



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

PRINCIPIOS HIPOGLUCEMIANTES DE *Hydrangea seemannii* (Hydrangeaceae)

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ROCIO MONTSERRAT AGUILAR CRUZ



TUTORA: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
Facultad de Química

Octubre, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal: Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal: Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Secretario: Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano

Lugar donde se realizó la tesis:

Facultad de Química, UNAM, Departamento de Farmacia, Laboratorio 124

Q.F.B. Rocio Montserrat Aguilar Cruz

Dra. Rachel Mata Essayag

Dra. Araceli Pérez Vásquez

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Químicas y a la UNAM, por permitir ampliar mi formación académica.
- Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría (becario 258089).
- Al financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACyT (99395) y a DGAPA-UNAM (IN-212913).
- Agradezco especialmente a la *Dra. Rachel Mata* la oportunidad, la dedicación así como el compromiso en el desarrollo de este trabajo. Gracias.
- Al Dr. Robert Bye del Instituto de Biología (UNAM), por proporcionar el material vegetal para el desarrollo del proyecto.
- Al personal técnico de la USAI (Facultad de Química) por el registro de los espectros de masas, IR y RMN.
- A los miembros del jurado designado, por sus valiosos comentarios y observaciones durante la revisión de este trabajo.
- A la Dra. Araceli Pérez por el apoyo técnico, la dedicación y la asesoría en el desarrollo del proyecto.
- A la Dra. Isabel Rivero por el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
Lista de Cuadros.....	iii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I. ANTECEDENTES.....	5
1.1 <i>Hydrangea seemanii</i>	5
1.2 Generalidades sobre Diabetes Mellitus tipo 2.....	13
1.2.1 <i>Definición, tipos y complicaciones</i>	13
1.2.2 <i>Morbilidad en México y el mundo</i>	15
1.2.3 <i>Diagnos</i>	16
1.2.4 <i>Tratamiento de la diabetes tipo 2</i>	17
II. JUSTIFICACIÓN.....	21
III. HIPÓTESIS.....	23
IV. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivos generales.....	24
3.2 Objetivos particulares.....	24
V. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	25
5.1 Material vegetal.....	25
5.2 Análisis cromatográficos.....	25
5.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	26
5.4 Preparación y fraccionamiento de la infusión de <i>Hydrangea seemanii</i>	26
5.4.1 <i>Aislamiento de camperol (1) a partir de la fracción F14</i>	27
5.4.2 <i>Aislamiento de quercetina (2) a partir de la fracción F16</i>	27
5.4.3 <i>Aislamiento de astragalina (3) a partir de la fracción F4</i>	28
5.4.4 <i>Aislamiento de isoquercetina (4) y del 3-O-β-L-arabinopiranosido de quercetina (5) a partir de la fracción F6</i>	29
5.4.5 <i>Aislamiento de los ácidos 4,5-di-O-cafeoilquínico (9) y 3,5-di-O-cafeoilquínico (10) a partir de la fracción F7</i>	31

5.4.6 Aislamiento del 3-O- β -L-arabinopiranosido de quercetina (5) a partir de la fracción F9.	32
5.4.7 Aislamiento de ácido clorogénico (8), rutina (6) y nicotiflorina (7) a partir de la fracción F3.	34
5.5 Establecimiento del perfil cromatográfico de la especie <i>Hydrangea seemanii</i>	37
5.6 Ensayo para inhibidores de α -glucosidasas.	37
5.7 Ensayo de tolerancia a la sacarosa de la infusión de <i>Hydrangea seemanii</i>	38
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 Efecto antihiper glucémico de la infusión de <i>Hydrangea seemanii</i>	40
6.2 Estudio fitoquímico de la fracción activa de la infusión	42
6.2.1 Caracterización de los compuestos 1 y 3.	46
6.2.2 Caracterización de los compuestos 2, 4, 5 y 6.....	47
6.2.3 Caracterización de los compuestos 8, 9 y 10.....	48
6.3 Establecimiento del perfil cromatográfico mediante CLUE.....	53
6.4 Propiedades hipoglucemiantes y antiheperglucémicas de los compuestos aislados de la infusión de <i>Hydrangea seemanii</i>	56
VII. CONCLUSIONES	63
VIII. BIBLIOGRAFÍA	65
IX. ANEXOS	72

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Compuestos presentes en diferentes especies de <i>Hydrangea</i>	6
Cuadro 2. Niveles de glucosa en plasma en ayuno y durante una prueba de tolerancia a la glucosa en individuos normales y diabéticos de acuerdo a la ADA y la OMS.	17
Cuadro 3. Tipos de hipoglucemiantes orales utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2	20
Cuadro 4. Fraccionamiento del extracto orgánico de la infusión de <i>H. seemannii</i>	27
Cuadro 5. Fraccionamiento de la fracción F6	30
Cuadro 6. Fraccionamiento de la fracción F7	31
Cuadro 7. Fraccionamiento de la fracción F9	33
Cuadro 8. Fraccionamiento de la fracción F3	35
Cuadro 9. Fraccionamiento de la fracción F3-5	35
Cuadro 10. Compuestos aislados a partir de la fracción de AcOEt de la infusión de <i>H. seemannii</i> .	43
Cuadro 11. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de los compuestos 1 y 3 .	50
Cuadro 12. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de los compuestos 2 , 4 , 5 y 6 .	51
Cuadro 13. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de los compuestos 8 , 9 y 10	52
Cuadro 14. Tiempo de retención y λ_{max} de absorción de los compuestos mayoritarios presentes en el perfil cromatográfico.	55
Cuadro 15. Valores de CI_{50} reportados en la literatura para los compuestos 1–10 como inhibidores de α -glucosidasas.	57

