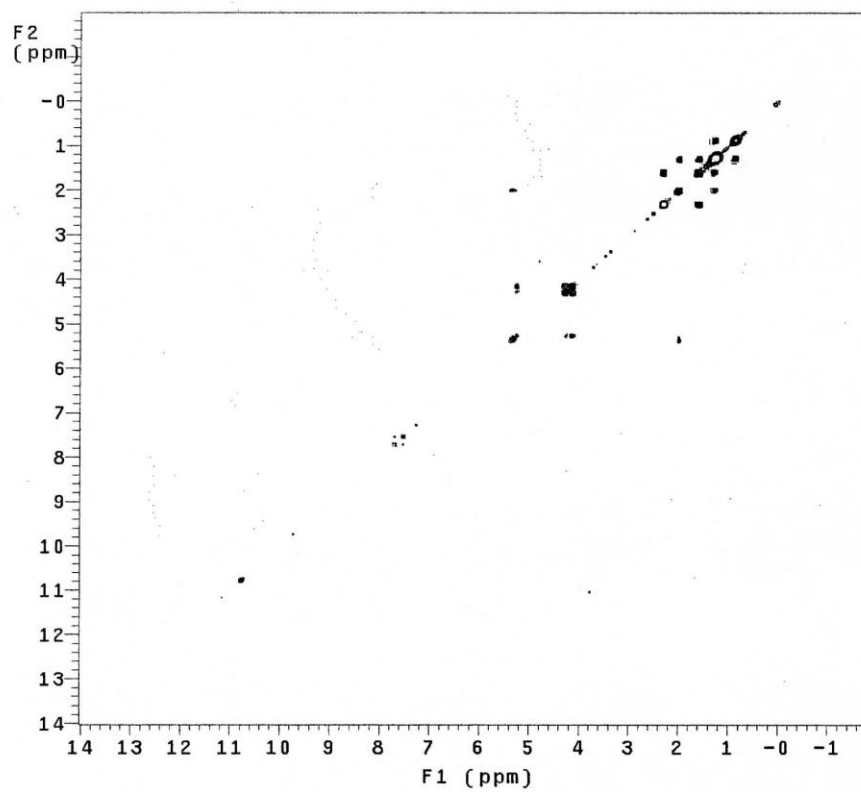
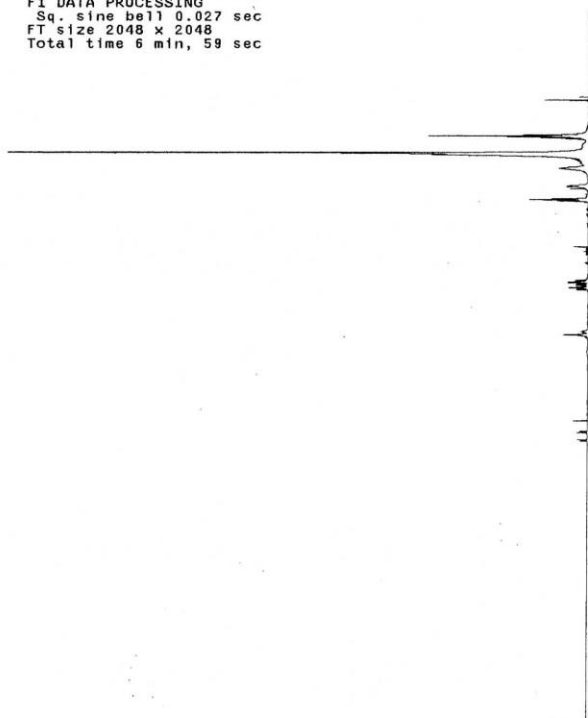




Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmr3sys/data
Sample directory: -08:17:15
File: COSY

Pulse Sequence: COSY
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-30QBB "Coatllicue"

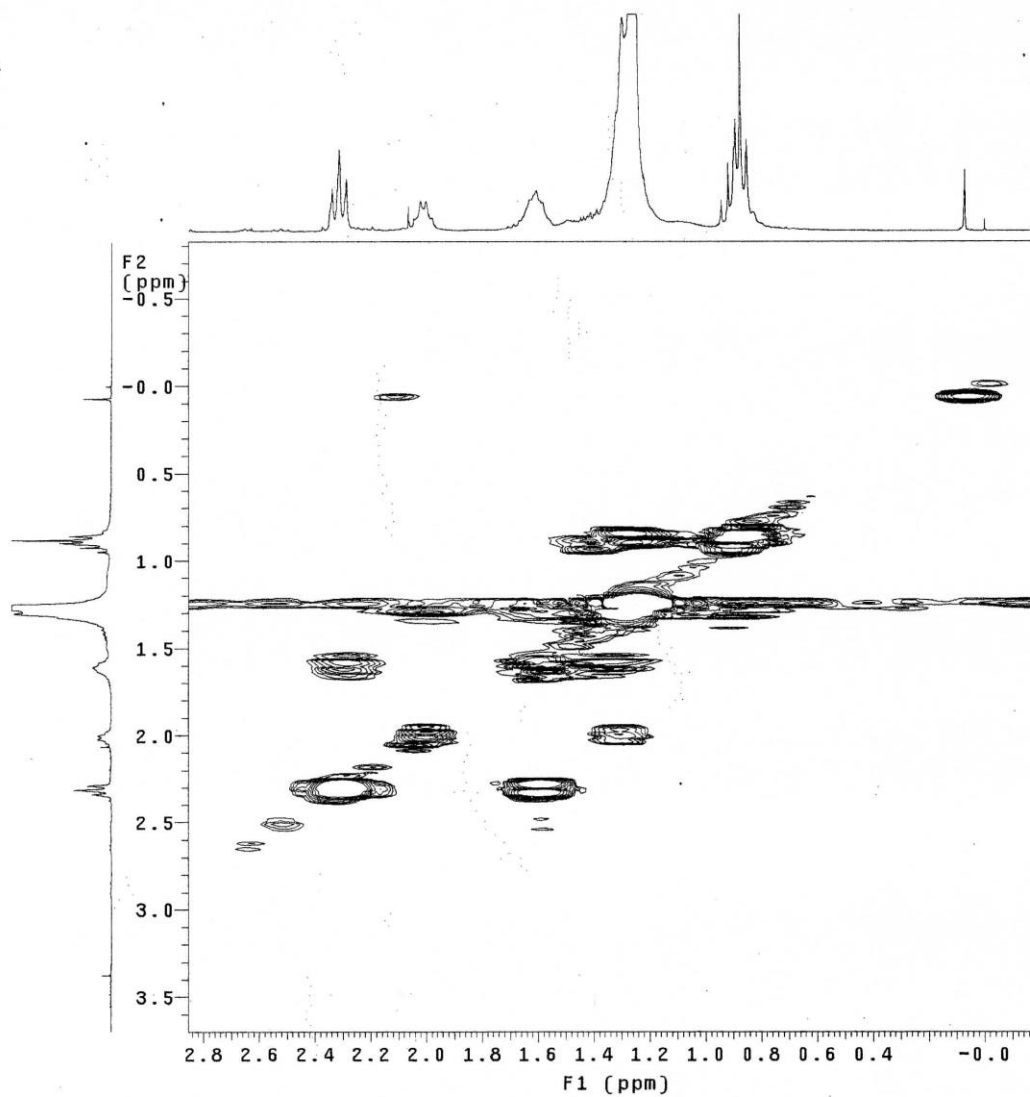
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4800.8 Hz
2D Width 4800.8 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0719943 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.027 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 6 min, 59 sec



Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Sample directory: vnmr3_ 0-08:17:15
File: COSY

Pulse Sequence: COSY
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatlicue"

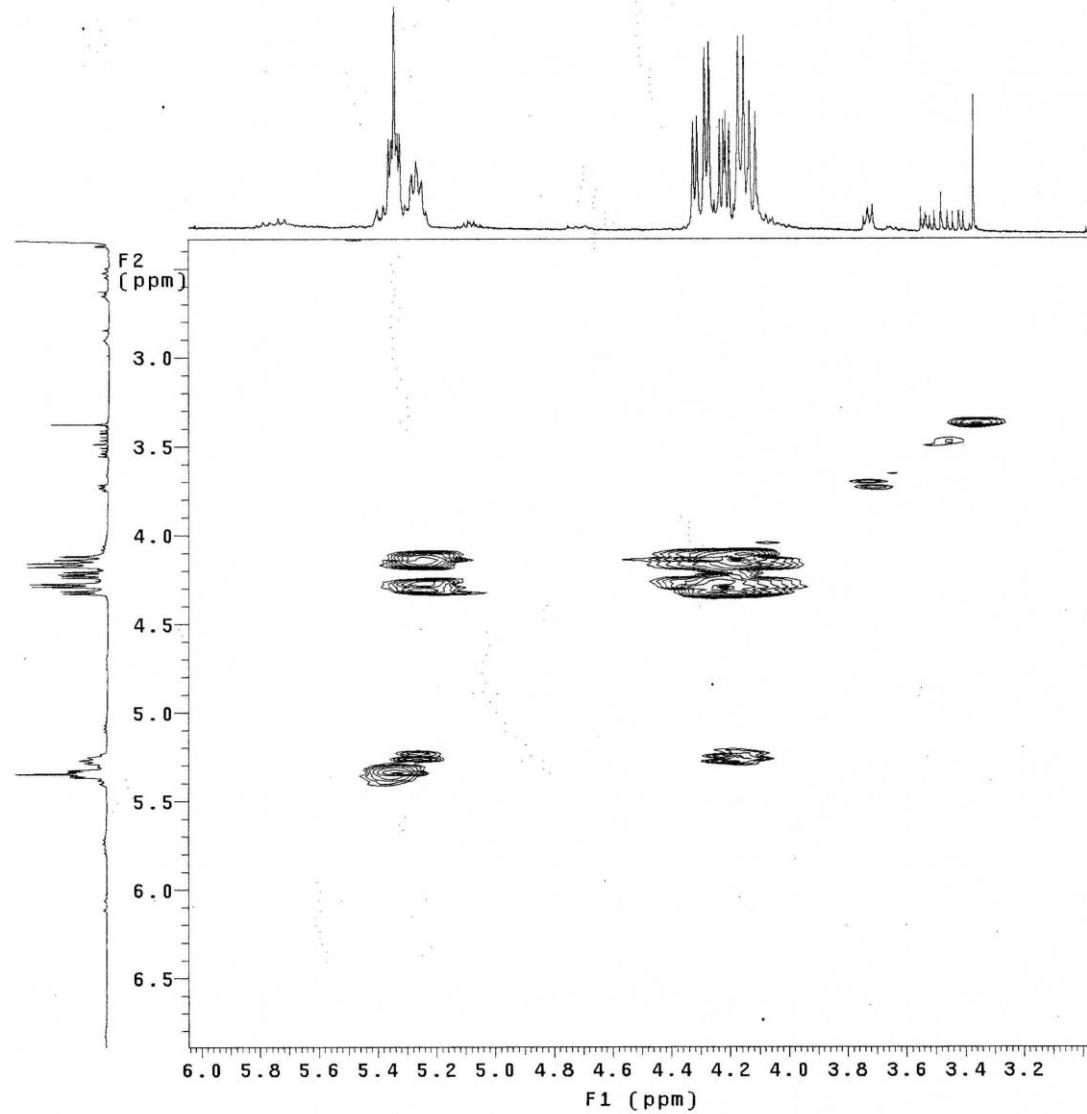
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4800.8 Hz
2D Width 4800.8 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0719943 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.027 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 6 min, 59 sec

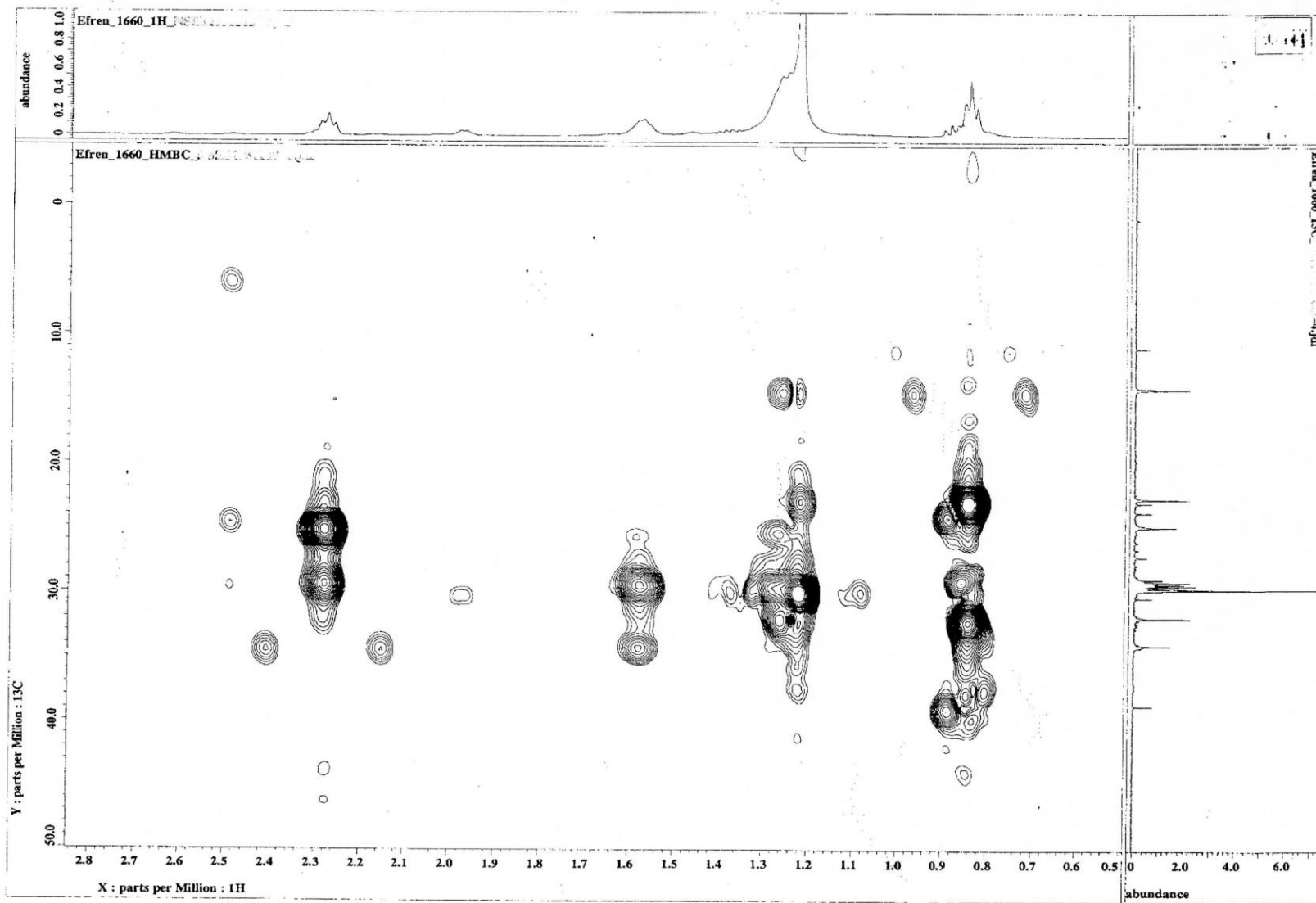


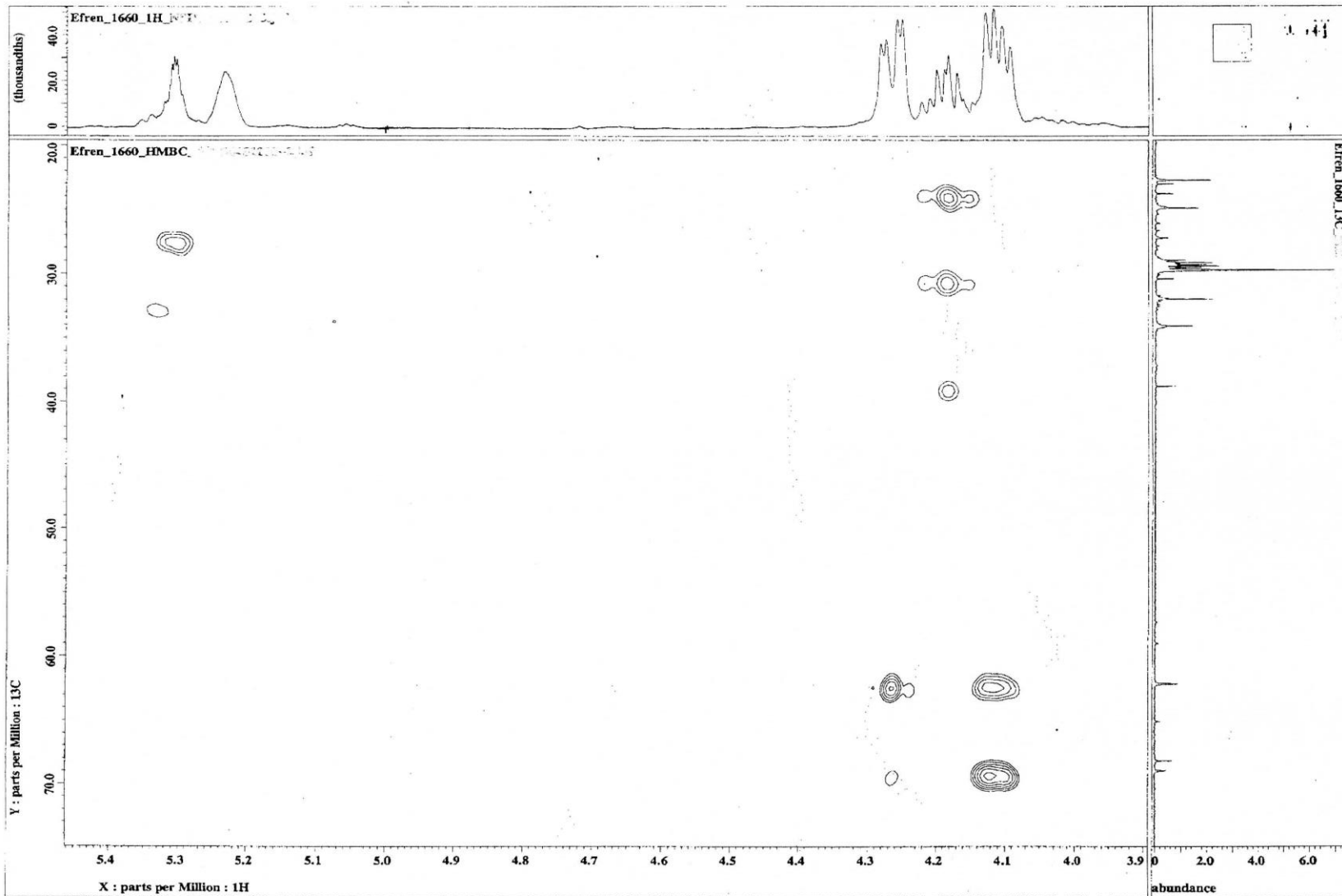
Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmr3sys/data
Sample directory: \ 08:17:15
File: COSY

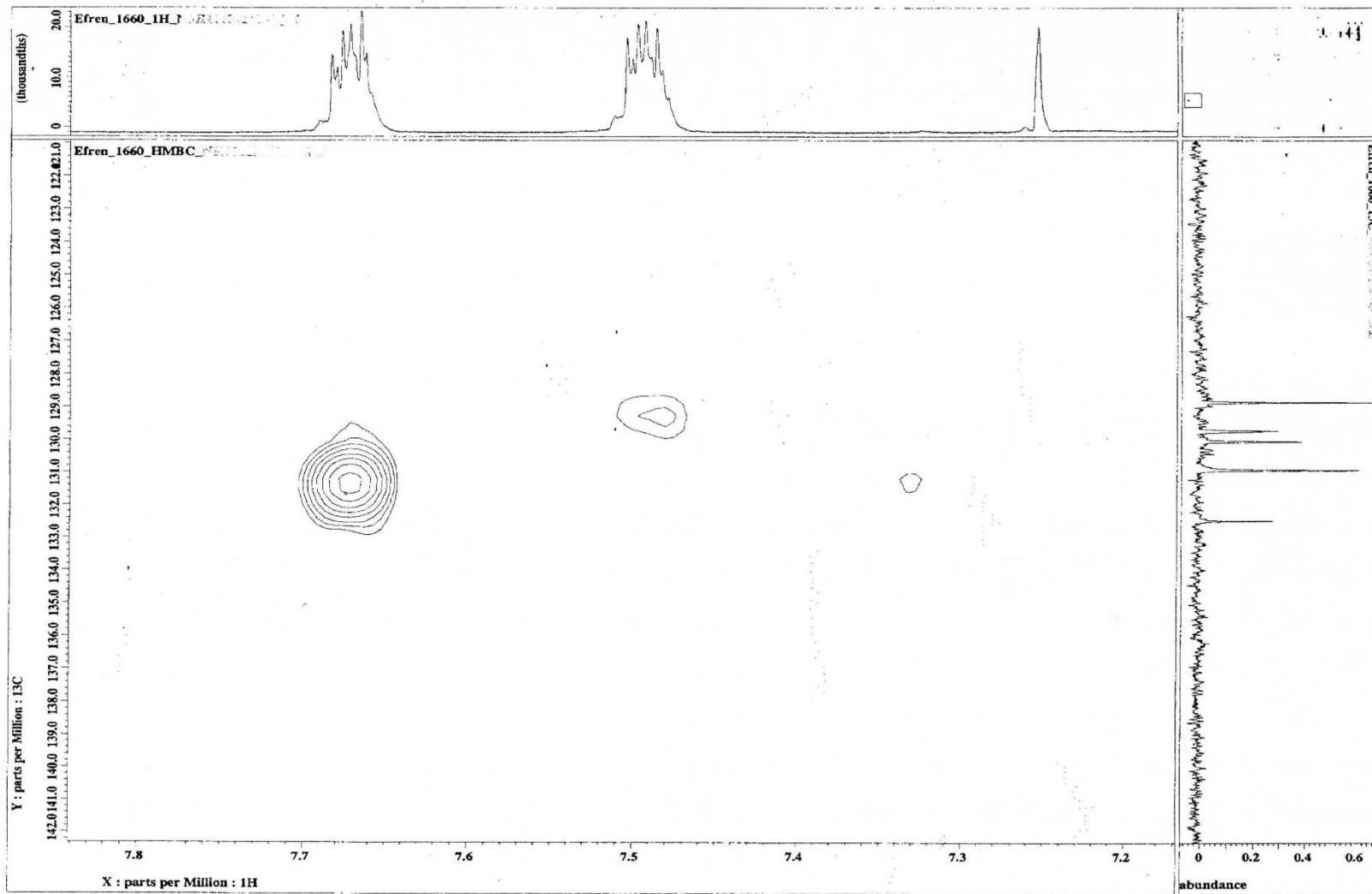
Pulse Sequence: COSY
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatllicue"

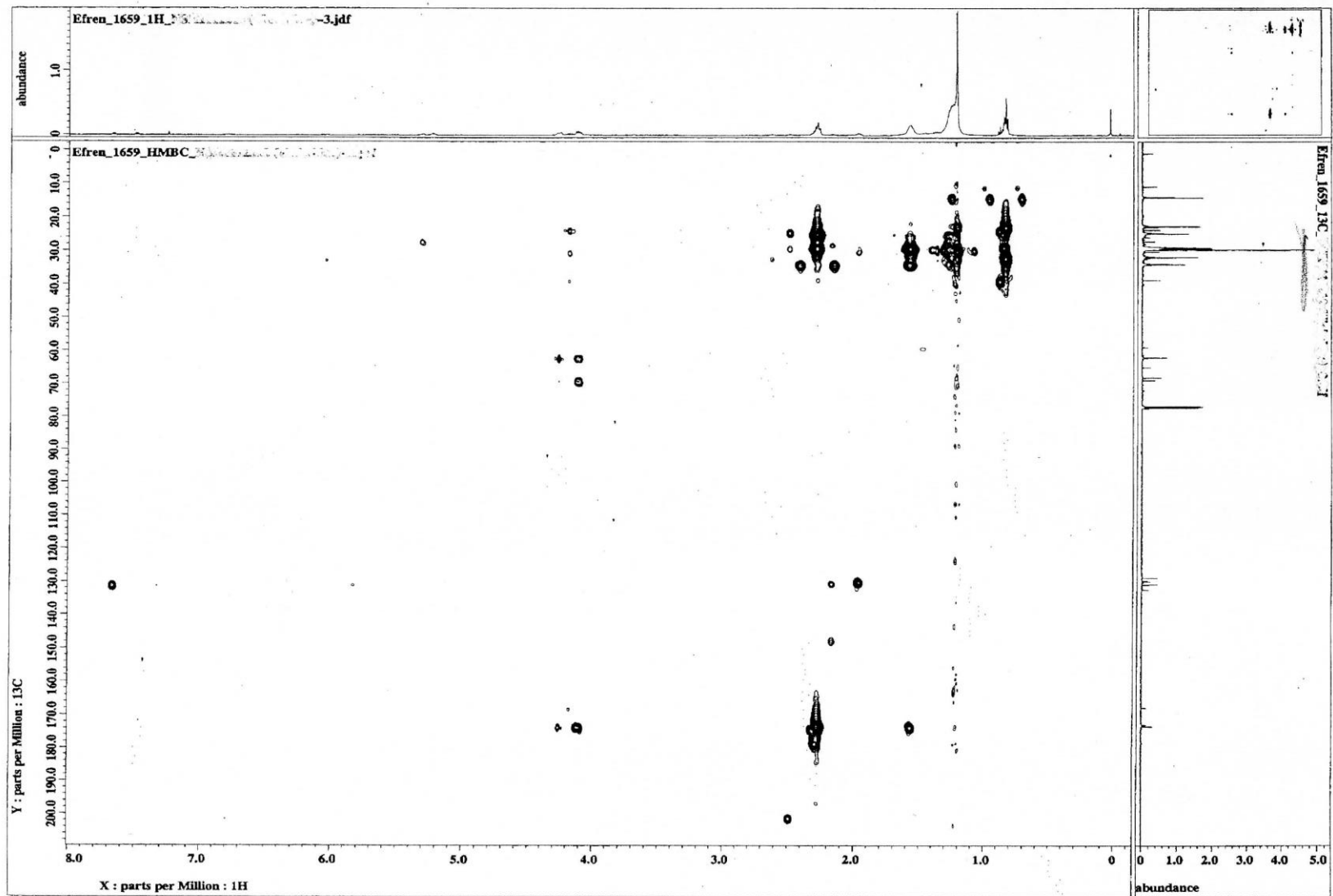
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4800.8 Hz
2D Width 4800.8 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0719943 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.027 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 6 min, 59 sec



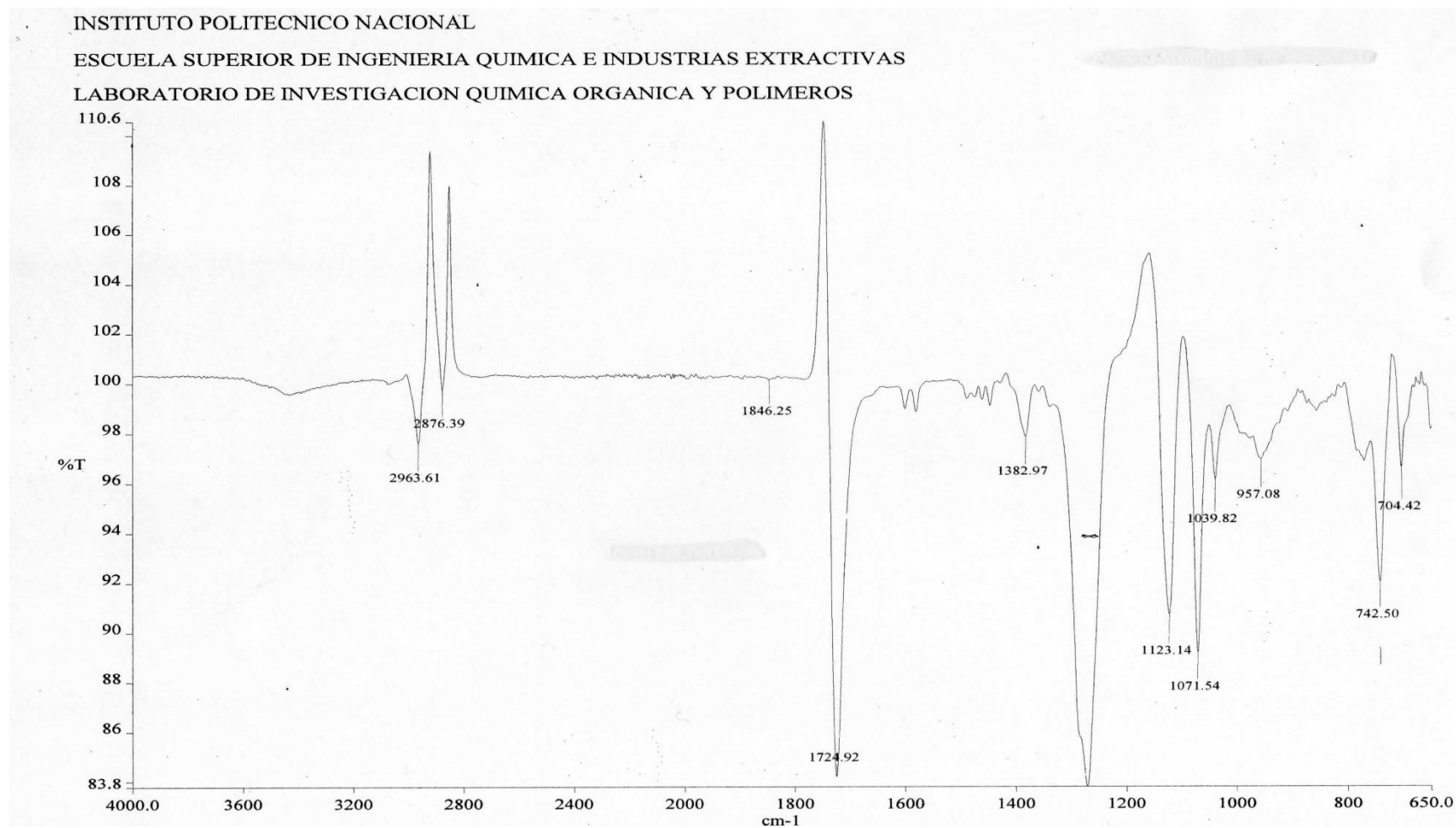








ANEXO D. Espectros de birsonina B

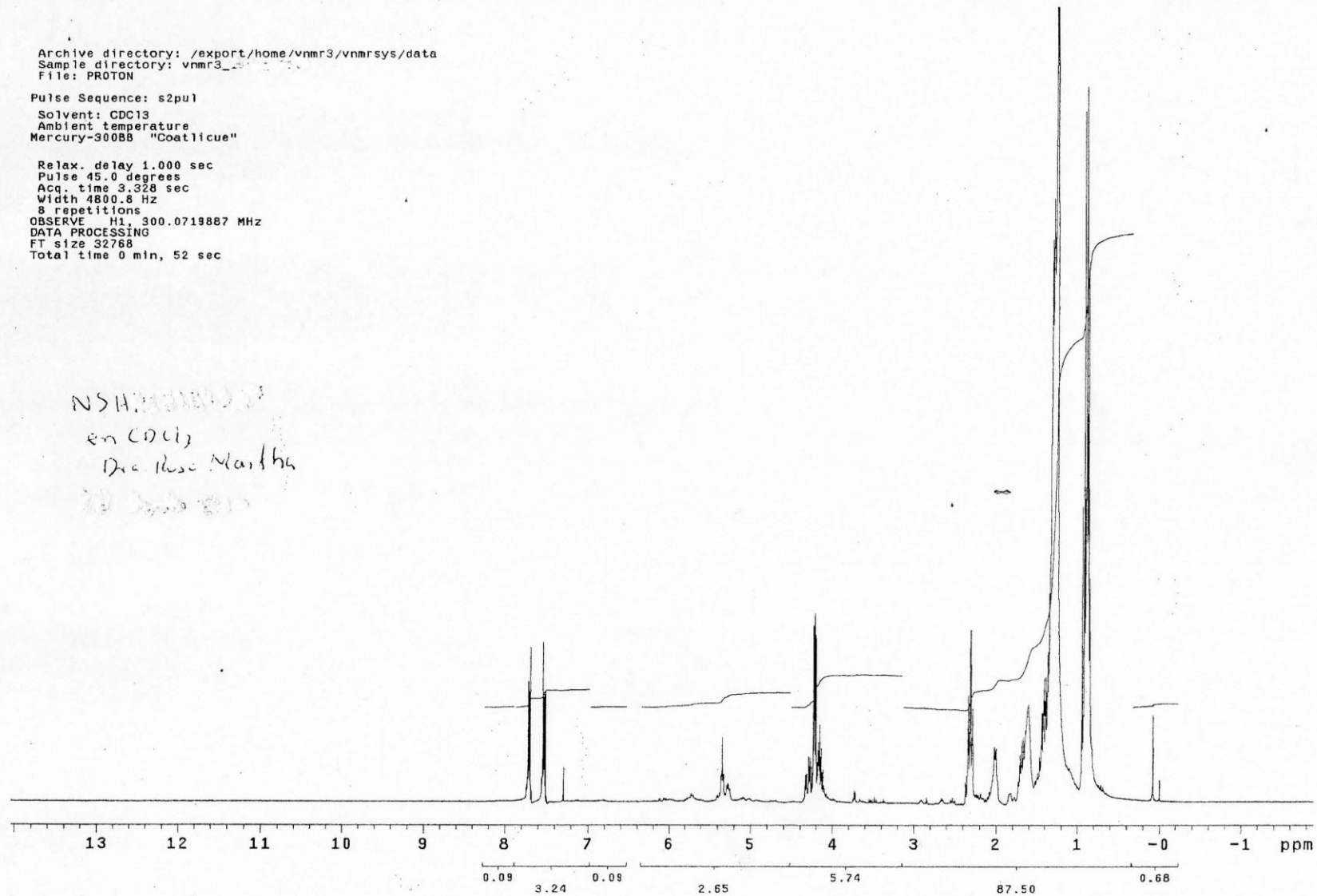


Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Sample directory: vnmr3_...
File: PROTON

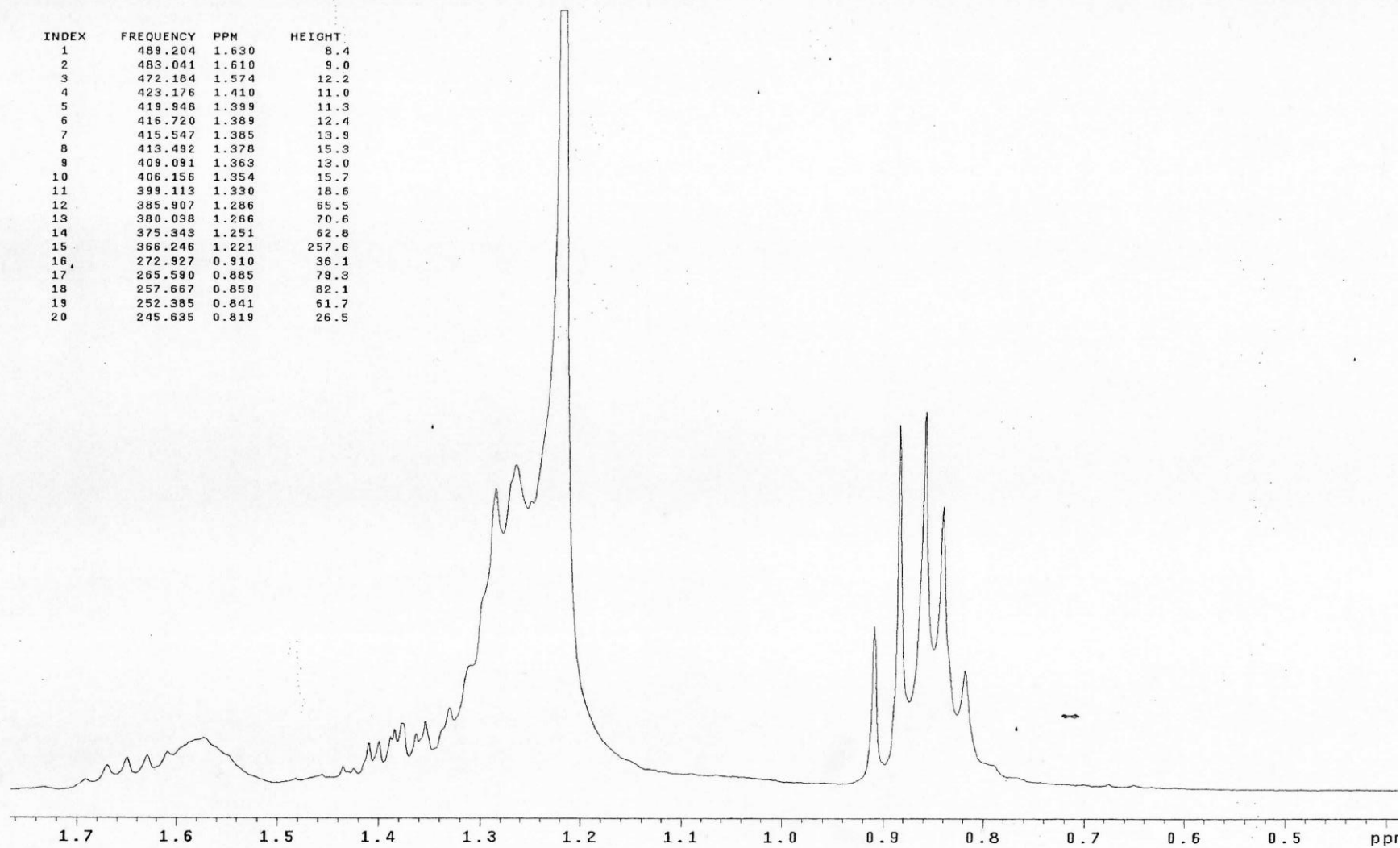
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatllicue"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.328 sec
Width 4800.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 300.0719887 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min, 52 sec

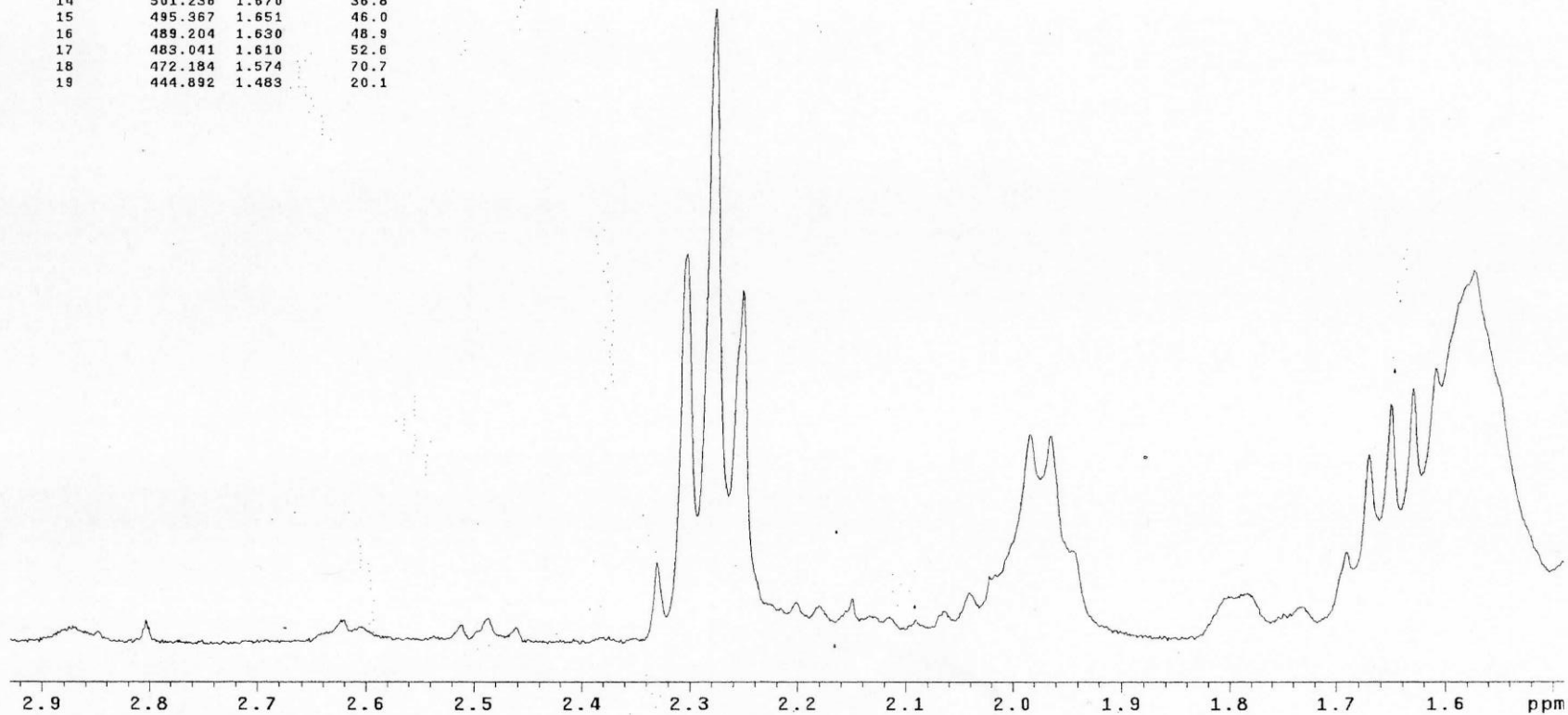
NSH: [unclear]
em CDCl₃
Die Rose Martha
[unclear]