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Hydrangea seemanii</i> .	5
Figura 2. <i>Hydrangea seemanii</i> .	6
Figura 3. Algoritmo para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2	19
Figura 4. Preparación y fraccionamiento de la infusión de <i>H. seemanii</i> y separación de camperol (1) y quercetina (2).	28
Figura 5. Aislamiento de astragalina (3) a partir de la fracción secundaria F4.	29
Figura 6. Aislamiento de isoquercetina (4) y del 3- <i>O</i> - β -L-arabinopiranosido de quercetina (5) a partir de la fracción secundaria F6.	30
Figura 7. Aislamiento de los ácidos 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (9) y 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (10) a partir de F7.	32
Figura 8. Aislamiento del 3- <i>O</i> - β -L-arabinopiranosido de quercetina (5) a partir de la fracción F9.	33
Figura 9. Aislamiento de ácido clorogénico (8), rutina (6) y nicotiflorina (7) a partir de la fracción primaria F3.	36
Figura 10. Prueba de tolerancia a la sacarosa de la infusión de <i>H. seemanii</i> en animales normoglucémicos.	41
Figura 11. Prueba de tolerancia a la sacarosa de la infusión de <i>H. seemanii</i> en animales diabéticos.	42
Figura 12. Estructuras moleculares de los compuestos aislados de <i>H. seemanii</i> .	44
Figura 13. Perfil cromatográfico por CLUE de la fracción de AcOEt de la infusión de <i>H. seemanii</i> .	55

Lista de Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADA	American Diabetes Association
AGE	Advanced glycation end-product
AR	Aldosa reductasa
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
CH₂Cl₂	Diclorometano
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CLUE	Cromatografía de líquidos de ultra resolución
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP-IV	Dipeptidilpeptidasa IV
EEM	Error estándar de la media
EM-IE	Espectrometría de masas de impacto electrónico
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición
FID	Federación Internacional de diabetes
GIP	Glucose-dependent insulintropic polipeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HCOOH	Ácido fórmico
HDL	High-density lipoprotein
IDF	International Diabetes Federation
IFG	Impaired fasting glycaemia
IGT	Impaired glucose tolerance
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IR	Infrarrojo
LDL	Low-density lipoprotein
MeOH	Metanol
NA	Adenin nicotidamida

OMS	Organización mundial de la salud
pNPGT	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucopiranosido
POTS	Prueba oral de tolerancia a la sacarosa
PTG	Prueba de tolerancia a la glucosa
RMN	Resonancia magnética nuclear
STZ	Estreptozotocina
TG	Triglicérido
TMS	Tetrametilsilano
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 representa un importante problema de salud a nivel mundial que afecta a más de 371 millones de personas; se le atribuyen 4.8 millones de las muertes ocurridas en el 2012, de las cuales, el 80% se registraron en países de ingresos medios y bajos. En México la diabetes representa también un grave problema sanitario y un gran sector de la población que padece la enfermedad utiliza para su tratamiento tanto la medicina convencional como la tradicional; esto debido en gran medida a la creencia de que los productos naturales son inocuos, además de ser tratamientos más accesibles y económicos. En la actualidad se estima que en México hay alrededor de 500 especies de plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la diabetes tipo 2; sin embargo, para la mayoría de éstas, no existen estudios químicos, farmacológicos ni de calidad que puedan avalar su eficacia y seguridad. Tal es el caso de la especie *Hydrangea seemannii* L. Riley (Hydrangeaceae), de la cual no existen reportes sobre su estudio químico o farmacológico, solamente se conoce su uso tradicional en el tratamiento de la diabetes en el estado de Chihuahua.

Por lo tanto, el presente trabajo describe el efecto hipoglucemiante y antihiper glucémico *in vivo* de la infusión de la planta mediante experimentos de tipo agudo y una prueba oral de tolerancia a la sacarosa (POTS) en ratones normoglucémicos y diabéticos (NA-STZ); en los dos tipos de prueba los resultados fueron satisfactorios. La infusión presentó una disminución significativa ($p < 0.001$) del pico postprandial para todas las dosis ensayadas (31.6, 100 y 316 mg/Kg). En el caso de los ratones normoglucémicos este efecto fue mayor que el de la acarbosa (control positivo) a todas las dosis, mientras que en los diabéticos, el efecto de la dosis de 316 mg/Kg fue comparable a la del control positivo. Estos resultados evidenciaron claramente el efecto antihiper glucémico de la infusión de *H. seemannii* debido a la inhibición de las α -glucosidasas.

Ya que la infusión presentó un buen efecto antihiper glucémico *in vivo* se realizó un ensayo enzimático para evaluar la inhibición de α -glucosidasas de las fracciones primarias de la infusión obtenidas por un proceso de reparto entre agua y AcOEt, en el cual sólo la fracción orgánica inhibió la actividad de las α -glucosidasas de prueba (60% a 1000 ppm; CI_{50} 485.4 \pm 22.4 ppm).

El estudio químico de la infusión de la especie *Hydrangea seemannii* permitió el aislamiento y caracterización de siete flavonoides: camperol (1), quercetina (2), astragalina (3), isoquercetina (4), 3-*O*- β -L-arabinopiranosido de quercetina (5), rutina (6), nicotiflorina (7), y de tres ácidos cafeoilquínicos, ácido clorogénico (8), ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (9) y ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (10). Con la

excepción de la nicotiflorina (**7**) cuya identificación se realizó por co-elución con una muestra auténtica, la caracterización de los demás compuestos se verificó al comparar sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas con las descritas en la literatura.

La presencia de estos compuestos en la planta justifica las propiedades hipoglucemiantes y antihiper glucémicas demostradas; además su caracterización permite responder a la hipótesis de trabajo formulada inicialmente.

También se generó de manera preliminar un perfil cromatográfico del preparado de consumo popular. Éste se obtuvo utilizando un sistema de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia ACQUITY UPLC. De acuerdo con el mismo, el compuesto **10** es el mayoritario en la infusión, seguido por los flavonoides **3-5**.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus is a major health problem worldwide that affects over 371 million people. About 4.8 million of the deaths in 2012 were attributed to this illness, of which 80% were recorded in countries with a medium and low income.