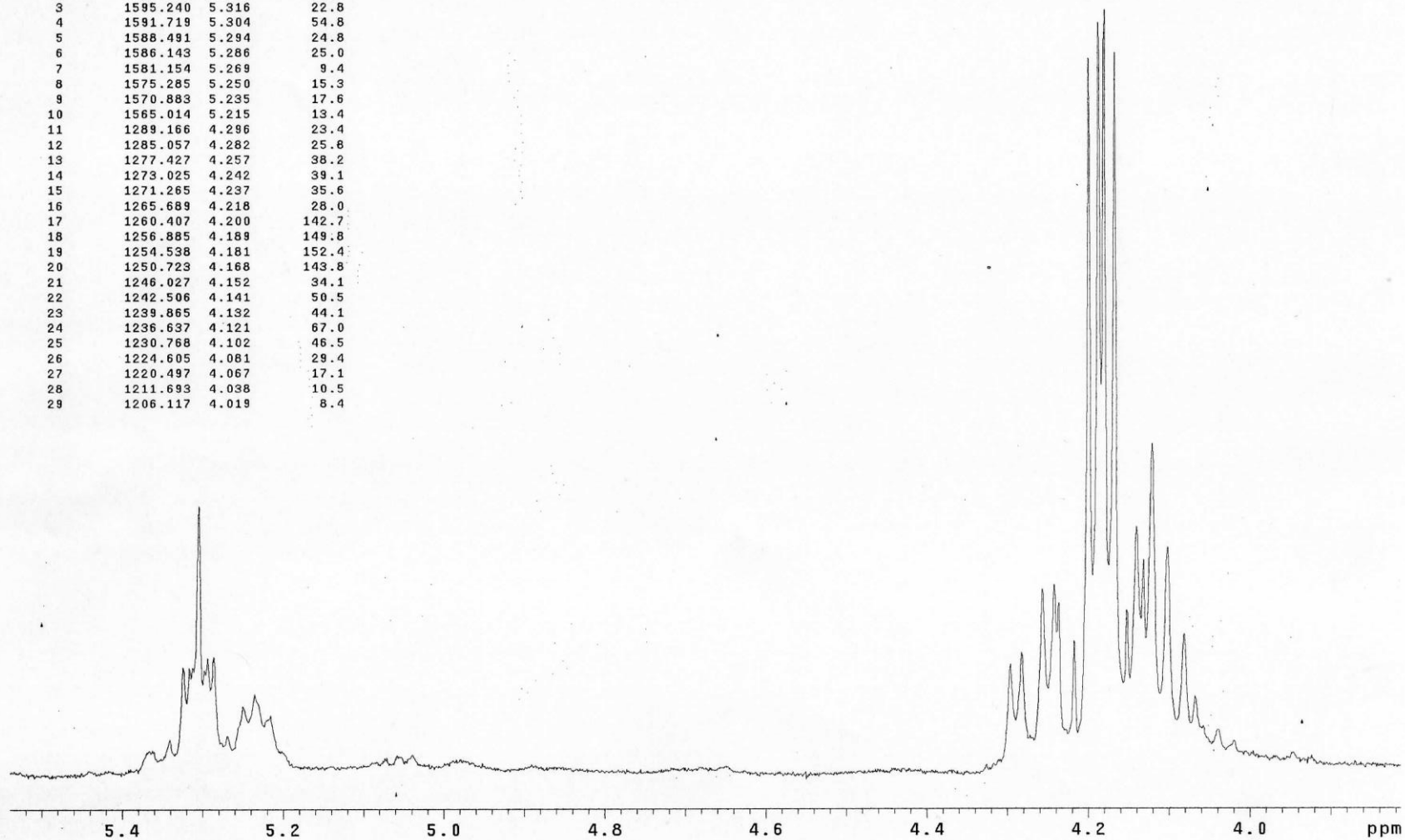
| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|--------|
| 1 | 489.204 | 1.630 | 8.4 |
| 2 | 483.041 | 1.610 | 9.0 |
| 3 | 472.184 | 1.574 | 12.2 |
| 4 | 423.176 | 1.410 | 11.0 |
| 5 | 419.948 | 1.399 | 11.3 |
| 6 | 416.720 | 1.389 | 12.4 |
| 7 | 415.547 | 1.385 | 13.9 |
| 8 | 413.482 | 1.378 | 15.3 |
| 9 | 409.091 | 1.363 | 13.0 |
| 10 | 406.156 | 1.354 | 15.7 |
| 11 | 399.113 | 1.330 | 18.6 |
| 12 | 385.907 | 1.286 | 65.5 |
| 13 | 380.038 | 1.266 | 70.6 |
| 14 | 375.343 | 1.251 | 62.8 |
| 15 | 366.246 | 1.221 | 257.6 |
| 16 | 272.927 | 0.910 | 36.1 |
| 17 | 265.590 | 0.885 | 79.3 |
| 18 | 257.667 | 0.859 | 82.1 |
| 19 | 252.385 | 0.841 | 61.7 |
| 20 | 245.635 | 0.819 | 26.5 |



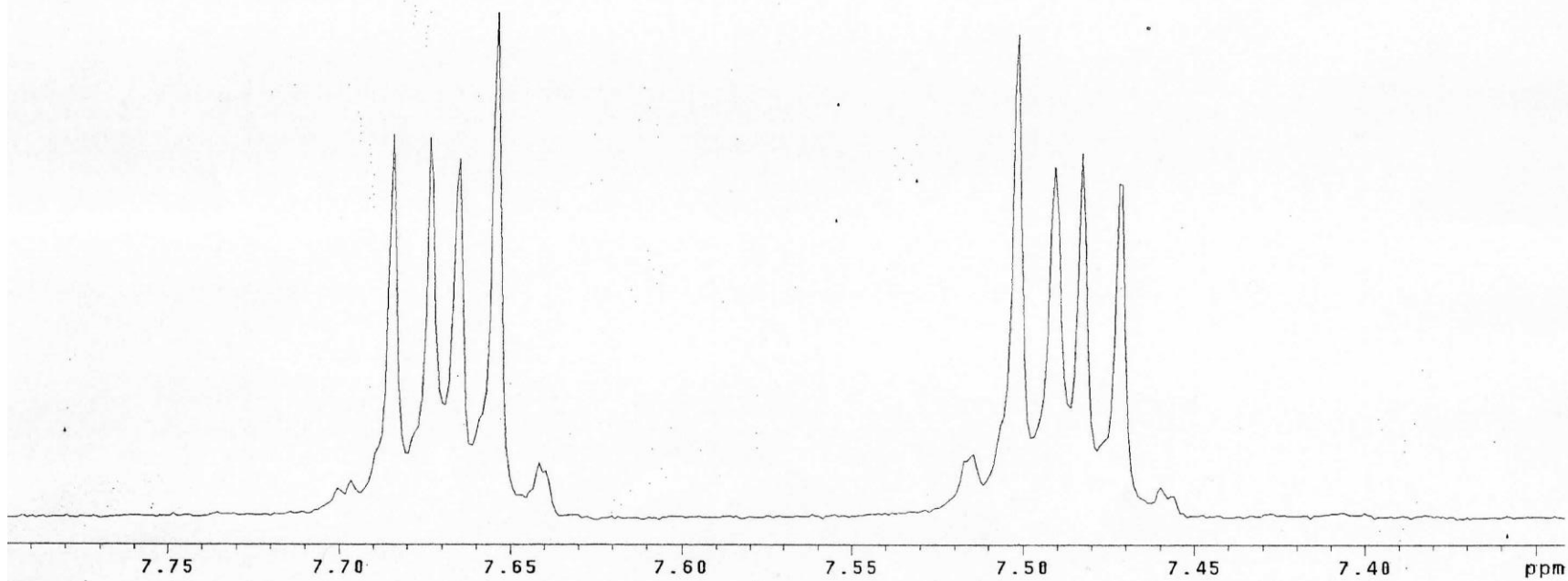
| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|--------|
| 1 | 699.319 | 2.331 | 16.9 |
| 2 | 691.102 | 2.303 | 73.7 |
| 3 | 683.472 | 2.278 | 118.6 |
| 4 | 675.842 | 2.252 | 67.0 |
| 5 | 660.582 | 2.201 | 9.6 |
| 6 | 654.126 | 2.180 | 9.0 |
| 7 | 645.029 | 2.150 | 10.3 |
| 8 | 612.456 | 2.041 | 11.4 |
| 9 | 595.435 | 1.984 | 40.4 |
| 10 | 589.566 | 1.965 | 40.2 |
| 11 | 534.983 | 1.783 | 11.4 |
| 12 | 520.310 | 1.734 | 8.8 |
| 13 | 507.398 | 1.691 | 18.9 |
| 14 | 501.236 | 1.670 | 36.8 |
| 15 | 495.367 | 1.651 | 46.0 |
| 16 | 489.204 | 1.630 | 48.9 |
| 17 | 483.041 | 1.610 | 52.6 |
| 18 | 472.184 | 1.574 | 70.7 |
| 19 | 444.892 | 1.483 | 20.1 |



| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|--------|
| 1 | 1602.577 | 5.341 | 8.7 |
| 2 | 1597.588 | 5.324 | 22.9 |
| 3 | 1595.240 | 5.316 | 22.8 |
| 4 | 1591.719 | 5.304 | 54.8 |
| 5 | 1588.491 | 5.294 | 24.8 |
| 6 | 1586.143 | 5.286 | 25.0 |
| 7 | 1581.154 | 5.269 | 9.4 |
| 8 | 1575.285 | 5.250 | 15.3 |
| 9 | 1570.883 | 5.235 | 17.6 |
| 10 | 1565.014 | 5.215 | 13.4 |
| 11 | 1289.166 | 4.296 | 23.4 |
| 12 | 1285.057 | 4.282 | 25.8 |
| 13 | 1277.427 | 4.257 | 38.2 |
| 14 | 1273.025 | 4.242 | 39.1 |
| 15 | 1271.265 | 4.237 | 35.6 |
| 16 | 1265.689 | 4.218 | 28.0 |
| 17 | 1260.407 | 4.200 | 142.7 |
| 18 | 1256.885 | 4.189 | 149.8 |
| 19 | 1254.538 | 4.181 | 152.4 |
| 20 | 1250.723 | 4.168 | 143.8 |
| 21 | 1246.027 | 4.152 | 34.1 |
| 22 | 1242.506 | 4.141 | 50.5 |
| 23 | 1239.865 | 4.132 | 44.1 |
| 24 | 1236.637 | 4.121 | 67.0 |
| 25 | 1230.768 | 4.102 | 46.5 |
| 26 | 1224.605 | 4.081 | 29.4 |
| 27 | 1220.497 | 4.067 | 17.1 |
| 28 | 1211.693 | 4.038 | 10.5 |
| 29 | 1206.117 | 4.019 | 8.4 |



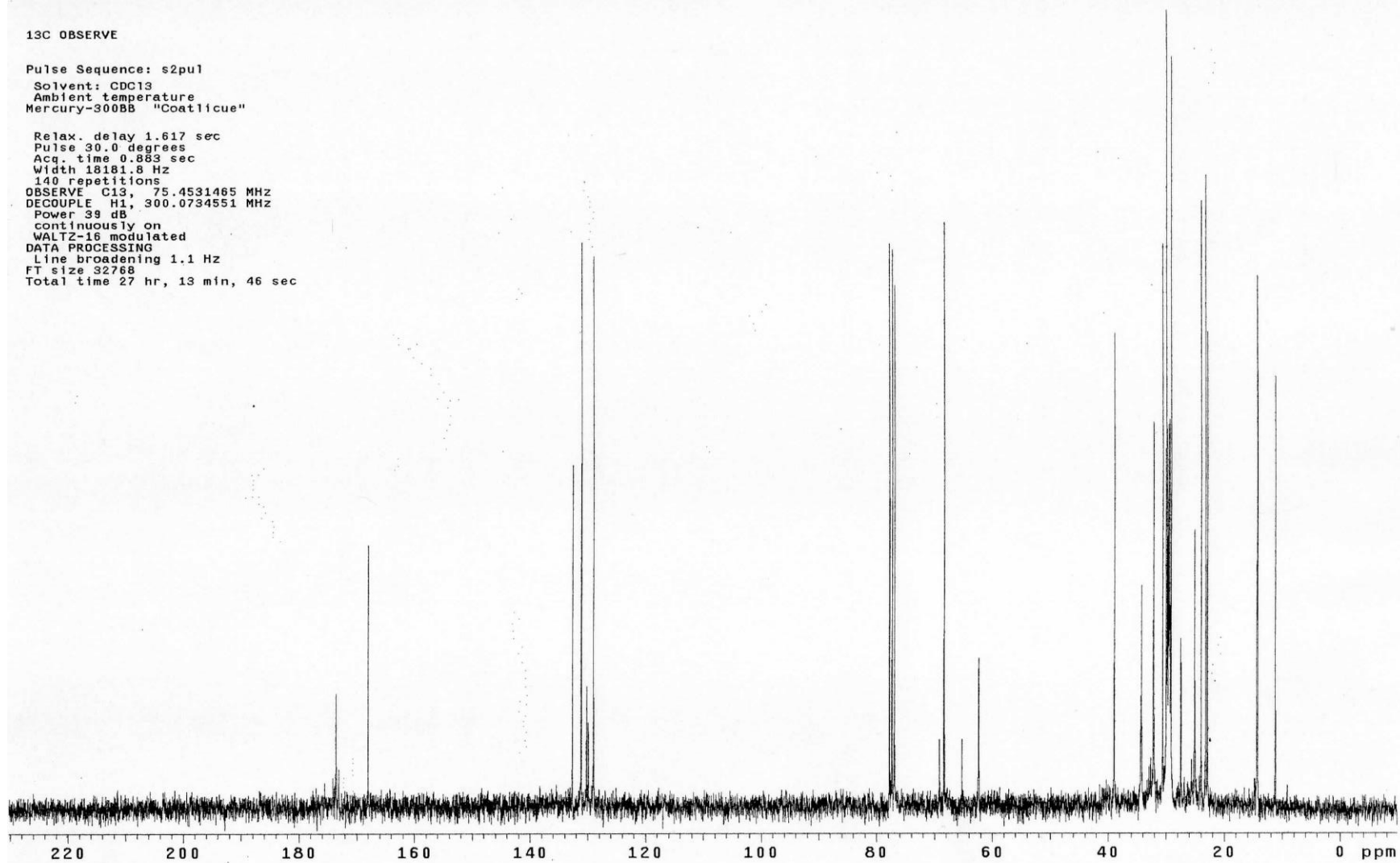
| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|--------|
| 1 | 2305.991 | 7.685 | 69.2 |
| 2 | 2302.763 | 7.674 | 68.5 |
| 3 | 2300.122 | 7.665 | 64.6 |
| 4 | 2296.894 | 7.654 | 90.9 |
| 5 | 2293.079 | 7.642 | 9.9 |
| 6 | 2254.930 | 7.515 | 11.2 |
| 7 | 2251.115 | 7.502 | 87.1 |
| 8 | 2247.887 | 7.491 | 63.3 |
| 9 | 2245.539 | 7.483 | 65.7 |
| 10 | 2242.311 | 7.473 | 60.2 |

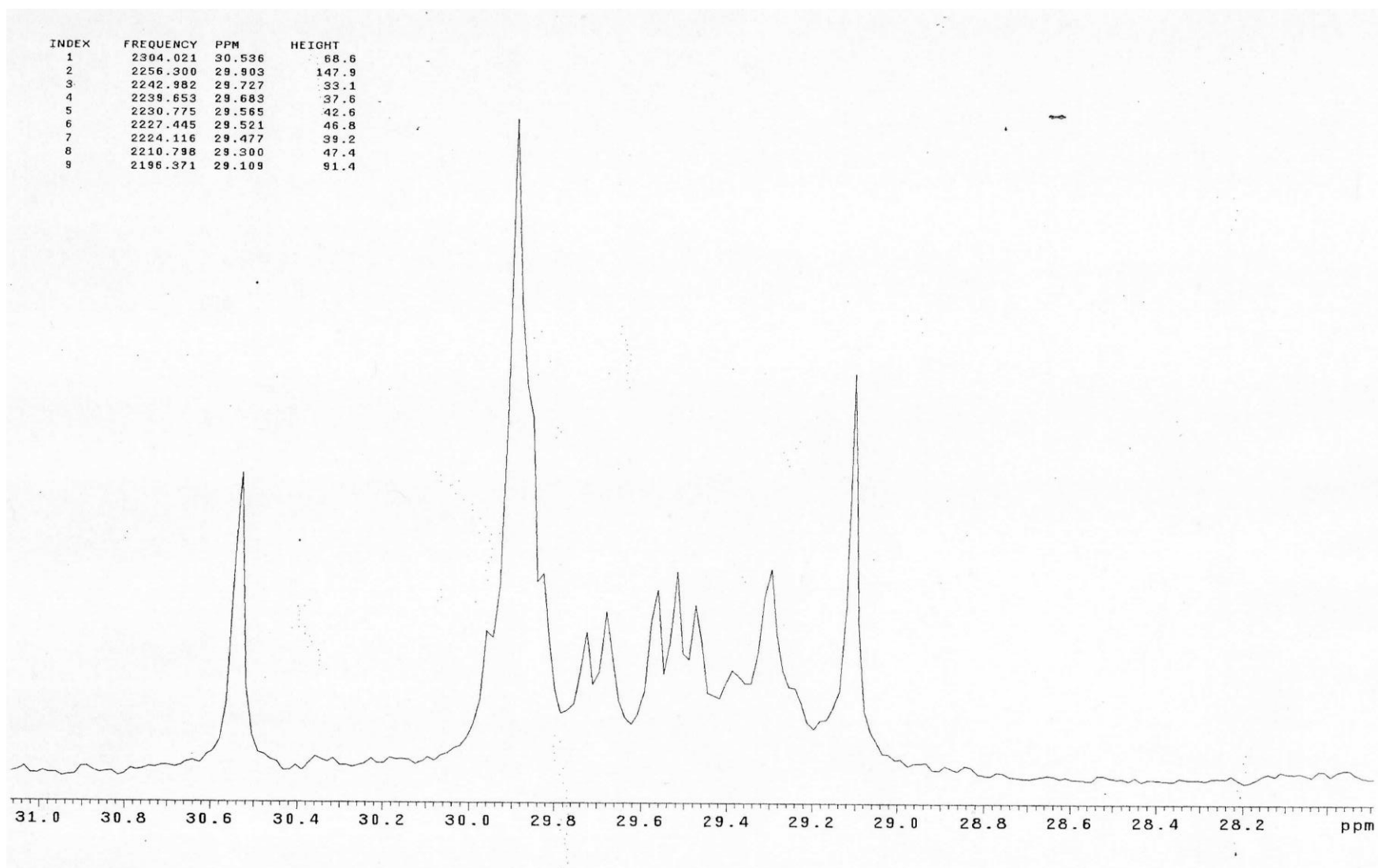


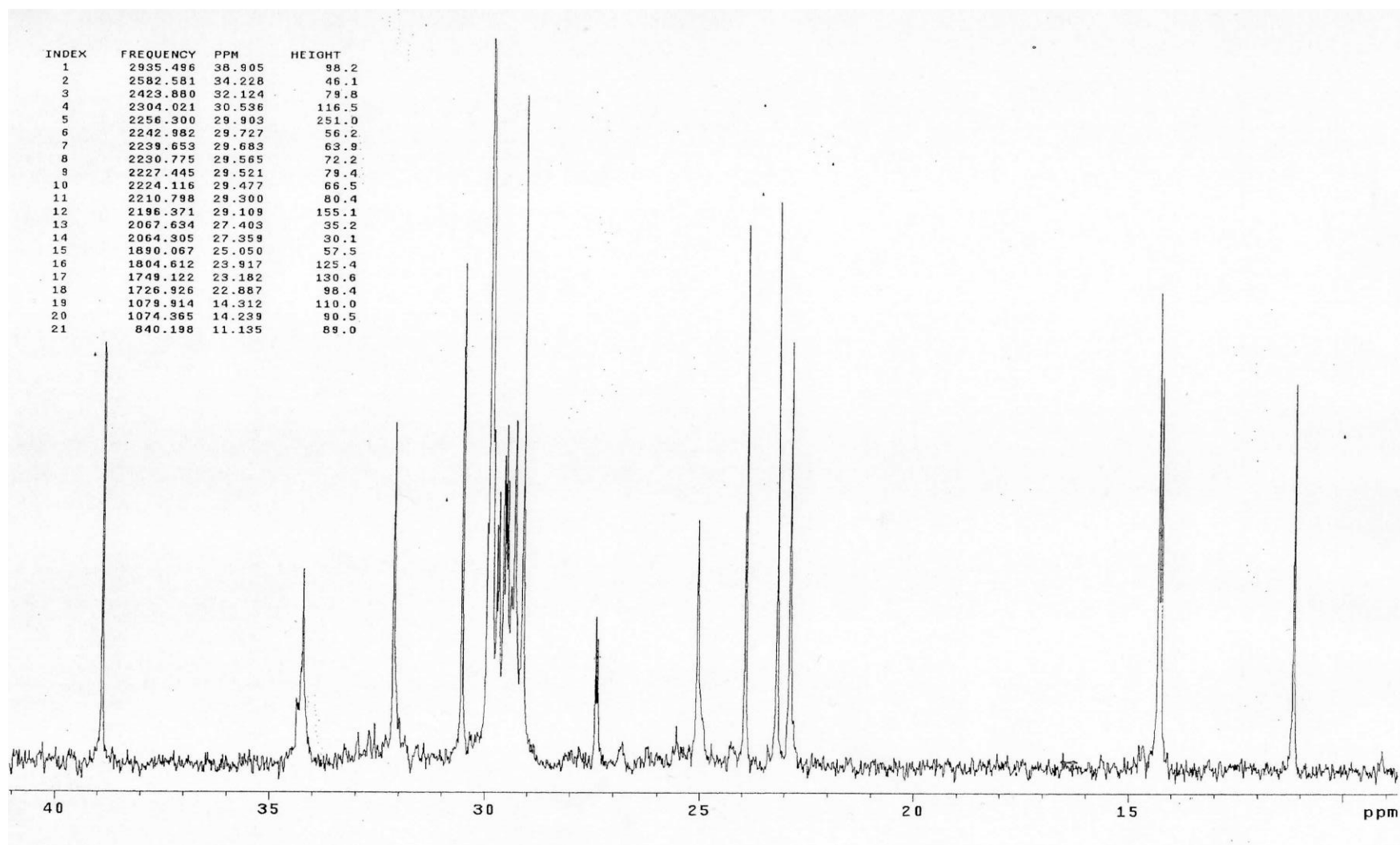
13C OBSERVE

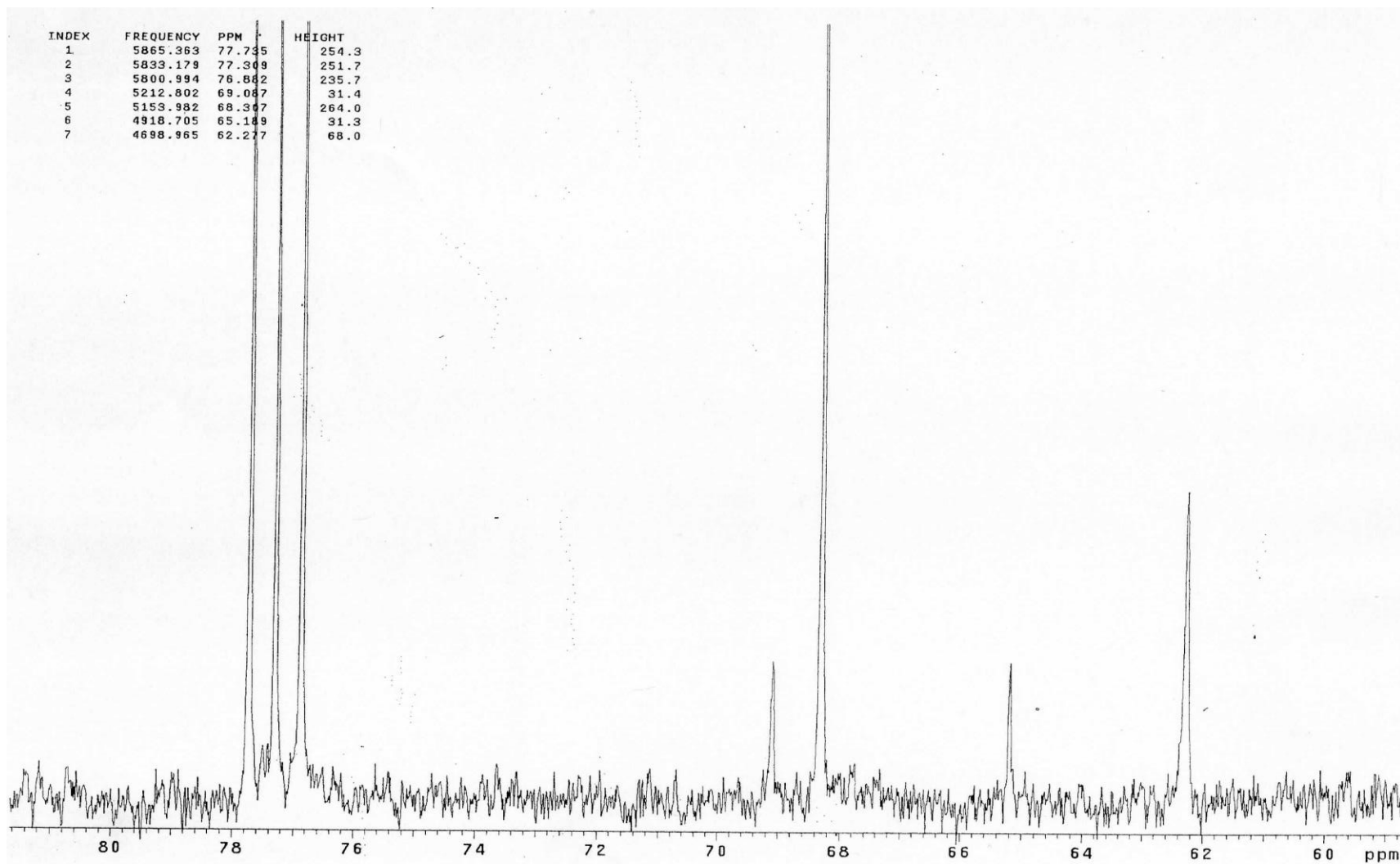
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatllicue"

Relax. delay 1.617 sec
Pulse 30.0 degrees
Acq. time 0.883 sec
Width 18181.8 Hz
140 repetitions
OBSERVE C13, 75.4531465 MHz
DECOUPLE H1, 300.0734551 MHz
Power 39 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.1 Hz
FT size 32768
Total time 27 hr, 13 min, 46 sec

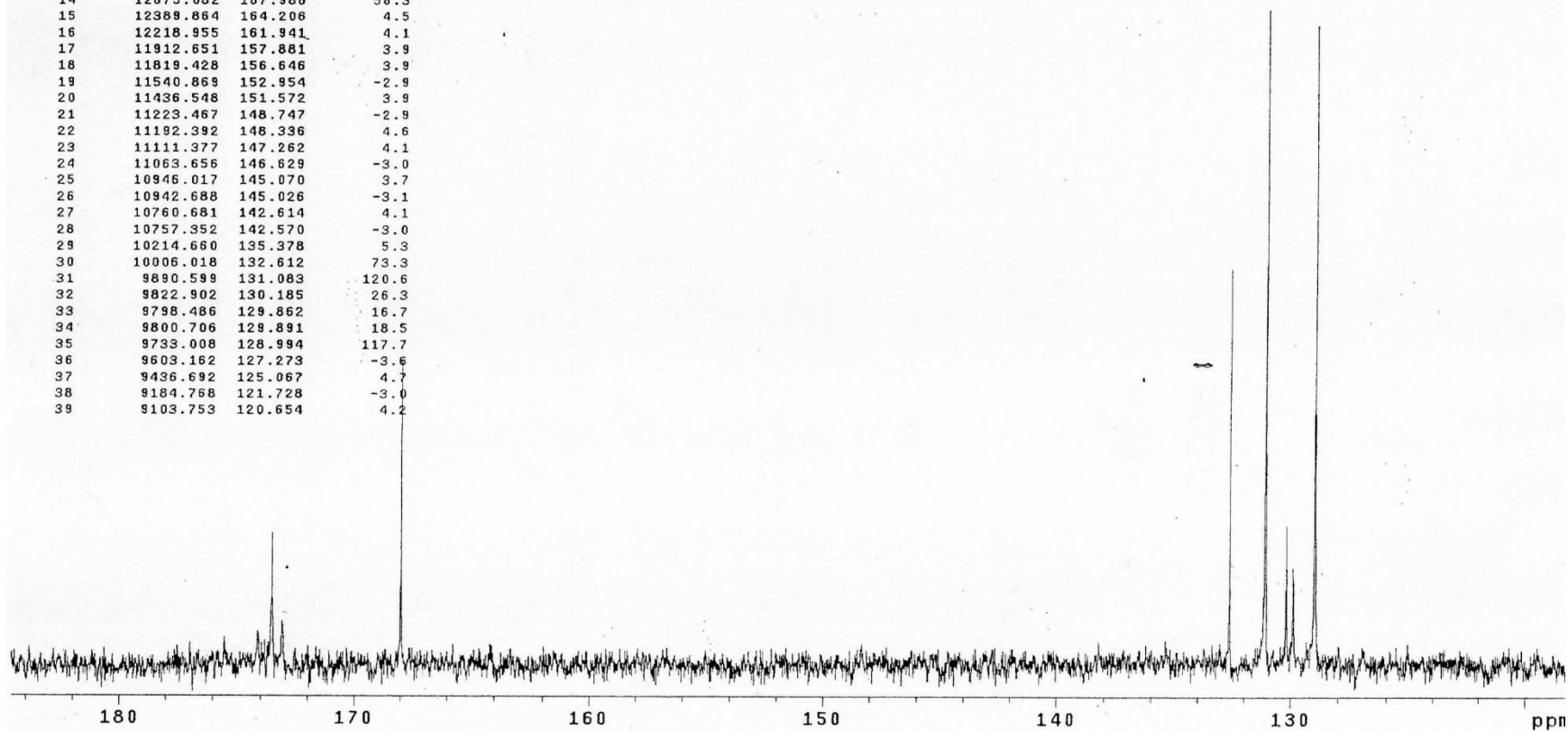


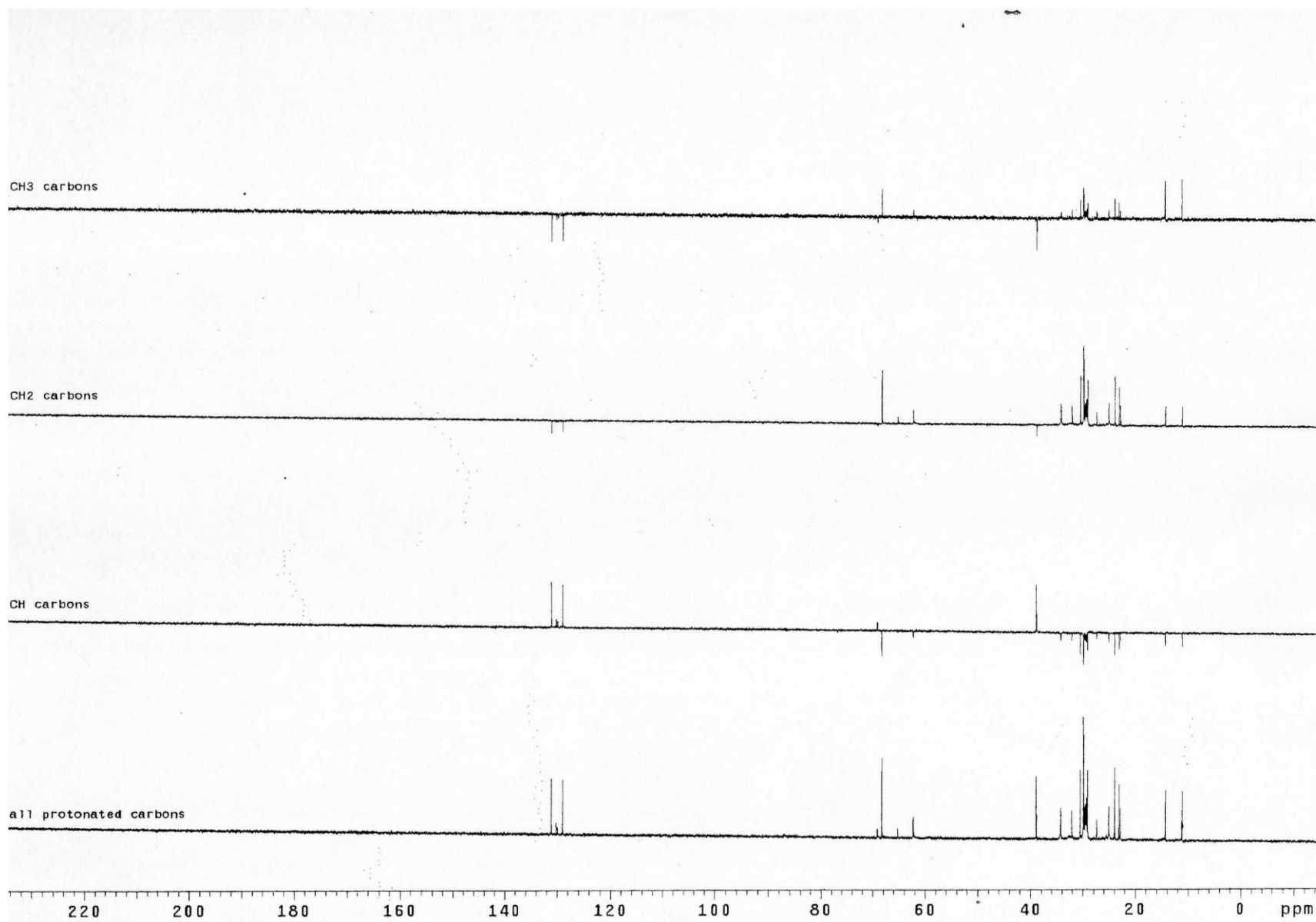






| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT | INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|---------|--------|-------|-----------|-----|--------|
| 1 | 13639.497 | 180.768 | -3.6 | | | | |
| 2 | 13394.231 | 177.517 | 4.1 | | | | |
| 3 | 13354.279 | 176.988 | 4.7 | | | | |
| 4 | 13344.290 | 176.855 | -4.2 | | | | |
| 5 | 13243.299 | 175.517 | 5.7 | | | | |
| 6 | 13137.868 | 174.120 | 6.8 | | | | |
| 7 | 13093.476 | 173.531 | 24.6 | | | | |
| 8 | 13059.072 | 173.075 | 8.6 | | | | |
| 9 | 12972.508 | 171.928 | -3.7 | | | | |
| 10 | 12951.422 | 171.649 | 3.9 | | | | |
| 11 | 12913.689 | 171.148 | -2.9 | | | | |
| 12 | 12851.540 | 170.325 | 3.8 | | | | |
| 13 | 12735.011 | 168.780 | -2.9 | | | | |
| 14 | 12675.082 | 167.986 | 56.3 | | | | |
| 15 | 12389.864 | 164.206 | 4.5 | | | | |
| 16 | 12218.955 | 161.941 | 4.1 | | | | |
| 17 | 11912.651 | 157.881 | 3.9 | | | | |
| 18 | 11819.428 | 156.646 | 3.9 | | | | |
| 19 | 11540.869 | 152.954 | -2.9 | | | | |
| 20 | 11436.548 | 151.572 | 3.9 | | | | |
| 21 | 11223.467 | 148.747 | -2.9 | | | | |
| 22 | 11192.392 | 148.336 | 4.6 | | | | |
| 23 | 11111.377 | 147.262 | 4.1 | | | | |
| 24 | 11063.656 | 146.629 | -3.0 | | | | |
| 25 | 10946.017 | 145.070 | 3.7 | | | | |
| 26 | 10942.688 | 145.026 | -3.1 | | | | |
| 27 | 10760.681 | 142.614 | 4.1 | | | | |
| 28 | 10757.352 | 142.570 | -3.0 | | | | |
| 29 | 10214.660 | 135.378 | 5.3 | | | | |
| 30 | 10006.018 | 132.612 | 73.3 | | | | |
| 31 | 9890.599 | 131.083 | 120.6 | | | | |
| 32 | 9822.902 | 130.185 | 26.3 | | | | |
| 33 | 9798.486 | 129.862 | 16.7 | | | | |
| 34 | 9800.706 | 129.891 | 18.5 | | | | |
| 35 | 9733.008 | 128.994 | 117.7 | | | | |
| 36 | 9603.162 | 127.273 | -3.6 | | | | |
| 37 | 9436.692 | 125.067 | 4.7 | | | | |
| 38 | 9184.768 | 121.728 | -3.0 | | | | |
| 39 | 9103.753 | 120.654 | 4.2 | | | | |

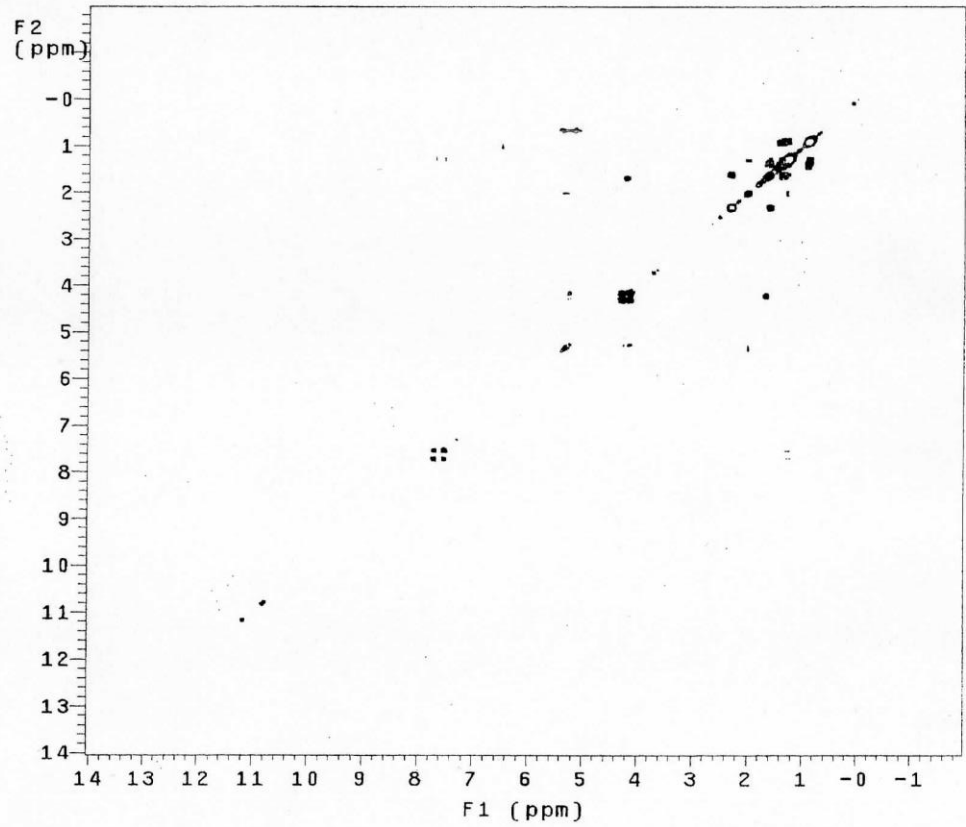
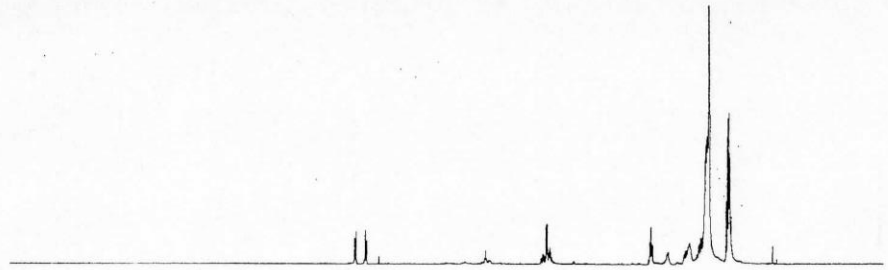
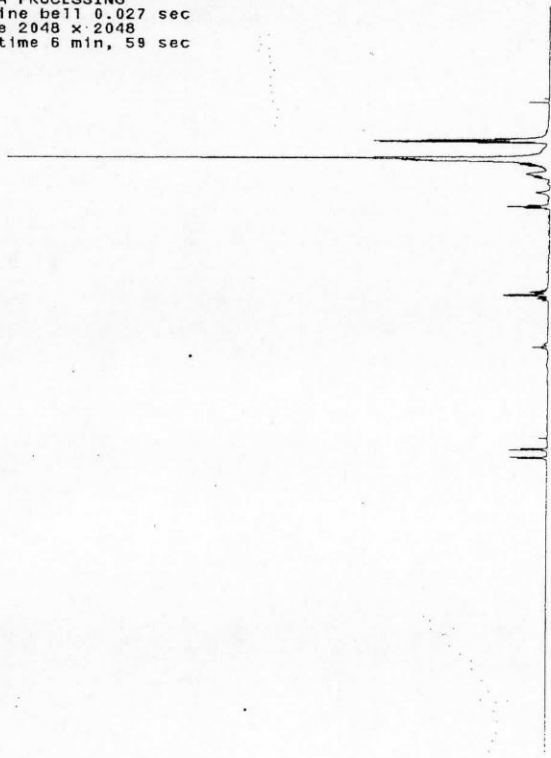




Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Sample directory: vnmr3_...
File: COSY

Pulse Sequence: COSY
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatlicue"