In Mexico, diabetes is also a major health problem and a large section of the population suffering from the disease use both conventional and traditional medicine for its treatment; this is largely due to the belief that natural products are safe; in addition, they are more accessible and affordable treatments. According to a recent review, there are about 500 species of medicinal plants used for the treatment of type 2 diabetes in Mexico; however, for most of these there are no chemical, pharmacological or quality control studies. Therefore their efficacy and chemical composition are unknown. This is the case of the *Hydrangea seemannii* L. Riley (Hydrangeaceae), which is traditionally used for the treatment of diabetes in the state of Chihuahua.

The present study describes the antidiabetic properties of an infusion of *Hydrangea seemannii* L. Riley (Hydrangeaceae). *In vivo* pharmacological testing revealed that the infusion possesses antihyperglycemic and hypoglycemic action in STZ-NA diabetic mice when tested at the doses of (31.6, 100 and 316 mg/kg). Since infusion of *H. seemannii* had a good antihyperglycemic effect *in vivo*, an enzymatic assay was performed to evaluate the inhibition of α -glucosidases. The best effect was attained with the AcOEt fraction (IC_{50} 485.4 \pm 22.4 ppm) resulting from the partition of the infusion between water and AcOEt.

Phytochemical study of the infusion of the plant led to the isolation and purification of ten compounds, kaempferol (1), quercetin (2), astragalin (3), isoquercetin (4), quercetin 3-*O*- β -L-arabinopyranoside (5), rutin (6), nicotiflorin (7), chlorogenic acid (8), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (9) and 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (10).

These compounds possess antihyperglycemic and hypoglycemic properties. Therefore, the infusion represents a good phytotherapeutic agent with active principles having different modes of actions. In addition, the present study provides scientific support of the use of the plant in Mexican folk medicine for the treatment of diabetes.

The chromatographic profile was obtained using the ultra-performance liquid chromatography system ACQUITY UPLC®. According to the chromatographic profile, **10** is the major component of the infusion, followed by flavonoids **3-5**.

I. ANTECEDENTES

1.1 *Hydrangea seemannii*

Hydrangea seemannii L. Ryley (Hydrangeaceae) es una enredadera o arbusto pequeño, de hojas perennes, grandes y dentadas, brillantes de color verde oscuro, florece en verano dando flores grandes y perfumadas, de color blanco crema (Figuras 1 y 2). Crece a una altitud de 1800 a 2300 metros en las barrancas y laderas de la Sierra Madre de Durango, de donde es nativa. De acuerdo a Bye y Linares (2009) la planta se vende en los mercados de Chihuahua para el tratamiento de la diabetes.

A la fecha no existen reportes sobre estudios químicos de esta especie; sin embargo, otras especies del género han sido analizadas químicamente y de acuerdo con esto, los principales metabolitos identificados pertenecen a las categorías de los flavonoides, estilbenoides, cumarinas, fenilisocumarinas, fenildihidroisocumarinas, ftálicas, glucósidos cianogénicos, secoiridoides, alcaloides del tipo de las quinazolininas, ácidos grasos y esteroides. En el Cuadro 1 se resumen los distintos estudios químicos realizados sobre estas plantas.

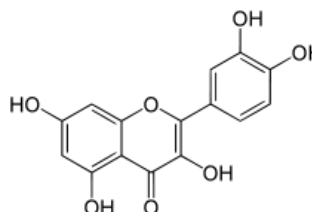
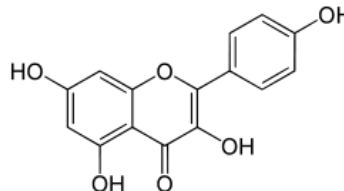
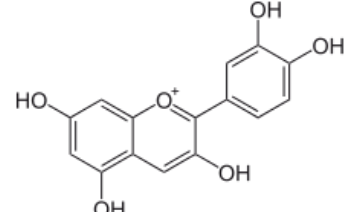


Figura 1. *Hydrangea seemannii*. Fuente. Flickr, flickr.com

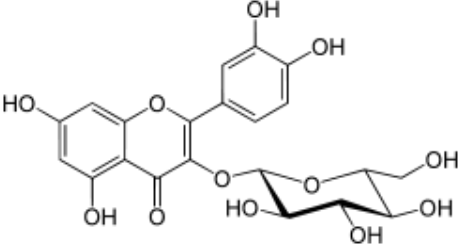
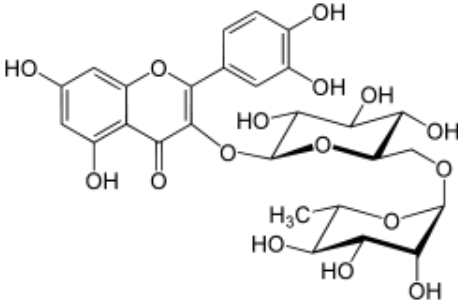
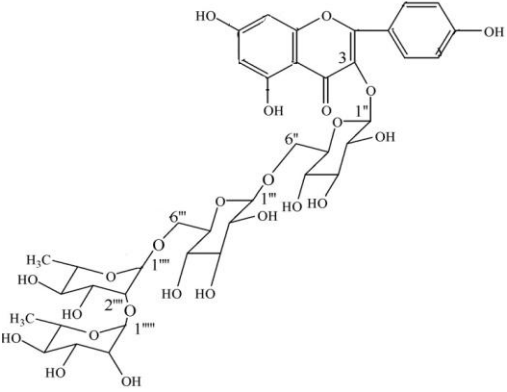