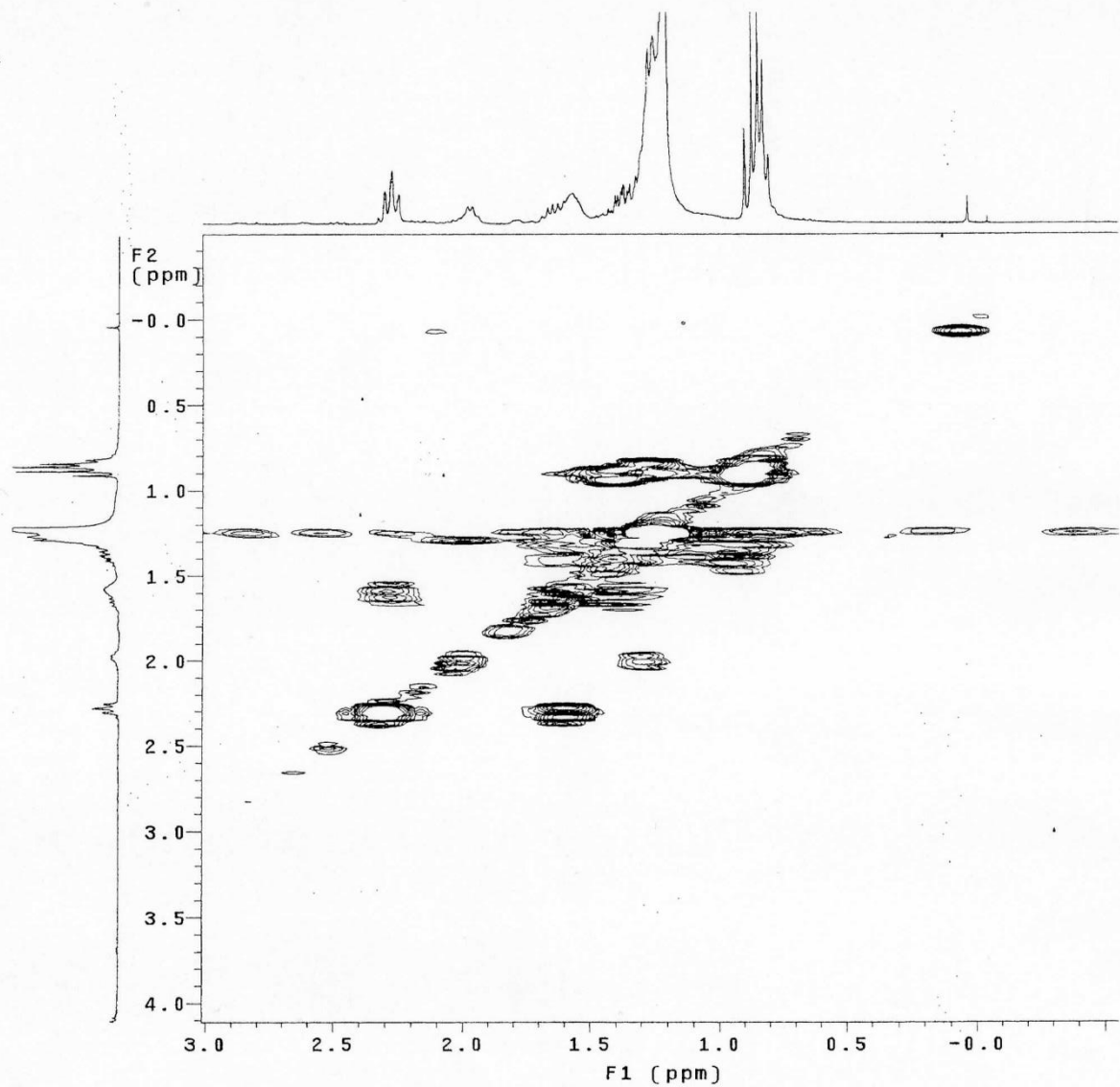
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4800.8 Hz
2D Width 4800.8 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0719887 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.027 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 6 min, 59 sec



Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Sample directory: vnmr3_...
File: COSY

Pulse Sequence: COSY
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatllicue"

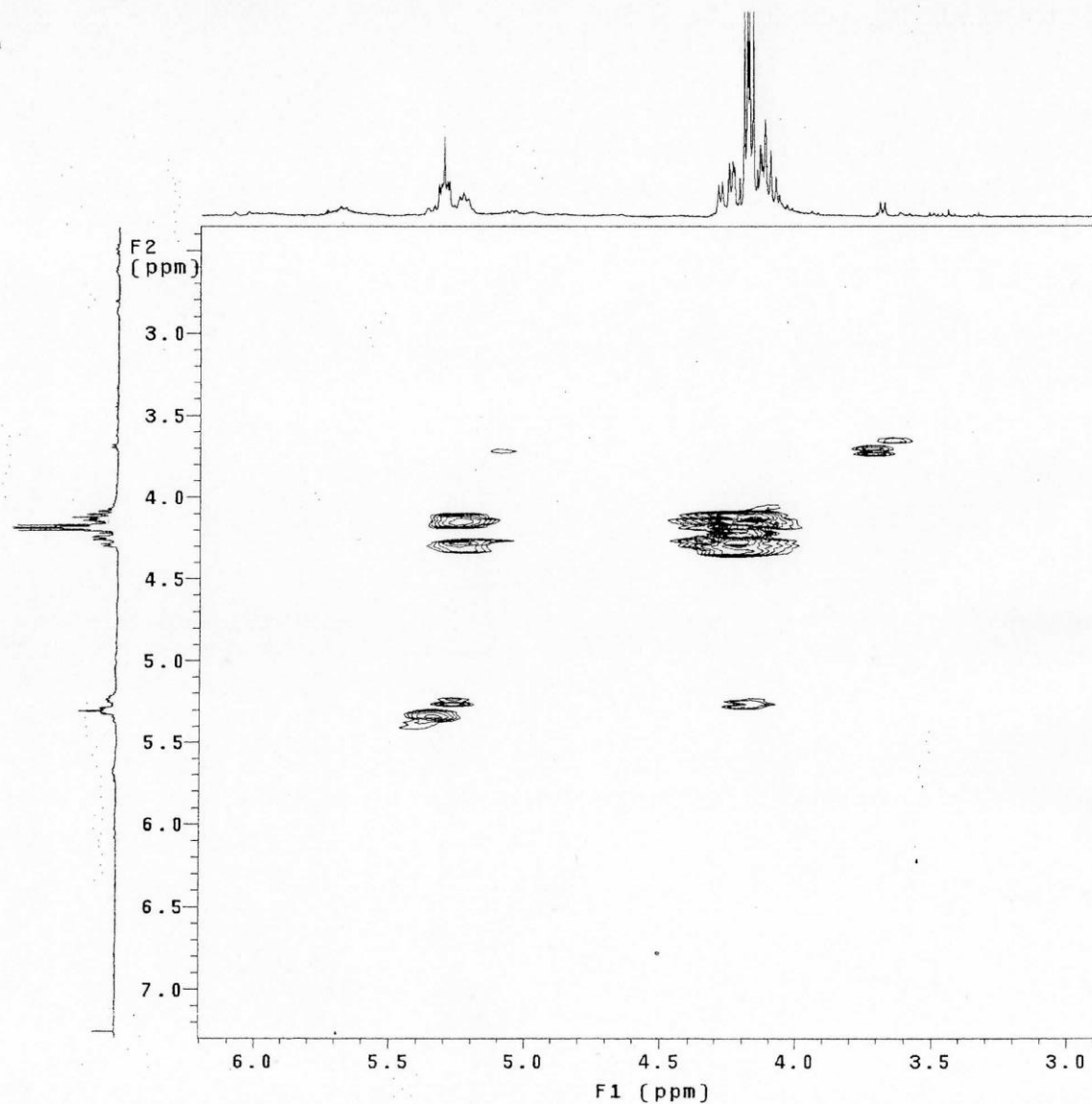
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4800.8 Hz
2D Width 4800.8 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0719887 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.027 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 6 min, 59 sec



Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmr3sys/data
Sample directory: vnmr3_376
File: COSY

Pulse Sequence: COSY
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-3005B "Coatllicue"

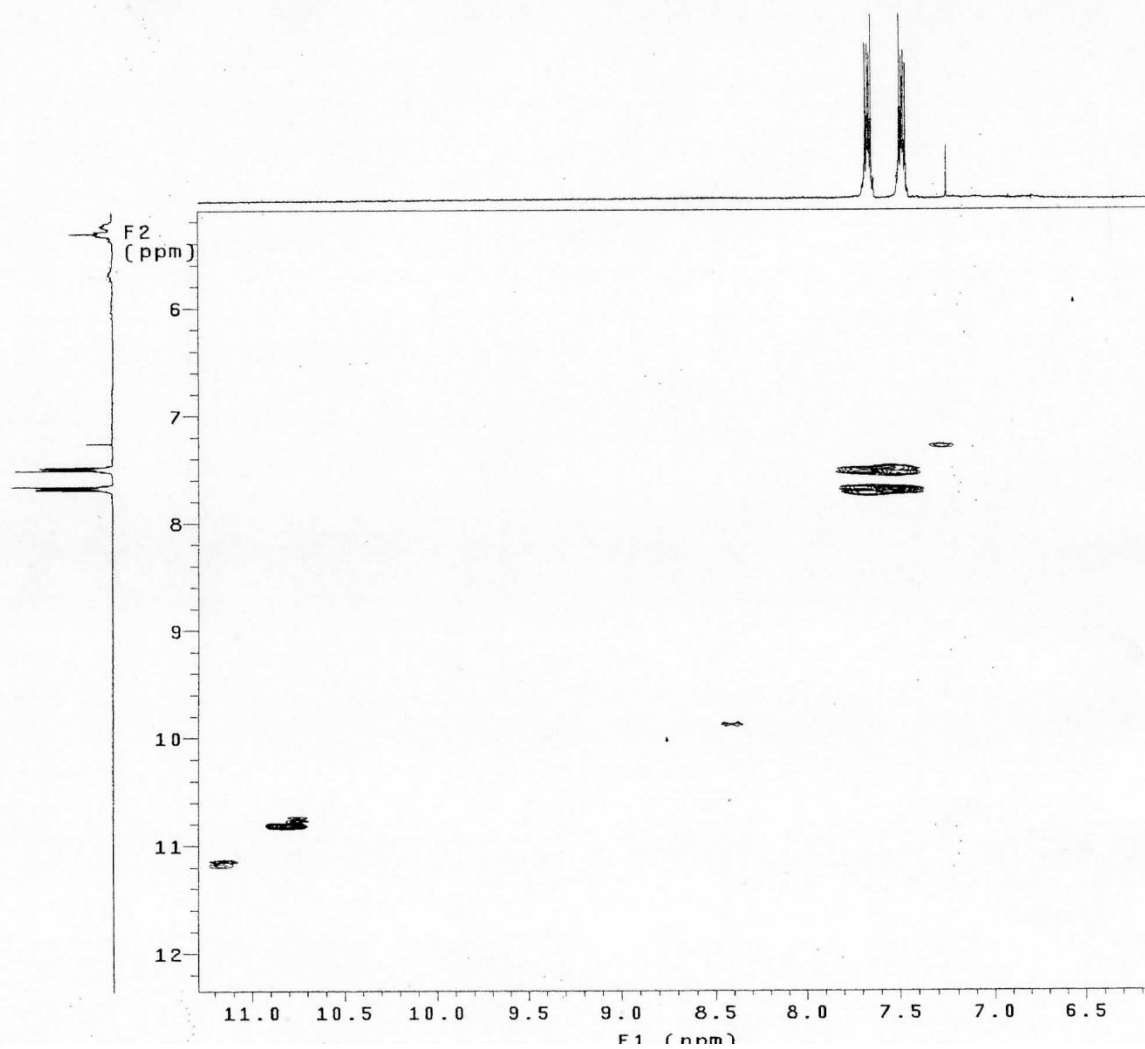
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4800.8 Hz
2D Width 4800.8 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0719887 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.027 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 6 min, 59 sec



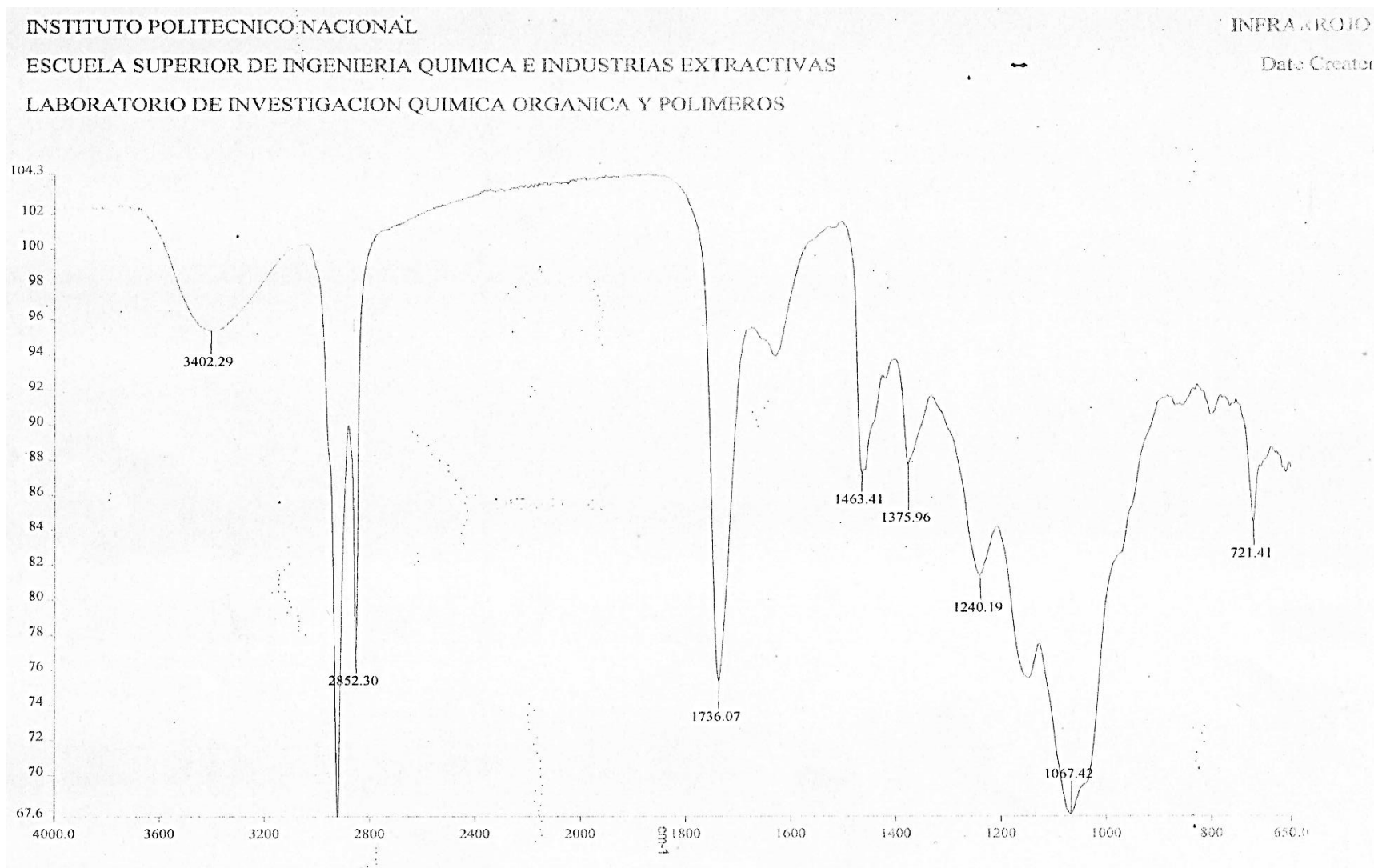
Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Sample directory: vnmr3_00000009
File: COSY

Pulse Sequence: COSY
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatllicue"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4800.8 Hz
2D Width 4800.8 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0719887 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.027 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 6 min, 59 sec



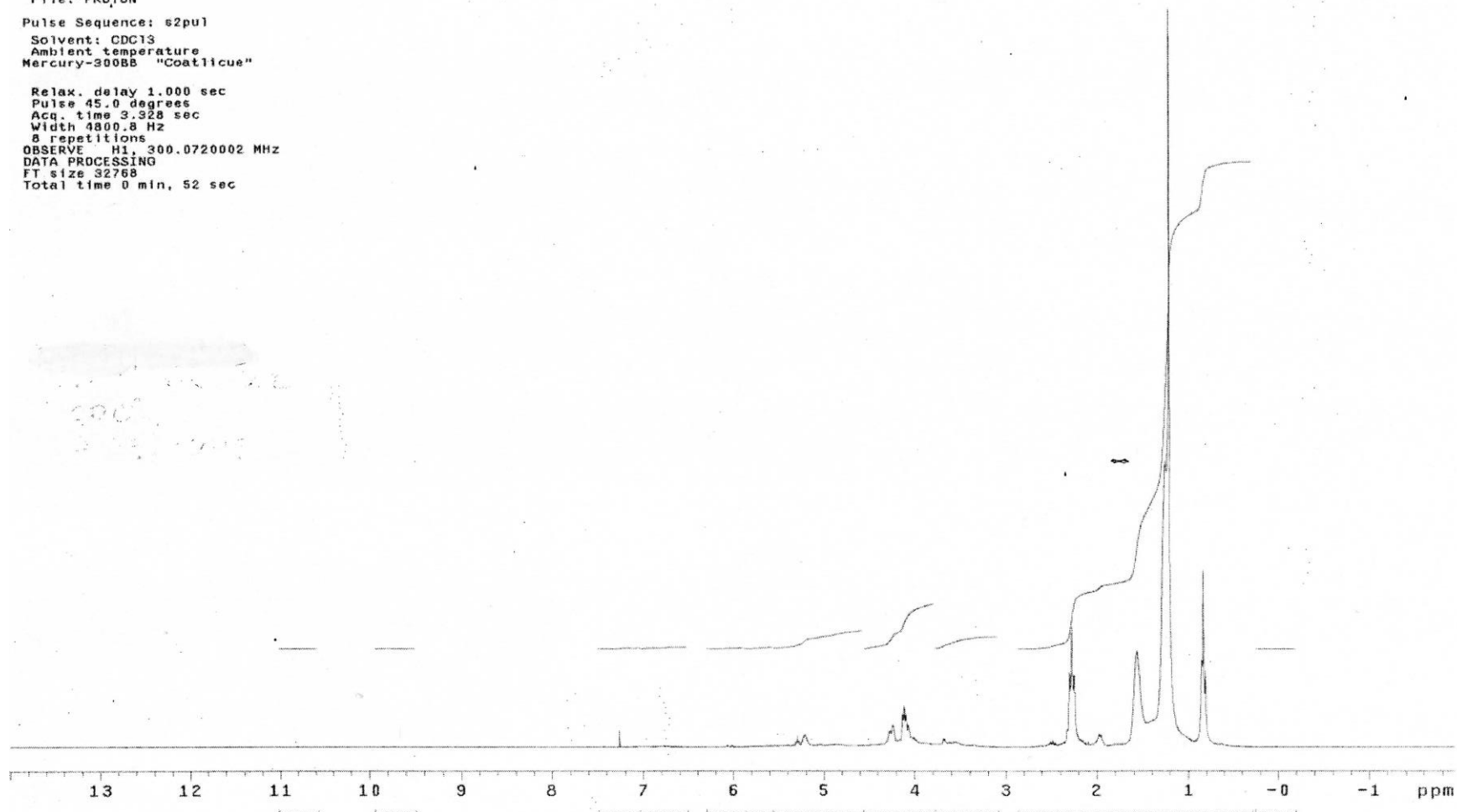
ANEXO E. Espectros de birsonimadiol



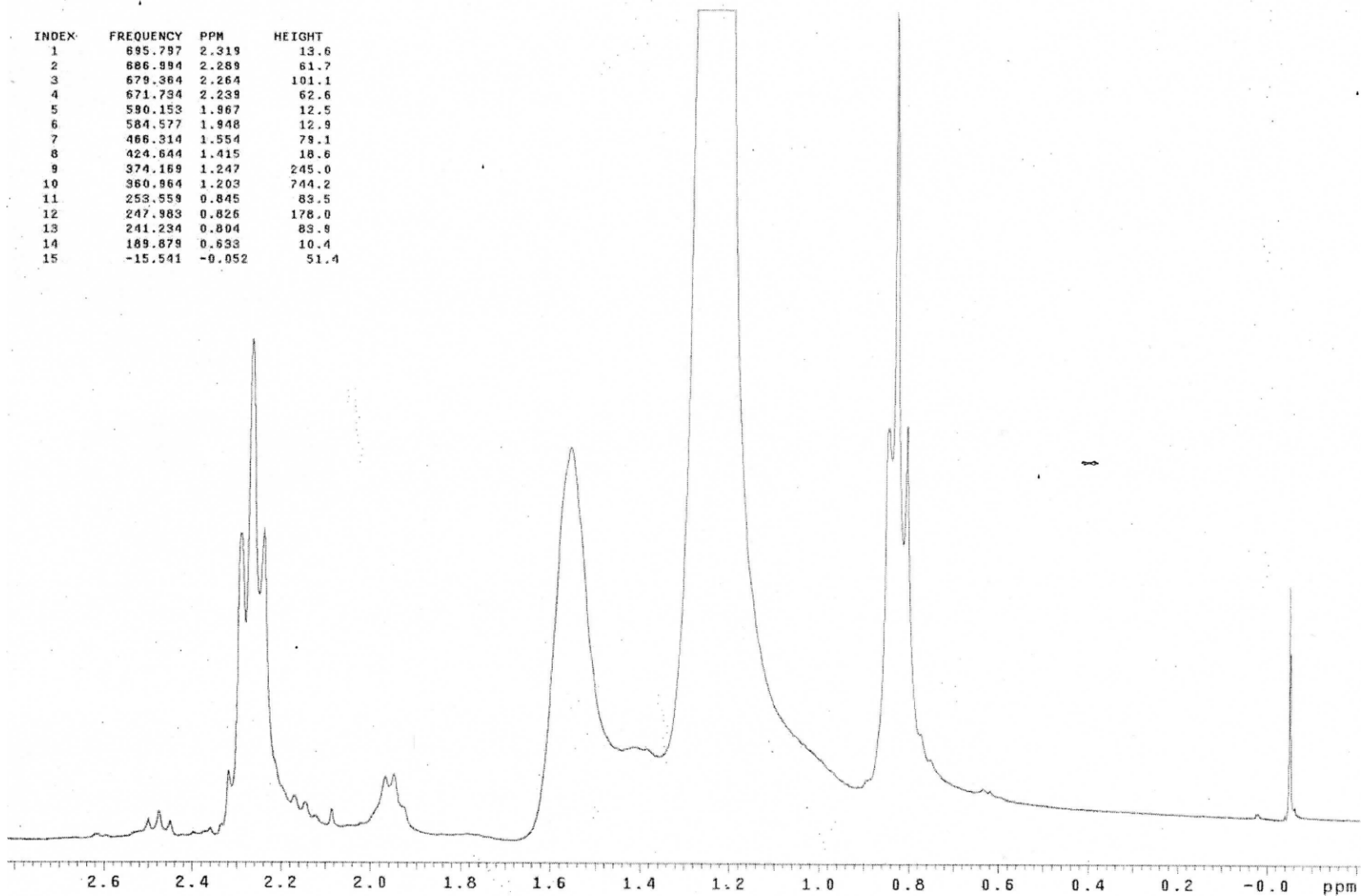
Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Sample directory: vnmr3_1000001
File: PROTON

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatllicue"

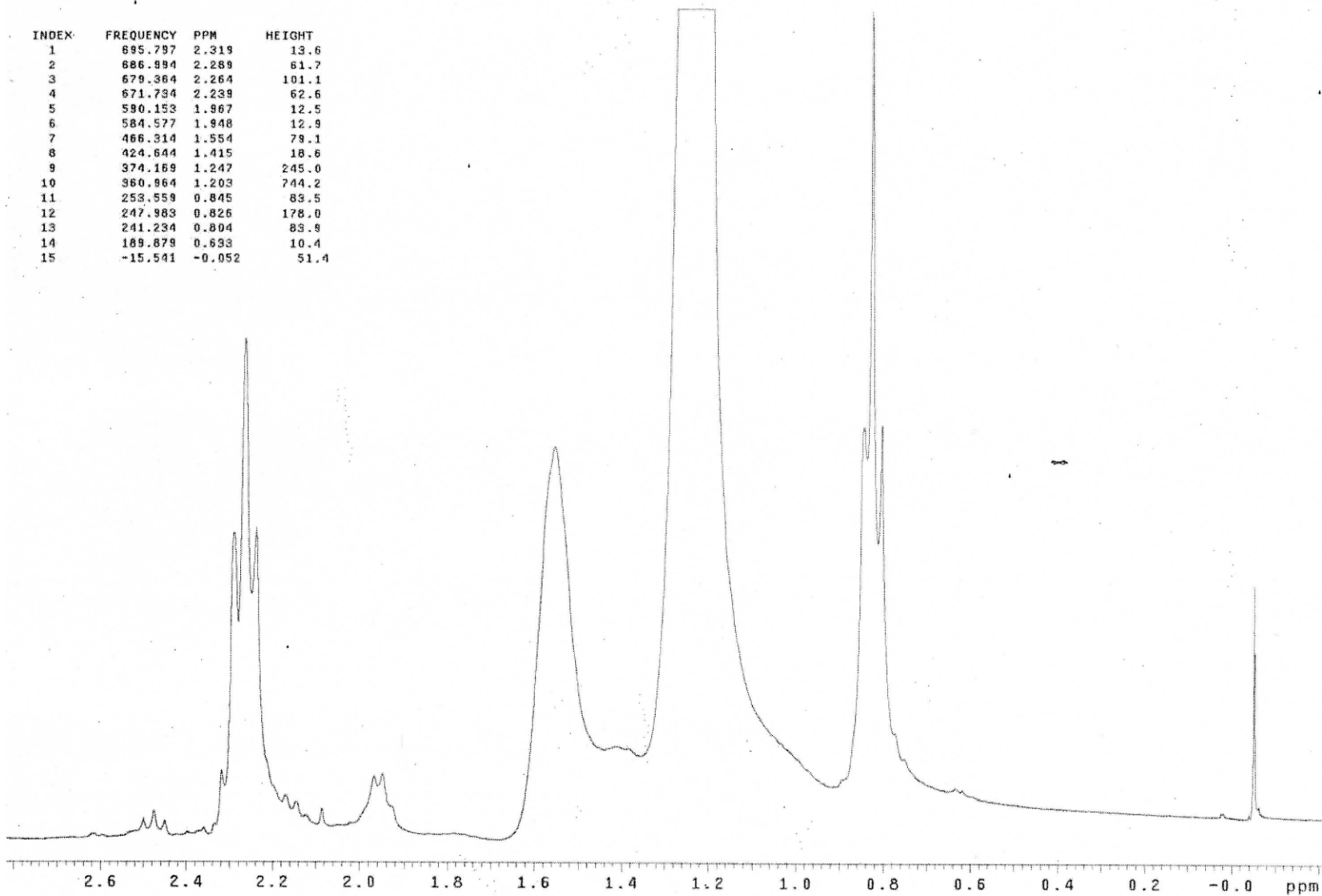
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.328 sec
Width 4800.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 300.0720002 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min, 52 sec



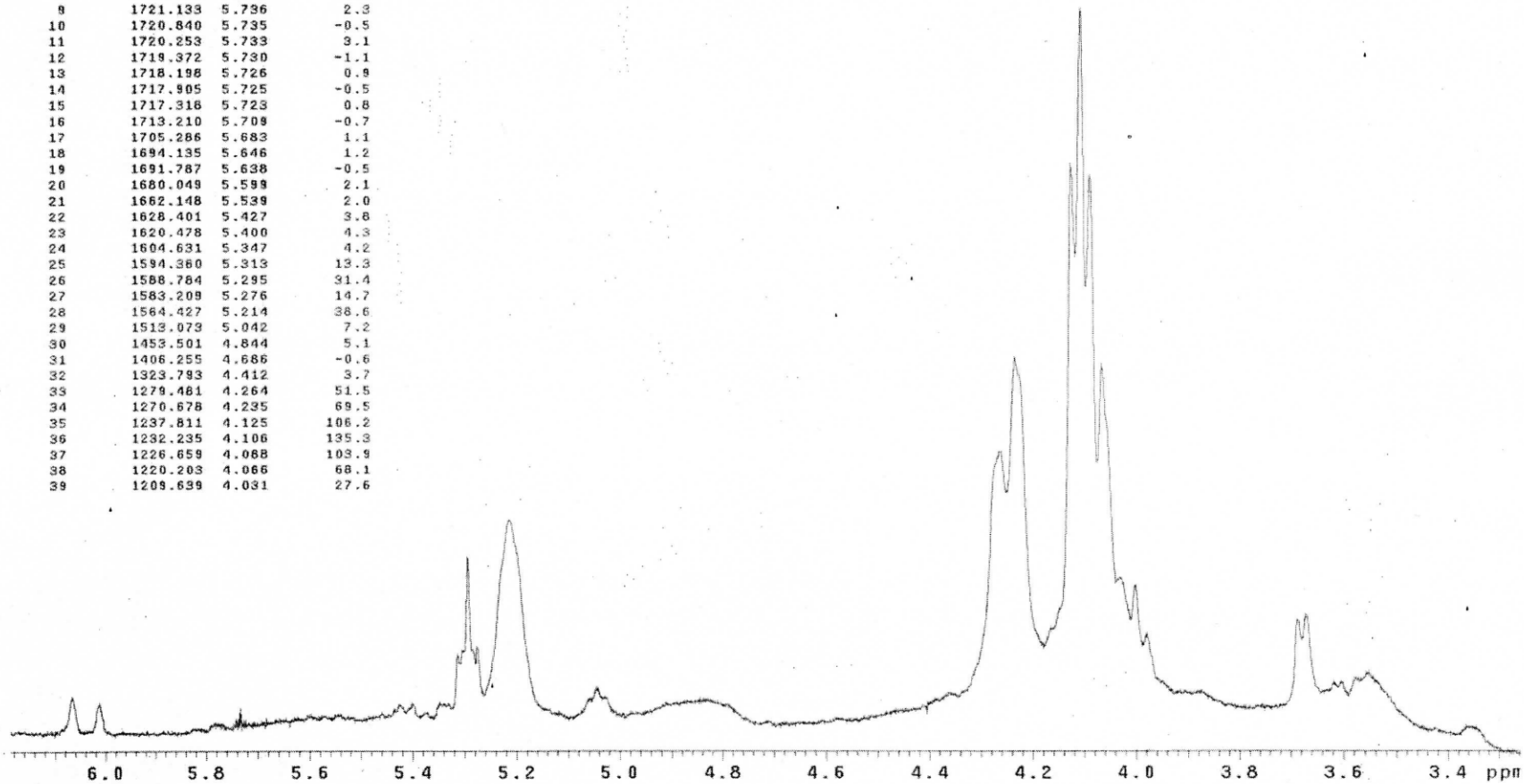
| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|--------|--------|
| 1 | 695.797 | 2.319 | 13.6 |
| 2 | 686.994 | 2.289 | 61.7 |
| 3 | 679.364 | 2.264 | 101.1 |
| 4 | 671.734 | 2.239 | 62.6 |
| 5 | 590.153 | 1.967 | 12.5 |
| 6 | 584.577 | 1.948 | 12.9 |
| 7 | 466.314 | 1.554 | 79.1 |
| 8 | 424.644 | 1.415 | 18.6 |
| 9 | 374.169 | 1.247 | 245.0 |
| 10 | 360.964 | 1.203 | 744.2 |
| 11 | 253.559 | 0.845 | 83.5 |
| 12 | 247.983 | 0.826 | 176.0 |
| 13 | 241.234 | 0.804 | 83.9 |
| 14 | 189.879 | 0.633 | 10.4 |
| 15 | -15.541 | -0.052 | 51.4 |



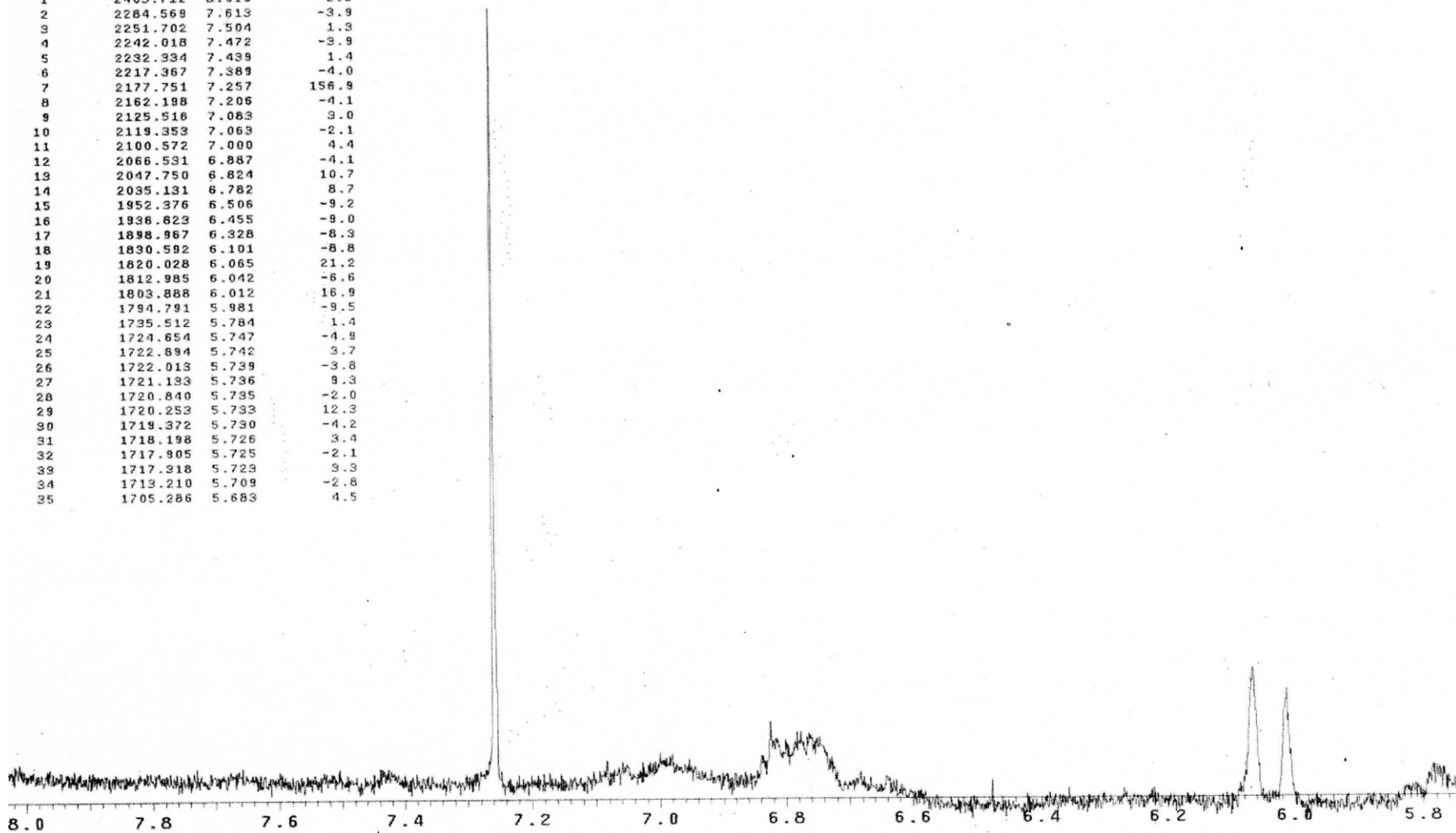
| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|--------|--------|
| 1 | 895.797 | 2.319 | 13.6 |
| 2 | 886.994 | 2.289 | 61.7 |
| 3 | 679.364 | 2.264 | 101.1 |
| 4 | 671.734 | 2.239 | 62.6 |
| 5 | 590.153 | 1.967 | 12.5 |
| 6 | 584.577 | 1.948 | 12.9 |
| 7 | 466.314 | 1.554 | 79.1 |
| 8 | 424.644 | 1.415 | 18.6 |
| 9 | 374.169 | 1.247 | 245.0 |
| 10 | 360.864 | 1.203 | 744.2 |
| 11 | 253.559 | 0.845 | 83.5 |
| 12 | 247.983 | 0.826 | 176.0 |
| 13 | 241.234 | 0.804 | 83.9 |
| 14 | 189.879 | 0.638 | 10.4 |
| 15 | -15.541 | -0.052 | 51.4 |



| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT | INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|--------|-------|-----------|-------|--------|
| 1 | 1830.592 | 6.101 | -2.2 | 40 | 1200.542 | 4.001 | 26.2 |
| 2 | 1820.028 | 6.065 | 5.3 | 41 | 1193.792 | 3.976 | 17.1 |
| 3 | 1812.985 | 6.042 | -1.7 | 42 | 1106.049 | 3.686 | 19.6 |
| 4 | 1803.888 | 6.012 | 4.2 | 43 | 1101.060 | 3.669 | 20.7 |
| 5 | 1794.791 | 5.981 | -2.4 | 44 | 1085.507 | 3.617 | 8.1 |
| 6 | 1724.654 | 5.747 | -1.2 | 45 | 1067.913 | 3.557 | 10.0 |
| 7 | 1722.894 | 5.742 | 0.9 | 46 | 1018.306 | 3.394 | -2.4 |
| 8 | 1722.013 | 5.739 | -0.9 | | | | |
| 9 | 1721.133 | 5.736 | 2.3 | | | | |
| 10 | 1720.840 | 5.735 | -0.5 | | | | |
| 11 | 1720.253 | 5.733 | 3.1 | | | | |
| 12 | 1719.372 | 5.730 | -1.1 | | | | |
| 13 | 1718.198 | 5.726 | 0.9 | | | | |
| 14 | 1717.905 | 5.725 | -0.5 | | | | |
| 15 | 1717.318 | 5.723 | 0.8 | | | | |
| 16 | 1713.210 | 5.709 | -0.7 | | | | |
| 17 | 1705.286 | 5.683 | 1.1 | | | | |
| 18 | 1694.135 | 5.646 | 1.2 | | | | |
| 19 | 1691.787 | 5.638 | -0.5 | | | | |
| 20 | 1680.049 | 5.599 | 2.1 | | | | |
| 21 | 1662.148 | 5.539 | 2.0 | | | | |
| 22 | 1628.401 | 5.427 | 3.8 | | | | |
| 23 | 1620.478 | 5.400 | 4.3 | | | | |
| 24 | 1604.631 | 5.347 | 4.2 | | | | |
| 25 | 1594.380 | 5.313 | 13.3 | | | | |
| 26 | 1588.784 | 5.295 | 31.4 | | | | |
| 27 | 1583.209 | 5.276 | 14.7 | | | | |
| 28 | 1564.427 | 5.214 | 38.6 | | | | |
| 29 | 1513.073 | 5.042 | 7.2 | | | | |
| 30 | 1453.501 | 4.844 | 5.1 | | | | |
| 31 | 1406.255 | 4.686 | -0.6 | | | | |
| 32 | 1323.793 | 4.412 | 3.7 | | | | |
| 33 | 1279.481 | 4.264 | 51.5 | | | | |
| 34 | 1270.678 | 4.235 | 69.5 | | | | |
| 35 | 1237.811 | 4.125 | 106.2 | | | | |
| 36 | 1232.235 | 4.106 | 135.3 | | | | |
| 37 | 1226.659 | 4.088 | 103.9 | | | | |
| 38 | 1220.203 | 4.066 | 68.1 | | | | |
| 39 | 1209.639 | 4.031 | 27.6 | | | | |



| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|-------|--------|
| 1 | 2403.712 | 8.010 | 2.8 |
| 2 | 2284.569 | 7.613 | -3.9 |
| 3 | 2251.702 | 7.504 | 1.3 |
| 4 | 2242.018 | 7.472 | -3.9 |
| 5 | 2232.334 | 7.439 | 1.4 |
| 6 | 2217.367 | 7.389 | -4.0 |
| 7 | 2177.751 | 7.257 | 156.9 |
| 8 | 2162.198 | 7.205 | -4.1 |
| 9 | 2125.516 | 7.083 | 3.0 |
| 10 | 2119.353 | 7.063 | -2.1 |
| 11 | 2100.572 | 7.000 | 4.4 |
| 12 | 2066.531 | 6.887 | -4.1 |
| 13 | 2047.750 | 6.824 | 10.7 |
| 14 | 2035.131 | 6.782 | 8.7 |
| 15 | 1952.376 | 6.506 | -9.2 |
| 16 | 1936.623 | 6.455 | -9.0 |
| 17 | 1898.867 | 6.328 | -8.3 |
| 18 | 1830.592 | 6.101 | -8.8 |
| 19 | 1820.028 | 6.065 | 21.2 |
| 20 | 1812.985 | 6.042 | -6.6 |
| 21 | 1803.888 | 6.012 | 16.9 |
| 22 | 1794.791 | 5.981 | -9.5 |
| 23 | 1735.512 | 5.784 | 1.4 |
| 24 | 1724.654 | 5.747 | -4.9 |
| 25 | 1722.894 | 5.742 | 3.7 |
| 26 | 1722.013 | 5.739 | -3.8 |
| 27 | 1721.133 | 5.736 | 9.3 |
| 28 | 1720.840 | 5.735 | -2.0 |
| 29 | 1720.253 | 5.733 | 12.3 |
| 30 | 1719.372 | 5.730 | -4.2 |
| 31 | 1718.198 | 5.726 | 3.4 |
| 32 | 1717.905 | 5.725 | -2.1 |
| 33 | 1717.318 | 5.723 | 3.3 |
| 34 | 1713.210 | 5.709 | -2.8 |
| 35 | 1705.286 | 5.683 | 4.5 |