Figura 2. *Hydrangea seemannii*. Fuente. PlantFiles, davesgarden.com

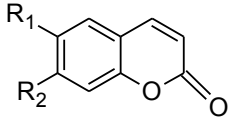
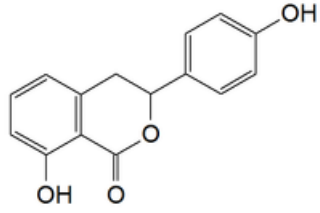
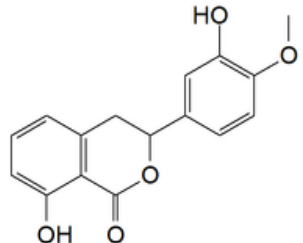
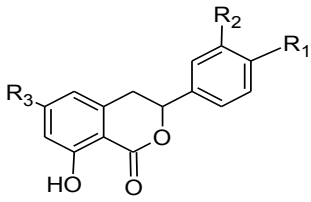
Cuadro 1. Compuestos presentes en diferentes especies de *Hydrangea*

Categoría	Nombre y Estructura	Fuente
Flavonoide	Quercetina 	<i>H. seemannii</i> Riley, <i>H. intergrifolia</i> Hayata, <i>H. macrophylla</i> , <i>H. heteromalia</i> D.Don, <i>H. paniculata</i> Sieb, <i>H. anomala</i> D.Don, <i>H. aspera</i> D.Don, <i>H. arborescens</i> L., <i>H. quercifolia</i> Bartram (Bate-Smith, 1978)
	Camperol 	<i>H. seemannii</i> Riley, <i>H. intergrifolia</i> Hayata, <i>H. macrophylla</i> , <i>H. heteromalia</i> D.Don, <i>H. paniculata</i> Sieb, <i>H. aspera</i> D.Don, <i>H. arborescens</i> L. (Bate-Smith, 1978)
	Cianidina 	<i>H. heteromalia</i> D.Don, <i>H. paniculata</i> Sieb, <i>H. anomala</i> D.Don, <i>H. aspera</i> D.Don, <i>H. quercifolia</i> Bartram (Bate-Smith, 1978)

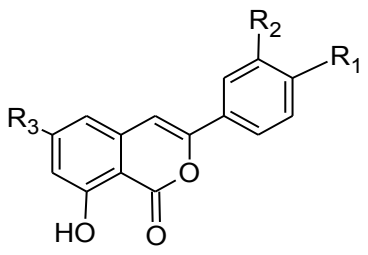
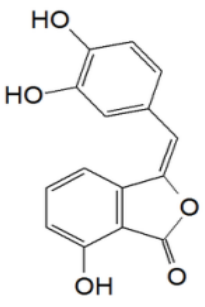
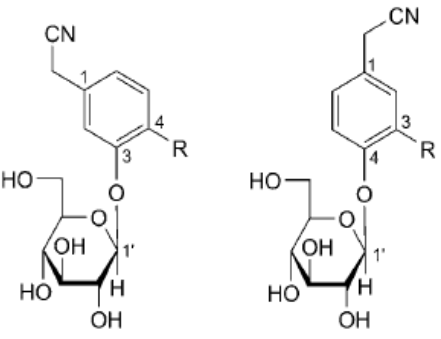
Cuadro 1. Compuestos presentes en diferentes especies de *Hydrangea* (Continuación)

Categoría	Nombre y Estructura	Fuente
Flavonoide	<p style="text-align: center;">Isoquercetina</p> 	<i>H. serrata</i> var. <i>Thunbergii</i> (Yagi et al., 1977)
	<p style="text-align: center;">Rutina</p> 	<i>H. serrata</i> var. <i>Thunbergii</i> (Yagi et al., 1977)
	Procianidina tipo A no caracterizada	<i>H. heteromalia</i> D.Don, <i>H. aspera</i> D.Don, subsp. <i>aspera</i> , subsp. <i>sargentiana</i> (Rehder) (Bate-Smith, 1978)
	<p style="text-align: center;">Glucosidos de camperol</p> 	<i>H. macrophylla</i> var. <i>Thunbergii</i> (Sheng Feng, et al., 2010)

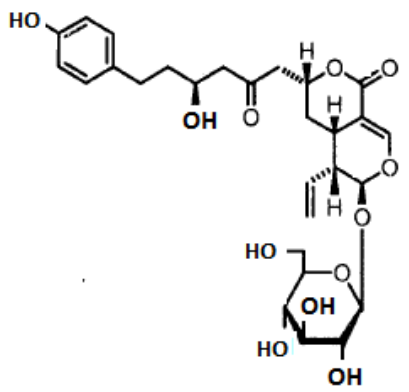
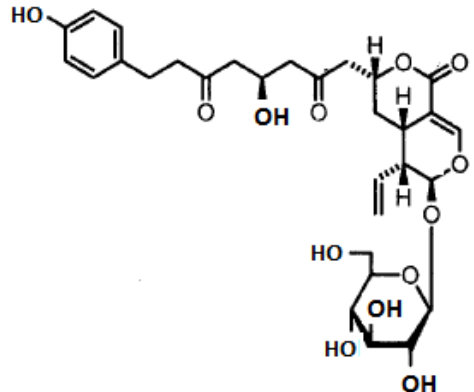
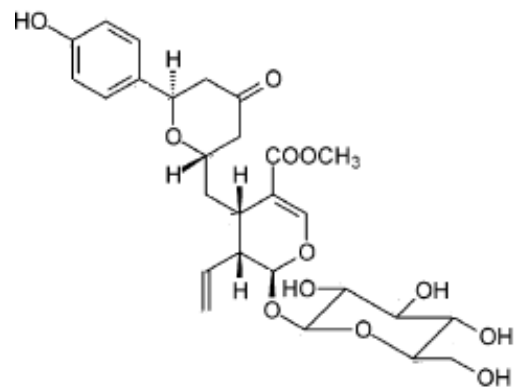
Cuadro 1. Compuestos presentes en diferentes especies de *Hydrangea* (Continuación)