13C OBSERVE

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

Mercury-300BB "Coatlicue"

Relax. delay 1.617 sec

Pulse 30.0 degrees

Acq. time 0.883 sec

Width 18181.8 Hz

2292 repetitions

OBSERVE C13, 75.4531465 MHz

DECOUPLE H1, 300.0734551 MHz

Power 39 dB

continuously on

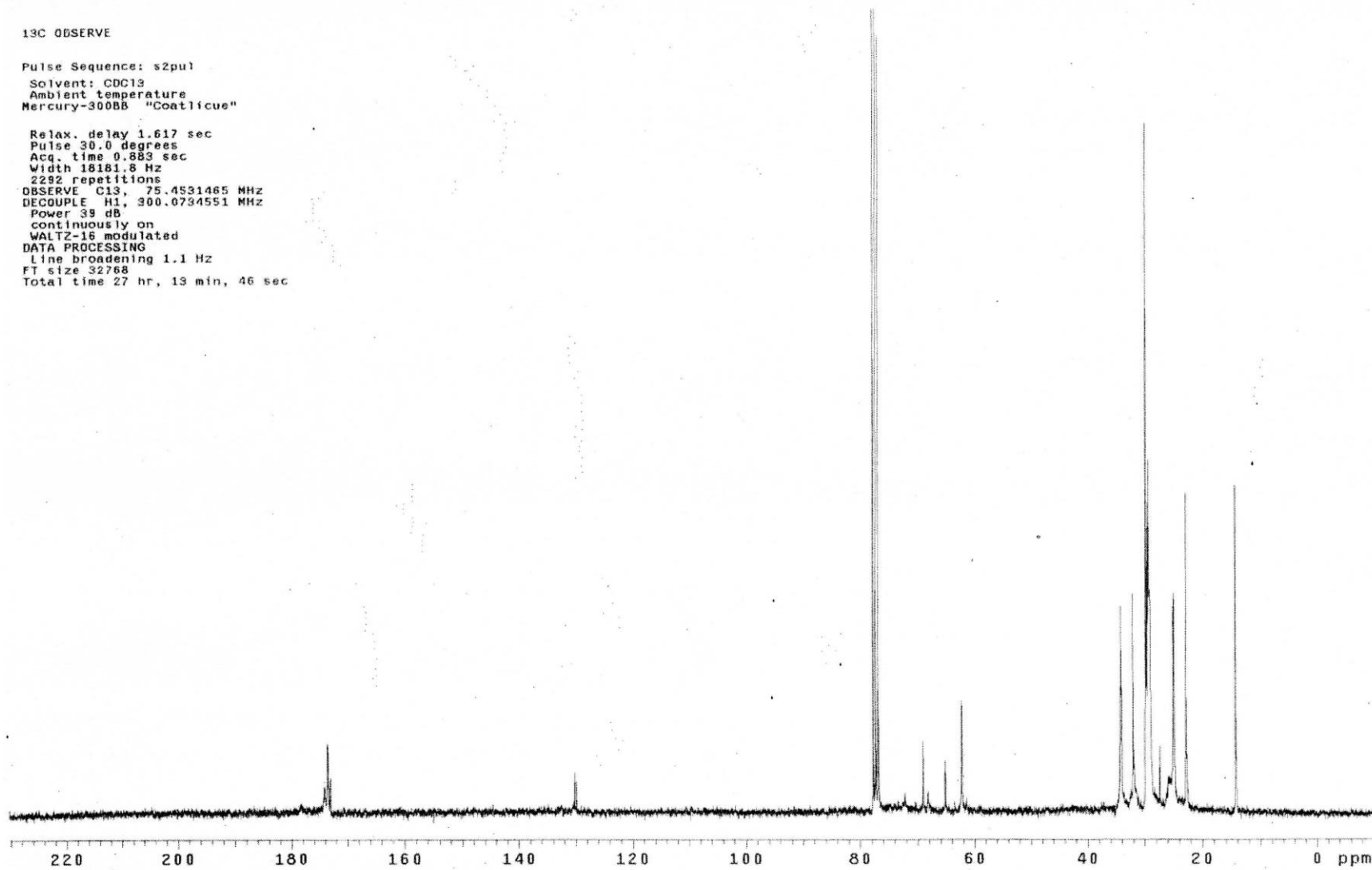
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

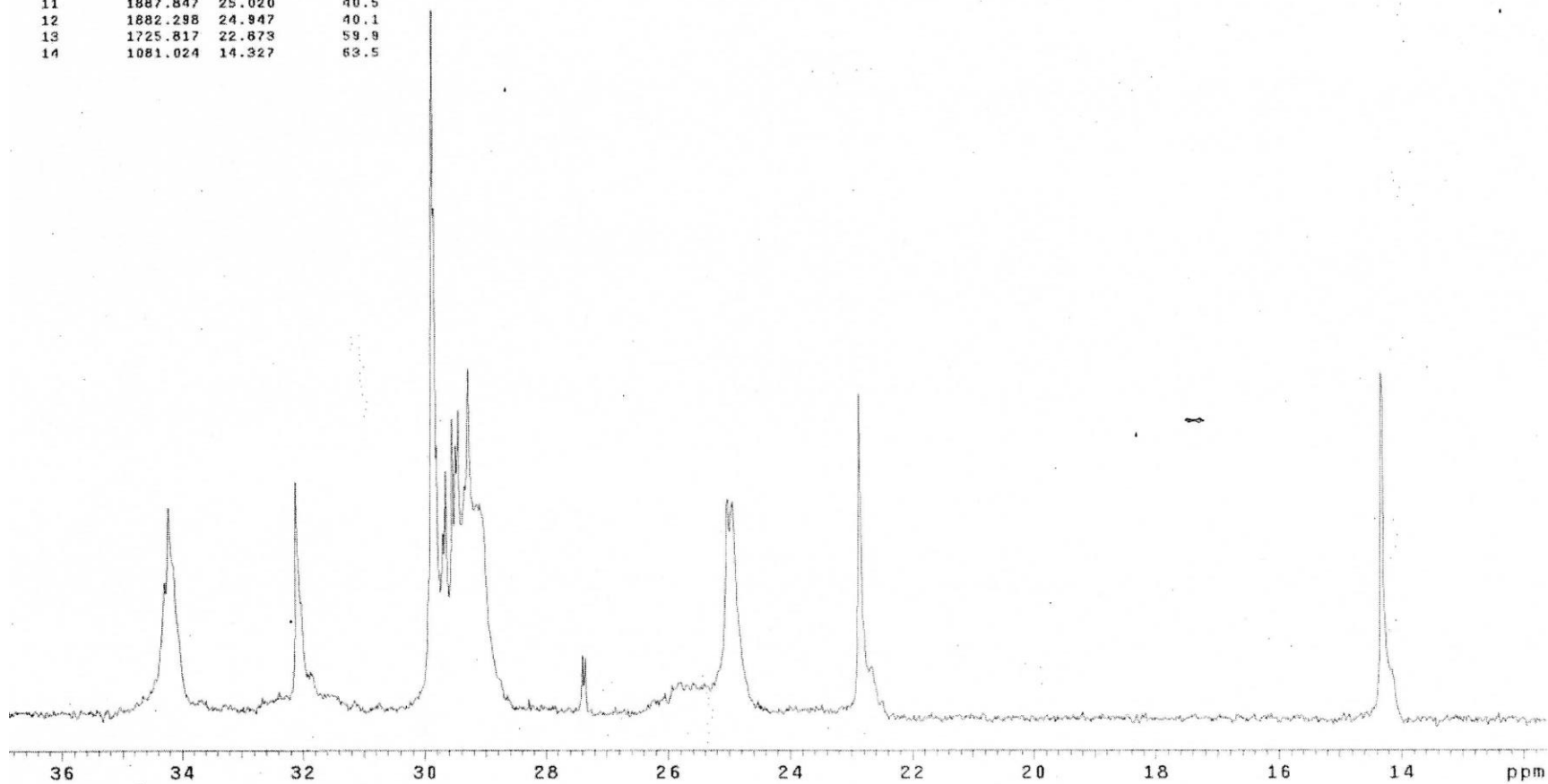
Line broadening 1.1 Hz

FT size 32768

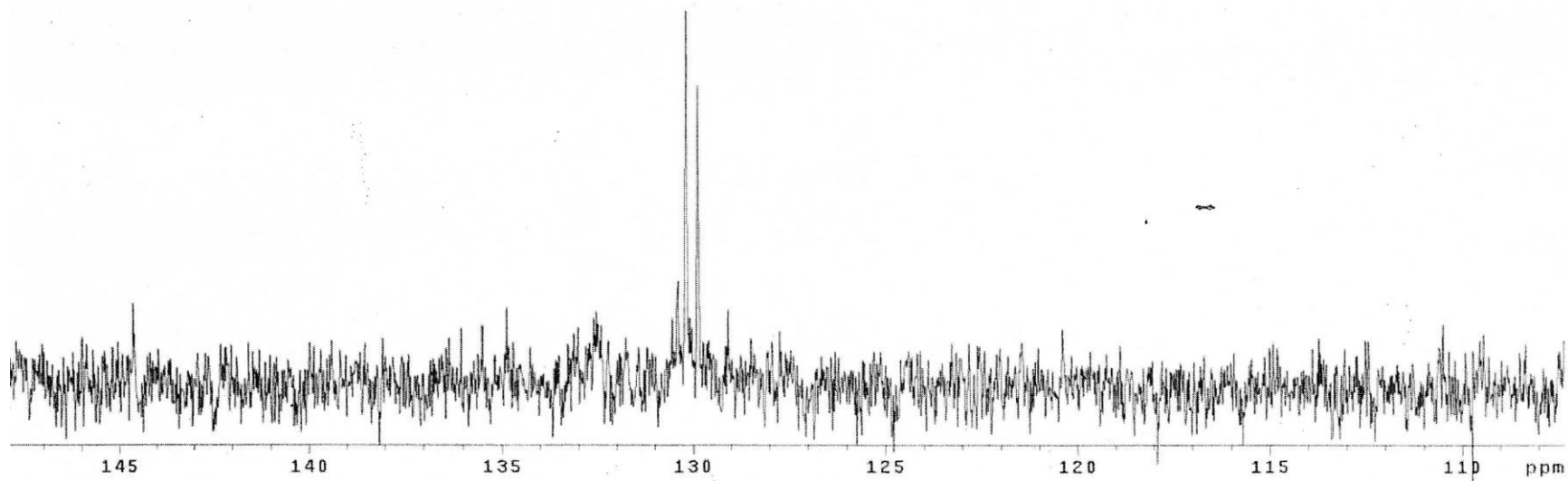
Total time 27 hr, 13 min, 46 sec



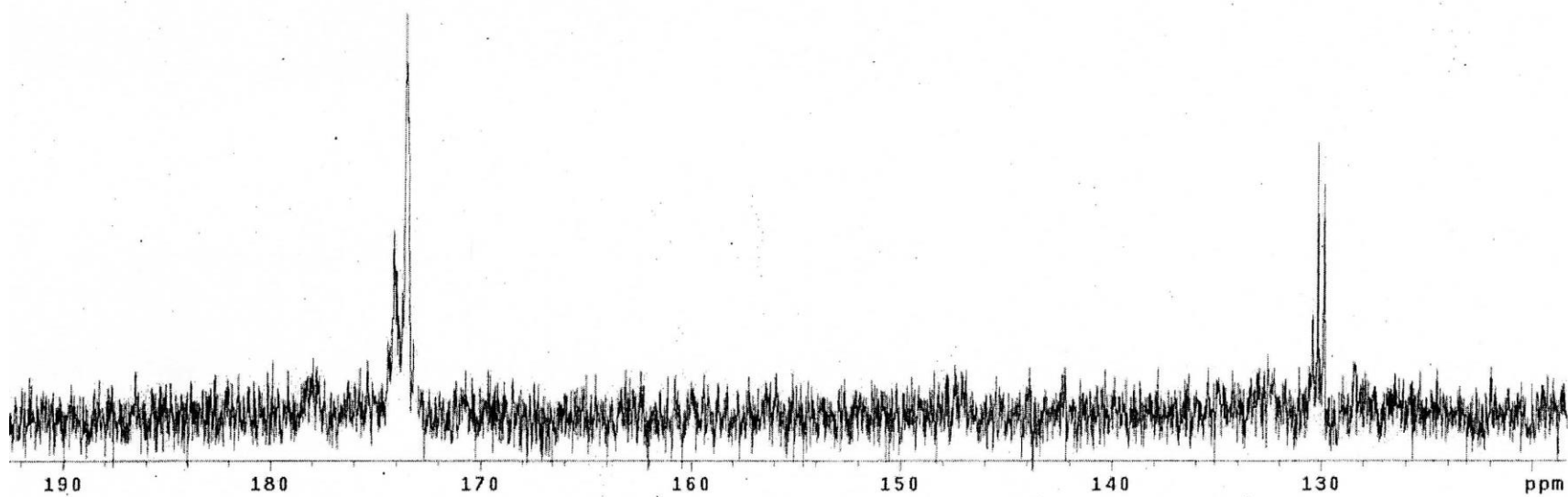
| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|--------|--------|
| 1 | 2581.471 | 34.213 | 39.1 |
| 2 | 2422.770 | 32.110 | 43.6 |
| 3 | 2254.080 | 29.874 | 129.6 |
| 4 | 2248.531 | 29.800 | 50.3 |
| 5 | 2240.763 | 29.697 | 34.3 |
| 6 | 2237.433 | 29.653 | 45.7 |
| 7 | 2229.665 | 29.550 | 55.2 |
| 8 | 2225.226 | 29.491 | 50.4 |
| 9 | 2221.896 | 29.447 | 56.8 |
| 10 | 2209.689 | 29.266 | 64.4 |
| 11 | 1887.847 | 25.020 | 40.5 |
| 12 | 1882.298 | 24.947 | 40.1 |
| 13 | 1725.817 | 22.673 | 59.9 |
| 14 | 1081.024 | 14.327 | 63.5 |

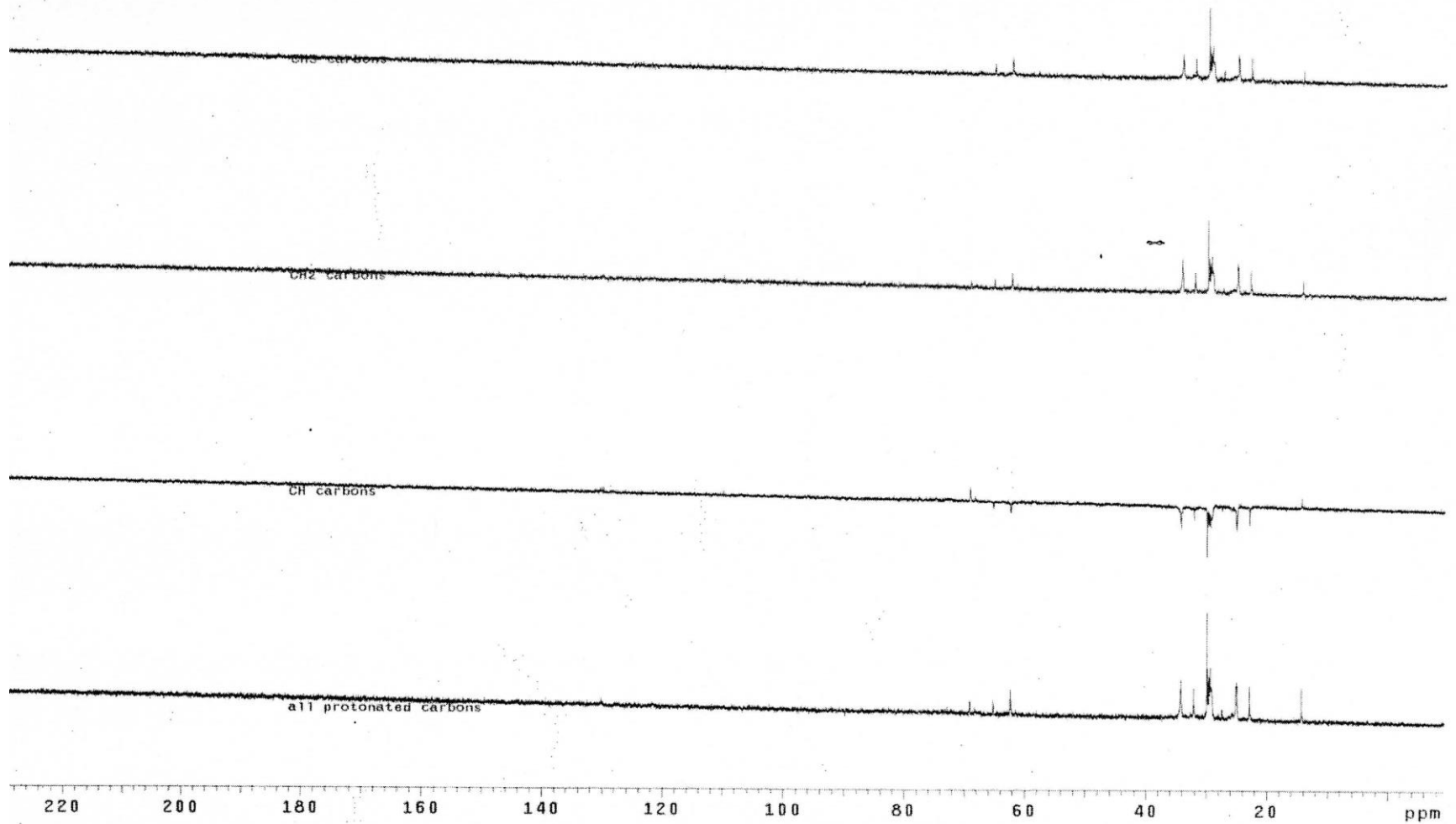


| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|---------|--------|
| 1 | 9824.012 | 130.200 | 75.1 |
| 2 | 9800.706 | 129.891 | 61.2 |



| INDEX | FREQUENCY | PPM | HEIGHT |
|-------|-----------|---------|--------|
| 1 | 13428.635 | 177.973 | 12.8 |
| 2 | 13137.868 | 174.120 | 34.8 |
| 3 | 13095.696 | 173.561 | 72.4 |
| 4 | 13057.963 | 173.081 | 37.2 |
| 5 | 12882.614 | 170.737 | 10.7 |
| 6 | 12308.848 | 163.132 | 11.0 |
| 7 | 11122.475 | 147.409 | 11.8 |
| 8 | 10857.233 | 143.894 | 11.2 |
| 9 | 10730.716 | 142.217 | 11.4 |
| 10 | 10398.887 | 137.619 | 11.3 |
| 11 | 10003.799 | 132.583 | 13.7 |
| 12 | 9840.659 | 130.421 | 20.3 |
| 13 | 9822.902 | 130.185 | 50.1 |
| 14 | 9800.706 | 129.881 | 43.0 |
| 15 | 9691.946 | 128.450 | 12.4 |
| 16 | 8396.739 | 124.537 | 10.8 |
| 17 | 9202.525 | 121.963 | 11.4 |

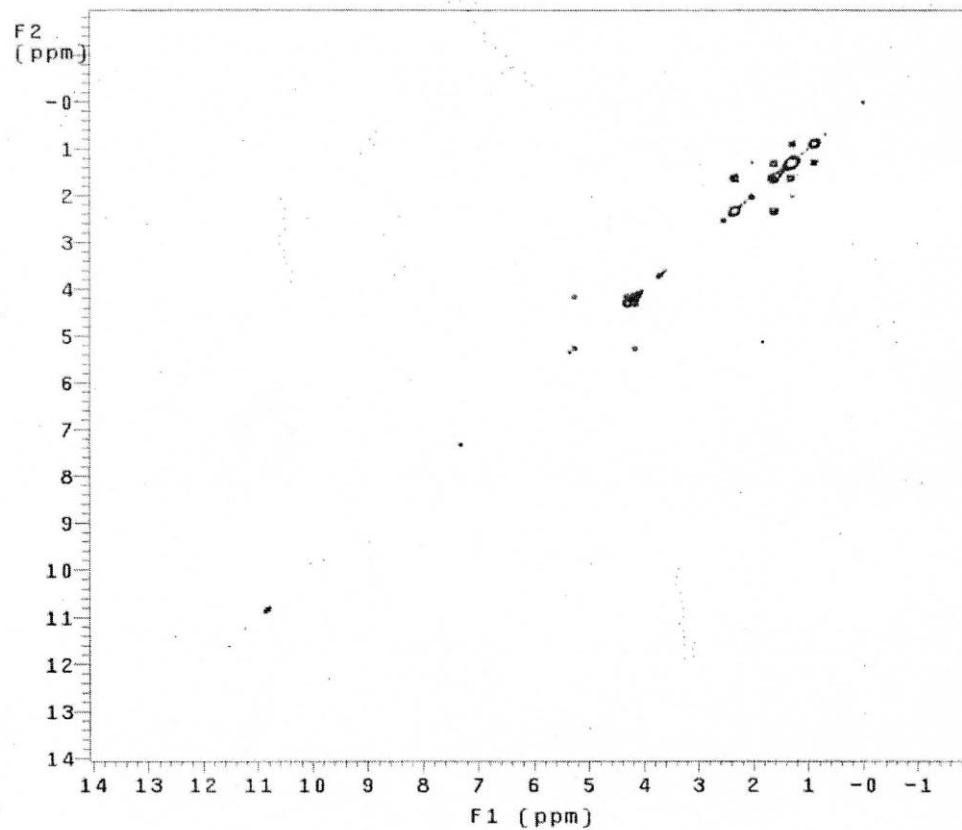
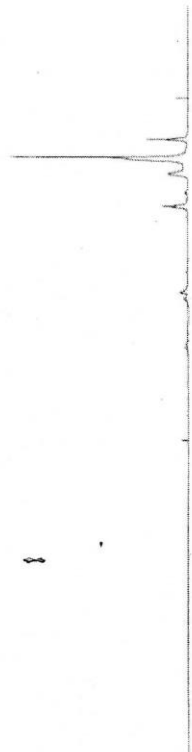