Categoría	Nombre y Estructura	Fuente
Cumarina	 <p>6-Hidroxicumarina: R₁=OH, R₂= H Umbelliferona: R₁=H, R₂= OH Skimina: R₁=H, R₂= O-β-Glc</p>	<p><i>H. serrata</i> var. <i>Thunbergii</i> (Yagi et al., 1977) <i>H. chinensis</i> (Ashraf Taha, et al., 2003)</p>
	<p>Hidrangenol</p> 	<p><i>H. serrata</i> var. <i>Thunbergii</i> (Yagi et al., 1977) <i>H. macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> (Matsuda, et al., 1999; Zhang, et al, 2007)</p>
	<p>Filodulcina</p> 	<p><i>H. serrata</i> var. <i>thunbergii</i> (Yagi et al., 1977) <i>H. macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> (Matsuda, et al., 1999; Zhang, et al, 2007)</p>
Fenildihidroisocumarina	<p>Thunberginol C, D, E y G</p>  <p>Thunberginol C: R₁=OH; R₂=H; R₃=OH Thunberginol D: R₁=OH; R₂=OH; R₃=OH Thunberginol E: R₁=OCH₃; R₂=OH; R₃=OH Thunberginol G: R₁=OH; R₂=OH; R₃=H</p>	<p><i>H. macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> (Yoshikawa, et al., 1992; Zhang, et al, 2007)</p>

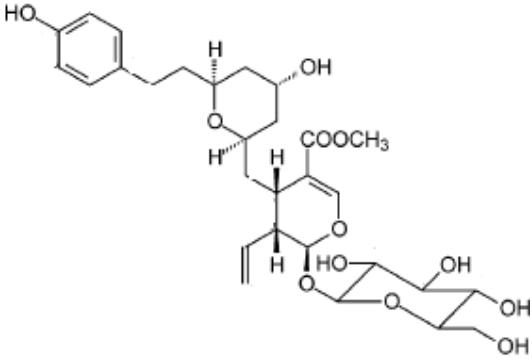
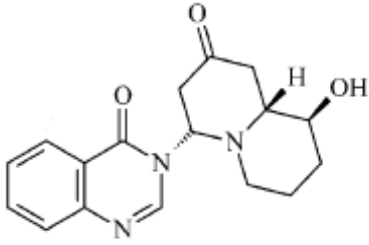
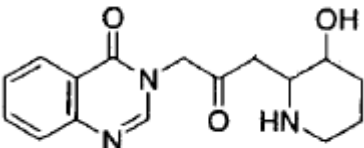
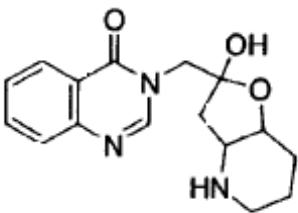
Cuadro 1. Compuestos presentes en diferentes especies de *Hydrangea* (Continuación)

Categoría	Nombre y Estructura	Fuente
Fenilisocumarina	<p style="text-align: center;">Thunberginol A Y B</p>  <p>Thunberginol A: R₁=OH; R₂=OH; R₃=H Thunberginol B: R₁=OH; R₂=OH; R₃=OH</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> (Matsuda, et al., 2008; Matsuda, et al., 1999; Yamahara, et al., 1995; Matsuda, et al., 1998; Zhang, et al, 2007)</p>
Ftalida	<p style="text-align: center;">Thunberginol F</p> 	<p style="text-align: center;"><i>H. macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> (Matsuda, et al., 1999; Zhang, et al, 2007)</p>
Glucósido cianogénico	<p style="text-align: center;">Hidranitrilósido A₁, A₂, B₁ y B₂</p>  <p>Hidranitrilósido A₁: R(4)= OH Hidranitrilósido A₂: R(4)= OCH₃ Hidranitrilósido B₁: R(3)= OCH₃ Hidranitrilósido B₂: R(3)= H</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> (Wang, et al., 2011)</p>

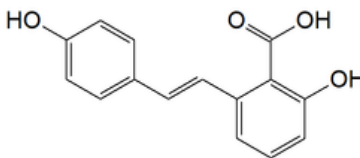
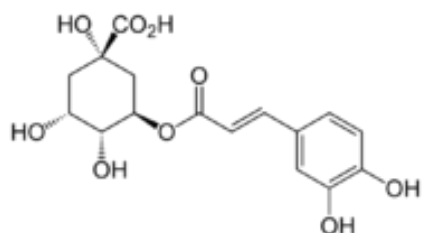
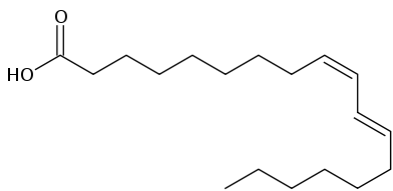
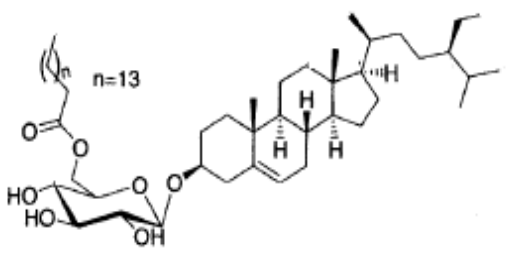
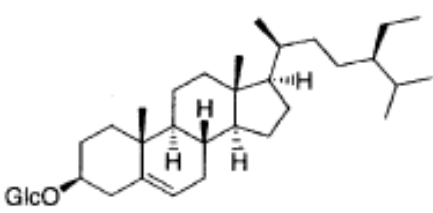
Cuadro 1. Compuestos presentes en diferentes especies de *Hydrangea* (Continuación)

Categoría	Nombre y Estructura	Fuente
	<p style="text-align: center;">Hidramacrósido A</p> 	<p style="text-align: center;"><i>H. macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> (Matsuda, Shimoda, Uemura, Ueda, & Yamahara, 1999)</p>
Secoiridoide	<p style="text-align: center;">Hidramacrósido B</p> 	<p style="text-align: center;"><i>H. macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> (Matsuda, Shimoda, Uemura, Ueda, & Yamahara, 1999)</p>
	<p style="text-align: center;">Hidracósido A</p> 	<p style="text-align: center;"><i>H. chinensis</i> (Fang-Rong, et al., 2003)</p>

Cuadro 1. Compuestos presentes en diferentes especies de *Hydrangea* (Continuación)

Categoría	Nombre y Estructura	Fuente
Secoiridoide	<p style="text-align: center;">Hydrangenósido E</p> 	<i>H. chinensis</i> (Fang-Rong, et al., 2003)
	<p style="text-align: center;">Hidraquina A</p> 	<i>H. chinensis</i> (Fang-Rong, et al., 2003)
Alcaloide	<p style="text-align: center;">(+)-Febrifugina</p> 	<i>H. chinensis</i> (Ashraf Taha, et al., 2003)
	<p style="text-align: center;">Isofebrifugina</p> 	<i>H. chinensis</i> (Ashraf Taha, et al., 2003)

Cuadro 1. Compuestos presentes en diferentes especies de *Hydrangea* (Continuación)

Categoría	Nombre y Estructura	Fuente
Estilbenoide	Ácido hydrángico y derivados 	<i>H. macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> (Zhang, et al., 2009; Zhang, et al, 2007)
Ácidos hydroxicinámicos	Ácido clorogénico 	<i>H. serrata</i> var. <i>Thunbergii</i> (Yagi et. al., 1977)
Ácidos grasos	Ácido linoleico 	<i>H. chinensis</i> (Ashraf Taha, et al., 2003)
Esteroide	β -Sitosterol-3-O- β -D-(6'-hexadecanoil)-glucopiranosido 	<i>H. chinensis</i> (Ashraf Taha, et al., 2003)
	β -Sitosterol-3-O- β -D-glucósido 	<i>H. chinensis</i> (Ashraf Taha, et al., 2003)

Desde el punto de vista farmacológico, Brindis (2011) demostró tanto la inocuidad como el potencial antidiabético de la planta. Así, el extracto íntegro (CH_2Cl_2 -MeOH 1:1) y la infusión de *H. seemannii* presentaron una toxicidad aguda mayor a 5 g/Kg de peso en el método de Lorke, confirmando su seguridad. Por otra parte, provocaron una disminución de los niveles de glucosa en sangre en ratones diabéticos a la dosis de 100 mg/Kg. En los experimentos de tolerancia a la glucosa en animales diabéticos, el extracto orgánico de *H. seemannii* a las dosis de 100 y 500 mg/kg inhibió de manera importante y significativa la aparición del pico postprandial, en tanto que la infusión fue activa a las dosis de 31.6 y 56.2 mg/Kg. También se realizaron experimentos de tolerancia a la sacarosa con el extracto orgánico para determinar si el mecanismo de acción antihiper glucemiante de esta especie estaba relacionado con una inhibición de las α -glucosidasas intestinales. Los resultados indicaron que en animales diabéticos a las dosis de 31.2 y 100 mg/kg, el extracto ocasionó una disminución significativa de los niveles de glucosa. Por lo tanto, el extracto de *H. seemannii* inhibe las α -glucosidasas en los animales diabéticos. En esta ocasión no se evaluó la tolerancia a la sacarosa de la infusión. Dado que la infusión es el preparado utilizado en las prácticas médicas populares, se decidió fraccionarla de manera preliminar mediante un proceso de reparto entre agua y acetato de etilo. Los resultados indicaron que a las dosis ensayadas (31.6, 56.2 y 100 mg/Kg) la fracción orgánica presentó un efecto hipoglucemiante comparable al de la glibenclamida en ratones diabéticos. En los experimentos de tolerancia a la glucosa sin embargo, ninguna de las fracciones mostró una actividad importante en ratones diabéticos a las tres dosis ensayadas. En esa ocasión, por falta de material tampoco se realizaron los experimentos de tolerancia a la sacarosa de las fracciones. Sin embargo, el conjunto de resultados obtenidos por Brindis evidenció claramente el potencial de la planta como fuente de agentes hipoglucemiantes y antihiper glucémicos. Tampoco en esa ocasión se estableció la naturaleza de los principios activos.

1.2 Generalidades sobre Diabetes Mellitus tipo 2

1.2.1 Definición, tipos y complicaciones

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica metabólica, caracterizada por un incremento importante del nivel de glucosa en la sangre, condición conocida como

hiperglucemia, misma que surge como consecuencia de la deficiencia en los mecanismos que hacen posible, o que regulan la utilización de la glucosa en el organismo (Guillén González, 2002).

Existen varias categorías de diabetes (tipo 1, tipo 2, gestacional, y otras), pero las más comunes son la tipo 1 y la tipo 2 (DMT2). La diabetes tipo 1 se caracteriza por la destrucción de las células β del páncreas que usualmente conduce a la deficiencia absoluta de insulina; esta categoría esta subdividida en dos tipos principales que son: la **1a** o autoinmune (90% de los casos en Europa y Norteamérica) y la **1b** o idiopática donde no hay evidencia de autoinmunidad (Bilous & Donnelly, 2010). Sus síntomas pueden aparecer de forma súbita y consisten, entre otros, en excreción excesiva de orina, sed, hambre constante, pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio (OMS,2013; Bilous & Donnelly, 2010).