Data saved in:
Coatlicue:/export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Sample directory: vnmr3_00000002
File: COSY

Pulse Sequence: CDSY
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatlicue"

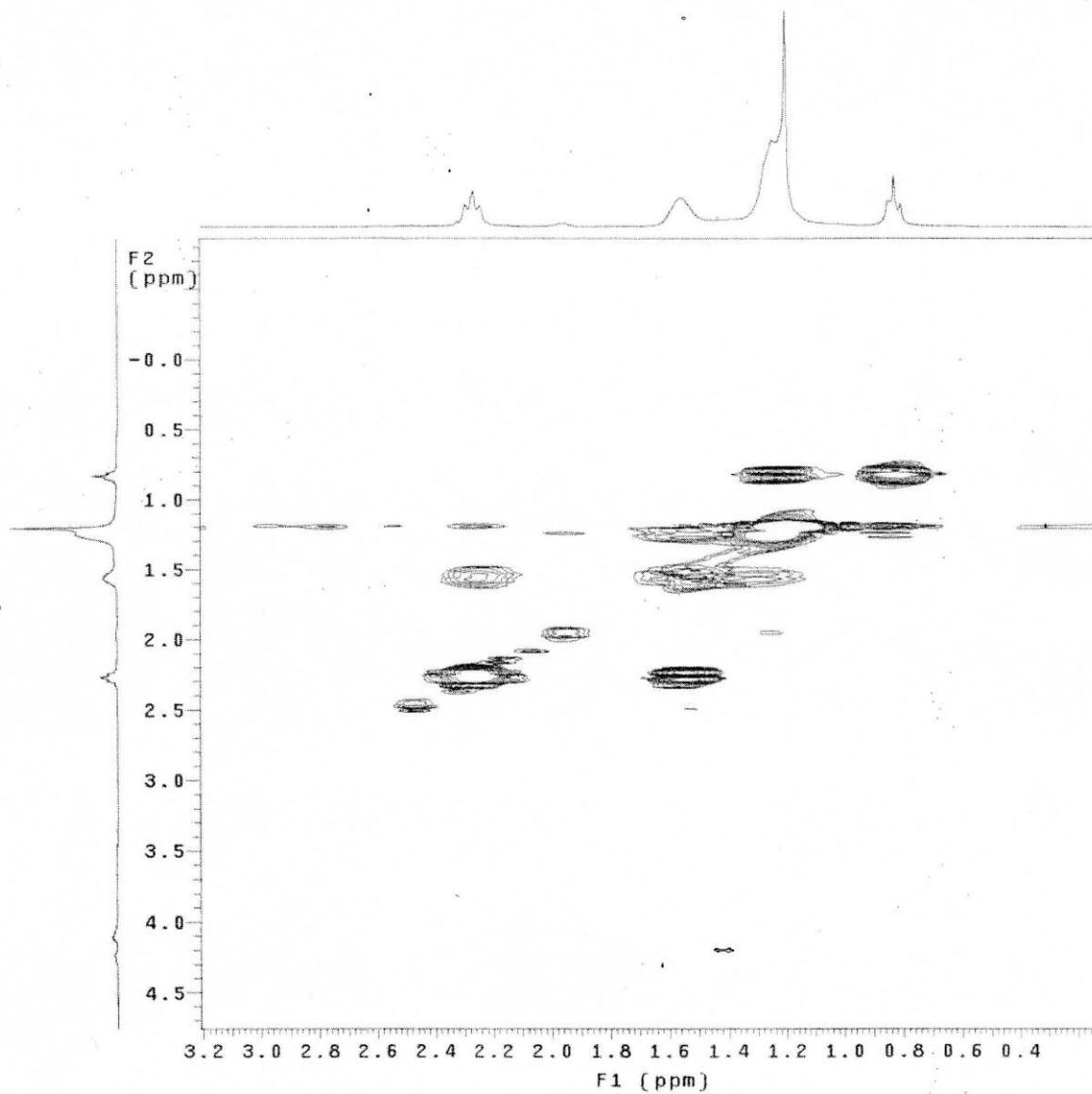
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4800.8 Hz
2D Width 4800.8 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0719848 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.027 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 6 min, 59 sec



Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Sample directory: vnmr3_09240102
File: COSY

Pulse Sequence: COSY
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatllicue"

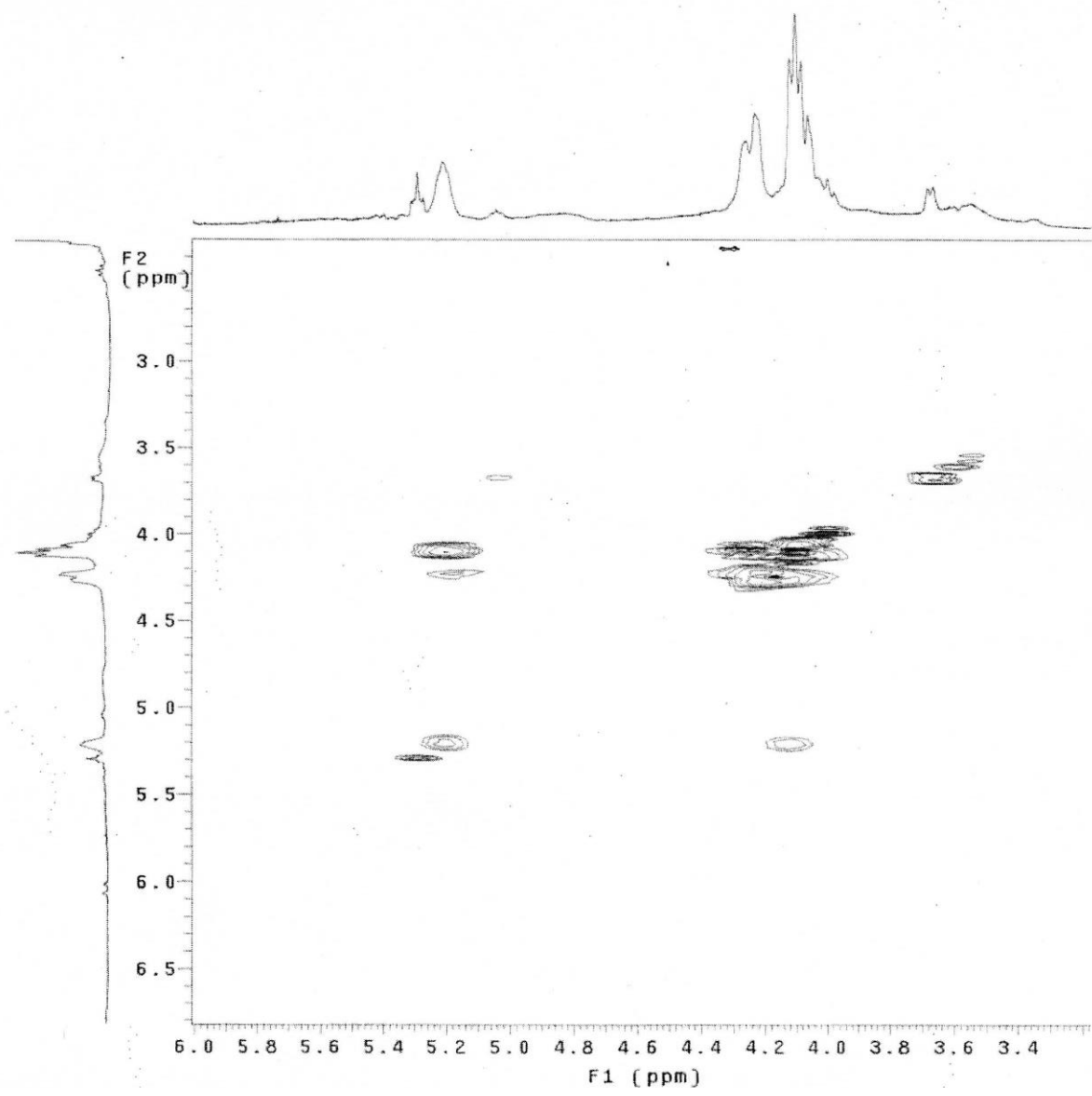
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4800.8 Hz
2D Width 4800.8 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0720002 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.027 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 6 min, 59 sec



Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Sample directory: vnmr3_000012172
File: COSY

Pulse Sequence: COSY
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatlucue"

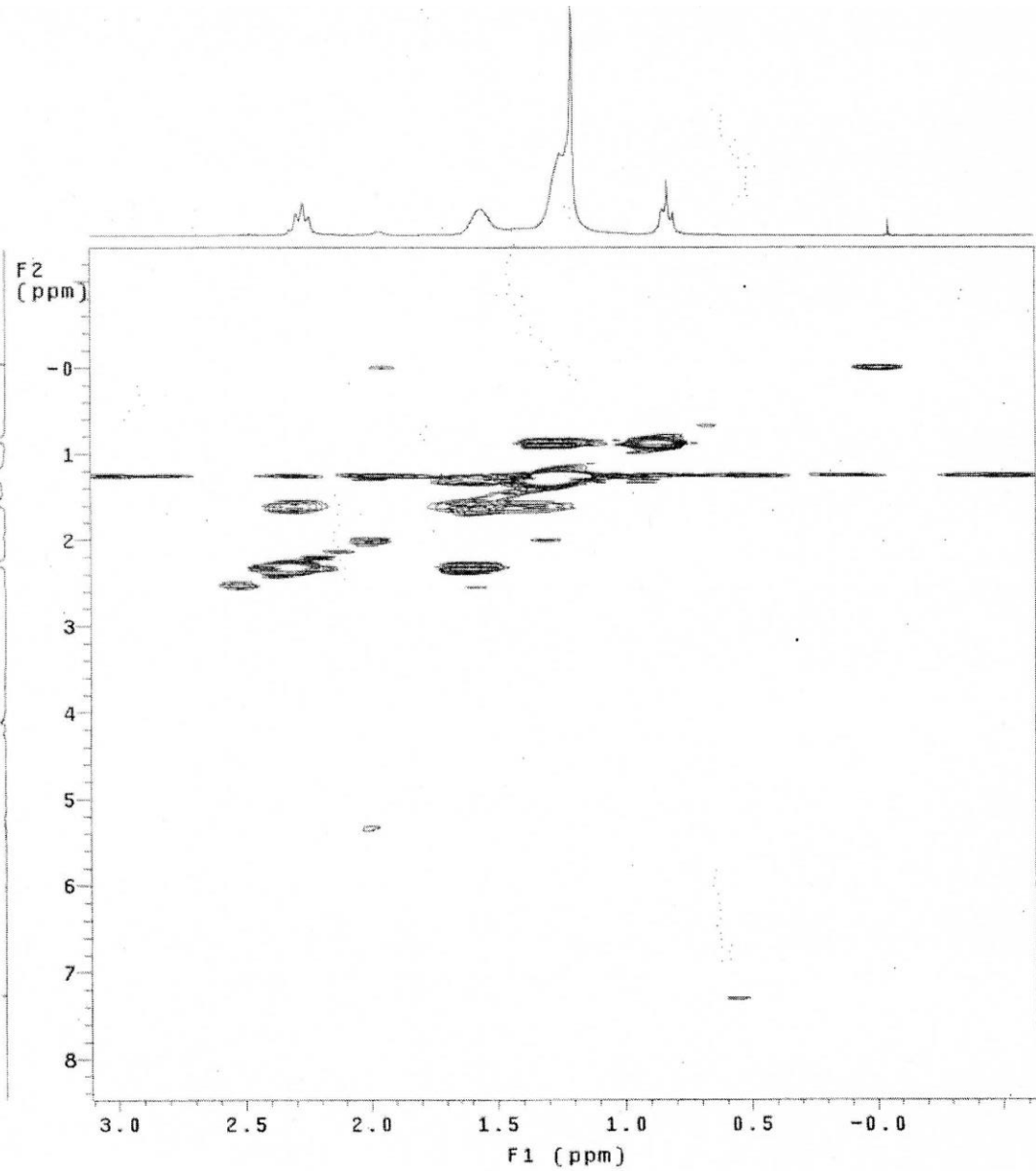
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4800.8 Hz
2D Width 4800.8 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0720002 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.027 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 6 min, 59 sec

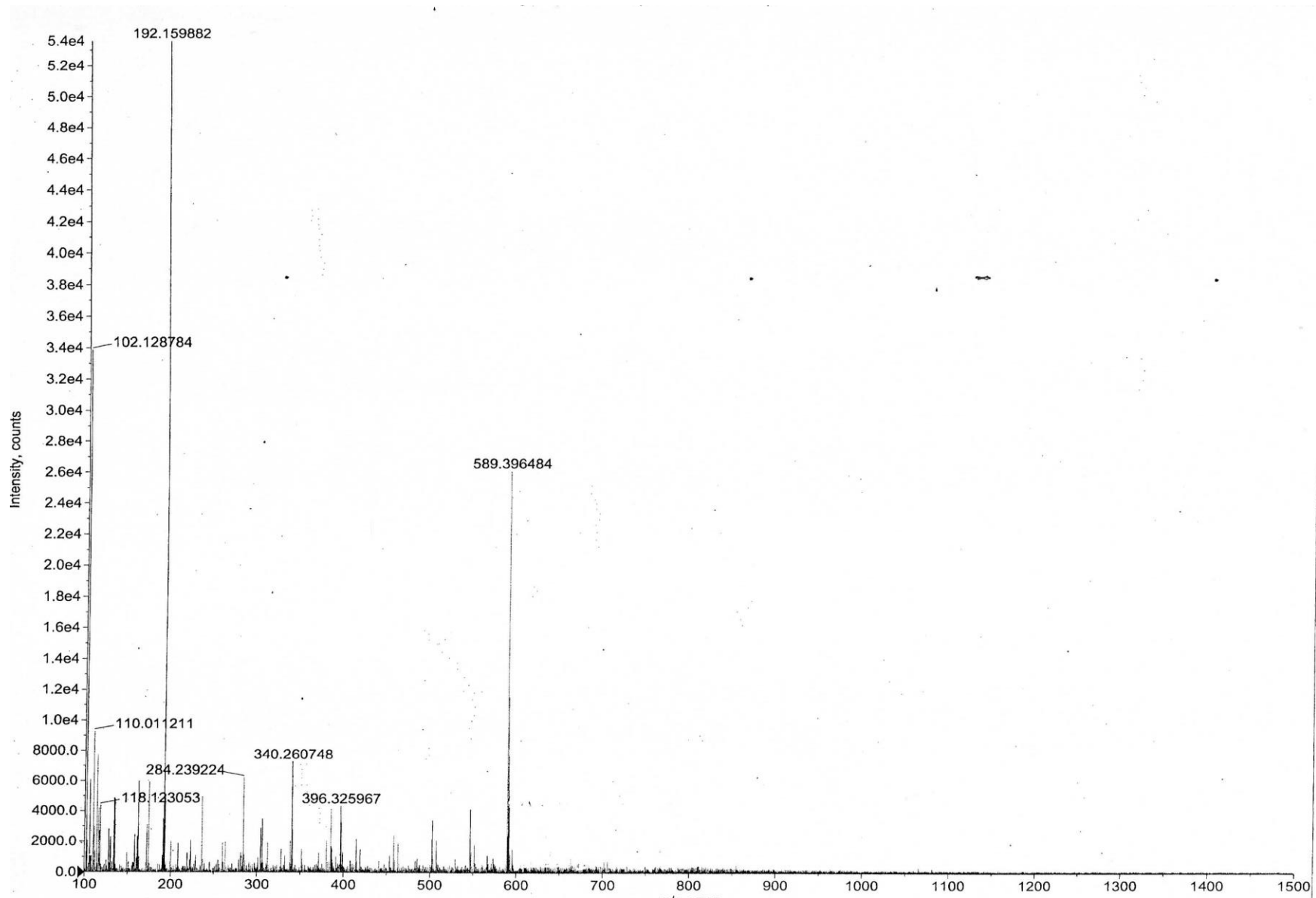


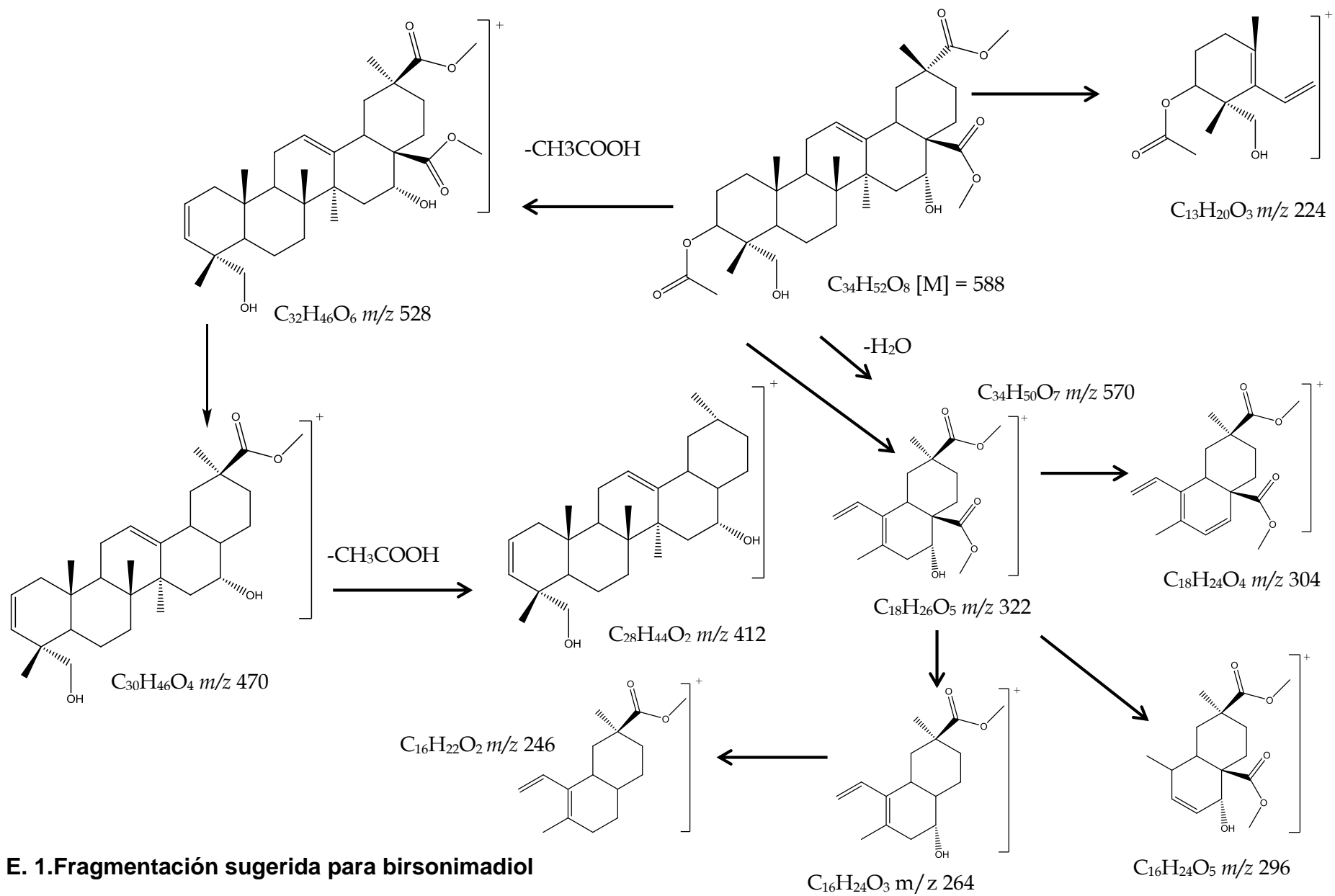
vnmr3_1440000
Data saved in:
Coatlicue:/export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data
Sample directory: vnmr3_1440000
File: COSY

Pulse Sequence: COSY
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-300BB "Coatlicue"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4800.8 Hz
2D Width 4800.8 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 300.0719843 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.027 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 6 min, 59 sec







E. 1. Fragmentación sugerida para birsonimadiol