La DMT2 es causada por una combinación de resistencia a la insulina y una disfunción en la secreción de la misma (Bilous & Donnelly, 2010). Representa el 90% de los casos mundiales y esto se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física; los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes de tipo 1, pero a menudo menos intensos (OMS, 2013). La diabetes gestacional es un estado hiperglucémico que aparece o se detecta por vez primera durante el embarazo; sus síntomas son similares a los de la diabetes de tipo 2, pero suele diagnosticarse mediante las pruebas prenatales, mas que porque el paciente refiera síntomas (OMS, 2013). Este tipo de diabetes se asocia con complicaciones en el período inmediatamente antes y después del nacimiento; por lo general desaparece poco después del embarazo pero las mujeres y sus hijos tienen un mayor riesgo de desarrollar DMT2 en el futuro (IDF, 2013).

Otros tipos de diabetes son provocados por un gran grupo de condiciones, que incluyen defectos genéticos en la secreción de insulina (e.g. insulinopatías) y su acción (e.g. síndromes de resistencia severa a la insulina), pancreatitis y otros desordenes exocrinos, tumores secretores de hormonas y el síndrome de Cushing; algunos casos de diabetes pueden ser causados también por la administración de fármacos como glucocorticoides (Bilous & Donnelly, 2010).

La DMT2 es una condición crónica que requiere de vigilancia y control estrechos. Sin el manejo apropiado pueden conducir a niveles muy altos de azúcar en la sangre, lo cual puede resultar en daño a largo plazo de varios órganos y tejidos (IDF, 2013). Las complicaciones más importantes de la DMT2 son de tipo microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía),

macrovasculares (enfermedades cardiovasculares, como ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares y la insuficiencia en el flujo de sangre a las piernas) y la microangiopatía. Alrededor de 50% de los pacientes diabéticos mueren a causa de las complicaciones macrovasculares, principalmente de cardiopatía y accidente cerebrovascular. La neuropatía de los pies combinada con la reducción del flujo sanguíneo incrementan el riesgo de úlceras en los pies y, en última instancia, de amputación. La retinopatía diabética es una causa importante de ceguera, al cabo de 15 años con diabetes, aproximadamente el 2% de los pacientes presentan ceguera total, y un 10% sufren un deterioro grave de la visión. En cuanto a la nefropatía, ésta es una causa importante de insuficiencia renal, alrededor de un 10 a 20% de los pacientes con diabetes mueren por esta complicación y, en los países desarrollados, representa una de las causas principales de diálisis y trasplante de riñón (OMS, 2013).

1.2.2 Morbilidad en México y el mundo

La DMT2 es un padecimiento cada vez más común, y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013) afecta a más de 347 millones de personas; sin embargo, la Federación Internacional de Diabetes (FID) publicó en el año 2012 que la cifra de personas con diabetes es de más de 371 millones, sin tomar en cuenta que la mitad de las personas que la padecen no son conscientes de su condición. Se espera que para el 2030 haya un incremento del 69% en el número de adultos con DMT2 en los países en vías de desarrollo y un 20% en los países desarrollados. El número de fallecimientos atribuidos a la DMT2, según la FID, fue de 4.8 millones y la mayoría ocurrieron en personas con menos de 60 años (Shaw, et al., 2010; IDF, 2013). Cabe mencionar que más del 80% de las muertes que se registraron por diabetes ocurrieron en los países de ingresos medios y bajos, entre los que se encuentra México (OMS, 2013).

En el caso específico de México, el INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) reportó que en el 2008 hubo una incidencia de 387.4 millones de personas con diabetes, de donde el 95.9% de los casos fueron de DMT2 y se presentaron más en mujeres (53.3%) que en hombres (46.7%); la tasa de mortalidad observada por DMT2 en ese año fue de 70.9 por cada 100 mil habitantes, de los cuales siete de cada diez murió antes de los 75 años (INEGI, 2013).

En la encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT, 2012) se reportó un incremento en la proporción de adultos con diagnóstico previo de DMT2 (9.2%), con respecto a la proporción reportada en el 2000 (5.8%) y 2006 (7%). Estas estadísticas son indicativas del problema que representa la DMT2 en México. La ENSANUT 2012 reveló también que entre las personas con diagnóstico previo de DMT2, el 80% recibe tratamiento médico para su control, cerca del 13% de los pacientes señaló estar recibiendo insulina, ya sea como único tratamiento o en combinación con fármacos orales, mientras que un 72.5% reportó estar recibiendo solo tratamiento oral. En lo que se refiere a las complicaciones presentadas por los pacientes diabéticos, la más señalada en la ENSANUT 2012 fue la visión disminuida (47.6%); también se reportaron otras como daño a la retina (13.9%) y pérdida de la vista (6.6%); la presencia de úlceras ocurrió en 7.2% de los pacientes y un 2.9% indicó haber padecido un coma diabético (ENSANUT, 2012).

1.2.3 *Diagnosis*

La diabetes mellitus se diagnostica usualmente al identificar un estado de hiperglucemia crónica (Bilous & Donnelly, 2010). De acuerdo a la OMS y la Asociación Americana de Diabetes (ADA), un individuo se considera diabético (Cuadro 2) si el nivel de glucosa plasmática en ayunas es de 7 mmol/L (126 mg/dL) o superior, o bien, si el nivel de azúcar en sangre es de 11.1 mmol/L (200 mg/L) a las dos horas de la ingesta de una carga de glucosa durante una prueba de tolerancia a este carbohidrato (PTG) (WHO, 2006). Cabe mencionar que al inicio de la enfermedad los pacientes presentan etapas metabólicas intermedias entre la homeostasis normal de la glucosa y la DMT2, que constituyen factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad y problemas cardiovasculares; estas se conocen como etapas intermedias de hiperglucemia o prediabetes. En esta condición la tolerancia a la glucosa (impaired glucose tolerance, IGT) y los niveles de glucosa en ayuno (impaired fasting glycaemia, IFG) se encuentran alterados (Cuadro 2; Bilous & Donnelly, 2010); en el primer caso el nivel de glucosa plasmática se encuentra en un rango entre 7.8-11.0 mmol/L (140-200 mg/dL) dos horas después de una administración por vía oral de una carga de 75 gramos de glucosa. En relación a la alteración de la glucemia en ayunas los niveles del carbohidrato se encuentran entre 6.1 y 6.9 mmol/L (110-126 mg/dL).

Cuadro 2. Niveles de glucosa en plasma en ayuno y durante una prueba de tolerancia a la glucosa en individuos normales y diabéticos de acuerdo a la ADA y la OMS (modificado de Bilous & Donnelly, 2010)

	Muestra de sangre		
	Plasma	Capilar	Total
Glucosa sanguínea en ayunas			
Normal	<6.1	<5.6	<5.6
Alteración de la glucemia en ayuno	6.1-6.9	5.6-6.0	5.6-6.0
Diabetes	≥ 7.0	≥6.1	≥6.1
Glucosa sanguínea a las 2 h			
Normal	<7.8	<7.8	<6.7
Deterioro de la tolerancia a la glucosa	7.8-11.0	7.8-11.0	6.7-9.9
Diabetes	≥ 11.1	≥11.1	≥10.0

1.2.4 Tratamiento de la diabetes tipo 2

Actualmente no hay cura para la diabetes, sin embargo existen diversos tratamientos que ayudan a normalizar los niveles de glucosa en la sangre, con lo cual se reduce el riesgo de desarrollar algunas de las complicaciones (nefropatía, retinopatía y neuropatía) debidas a este padecimiento; sin embargo, la corrección de la hiperglucemia desempeña un papel secundario en la prevención de las complicaciones macrovasculares, ya que su aparición está determinada por otros factores como la concentración de los lípidos en la sangre, la presión arterial y el consumo de tabaco, así que corregir todos los factores que intervienen en el desarrollo de las mismas es de suma importancia; por esta razón es recomendable hacer ejercicio, seguir una dieta adecuada, dejar de fumar, cuidar sistemáticamente los pies y prevenir y tratar oportunamente los padecimientos infecciosos. De manera que el tratamiento de la diabetes es mucho más que la simple corrección del nivel de glucosa en la sangre, es una suma de intervenciones y de cambios en el estilo de vida (Aguilar Salinas, 2002).

Cuando la dieta y el ejercicio no son suficientes para evitar el desarrollo de complicaciones por DMT2, es necesario el empleo de tratamientos farmacológicos, que incluyen, el uso de

hipoglucemiantes orales (Cuadro 3), solos o en combinación, para reducir los niveles de azúcar en la sangre; medicamentos hipolipemiantes, especialmente para reducir los niveles de colesterol-LDL; medicamentos antihipertensivos; aspirina en dosis bajas para reducir el riesgo de trombosis; así como insulina, en etapas más avanzadas de la enfermedad (Haddad, et al., 2012).

El criterio para la selección del tratamiento adecuado debe tomar en cuenta el tiempo de evolución de la enfermedad, el peso del paciente y la magnitud de la hiperglucemia (Aguilar Salinas, 2002). Así que, usualmente, el tratamiento farmacológico para los pacientes diagnosticados con diabetes tipo 2 sigue el algoritmo mostrado en la Figura 3.

Actualmente se desarrollan fármacos hipoglucemiantes relacionados con las incretinas; que son hormonas pepticas gastrointestinales que actúan principalmente en las células pancreáticas, de las cuales las especies predominantes de son GLP-1 (Glucagón-like Peptide-1) y GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide); éstas retrasan el vaciado gástrico, incrementan la secreción de insulina inducida por glucosa y estimulan la proliferación de células beta. Las incretinas son secretadas por células intestinales y degradadas rápidamente por la dipeptidilpeptidasa IV (DPP-4), enzima que se encuentra en la sangre. Los dos tipos de fármacos relacionados con las incretinas más importantes son: los incretino-miméticos resistentes a la degradación como la exenatida y los inhibidores de DPP-4 como la sitagliptina.

Además del gran número de agentes terapéuticos que se han introducido para el tratamiento de la DM2, existen muchos compuestos nuevos que se encuentran en diferentes etapas de desarrollo. En este sentido, diversos estudios etnobotánicos han demostrado el potencial antidiabético *per se* de varias plantas medicinales utilizadas ampliamente de manera tradicional para el tratamiento de la diabetes, o bien, su potencial como modelo para desarrollar fármacos con diferentes mecanismos de acción (Israili, 2011). Tal es el caso de los inhibidores de α -glucosidasas, desde el descubrimiento de la acarbosa, la investigación de los productos naturales de origen vegetal y microbiano como una fuente potencial valiosa para el descubrimiento de nuevos inhibidores de estas enzimas se ha intensificado (Shobana *et al.*, 2009).

Los inhibidores de α -glucosidasas de origen natural más importantes se clasifican en disacáridos, iminoazúcares, alcaloides polihidroxilados (incluyendo piperidinas, pirrolidinas, indolizidinas y nortropanos), aminociclitoles, ciclitoles insaturados, tioazúcares y flavonoides

(incluyendo las antocianinas) entre otros (Borges de Melo *et al.*, 2006; Matsui *et al.*, 2006). Los inhibidores de α -glucosidasas más antiguos son los dos aminociclitolos obtenidos a partir del medio de cultivo del actinomiceto *Actinoplanes* SE-50, acarbosa (Precosa[®]) y la voglibosa (Basen[®]), los cuales son usados solos o en combinación con otros antihiper glucemiantes, o bien con hipoglucemiantes orales o insulina (Matsui, *et al.*, 2006).

Actualmente los principales representantes de este grupo son los productos naturales miglitol y la acarbosa; esta última inhibe de manera competitiva reversible a las α -glucosidasas, lo cual provoca una disminución en la glucemia posprandrial tanto en animales de experimentación como en personas sanas y diabéticas.

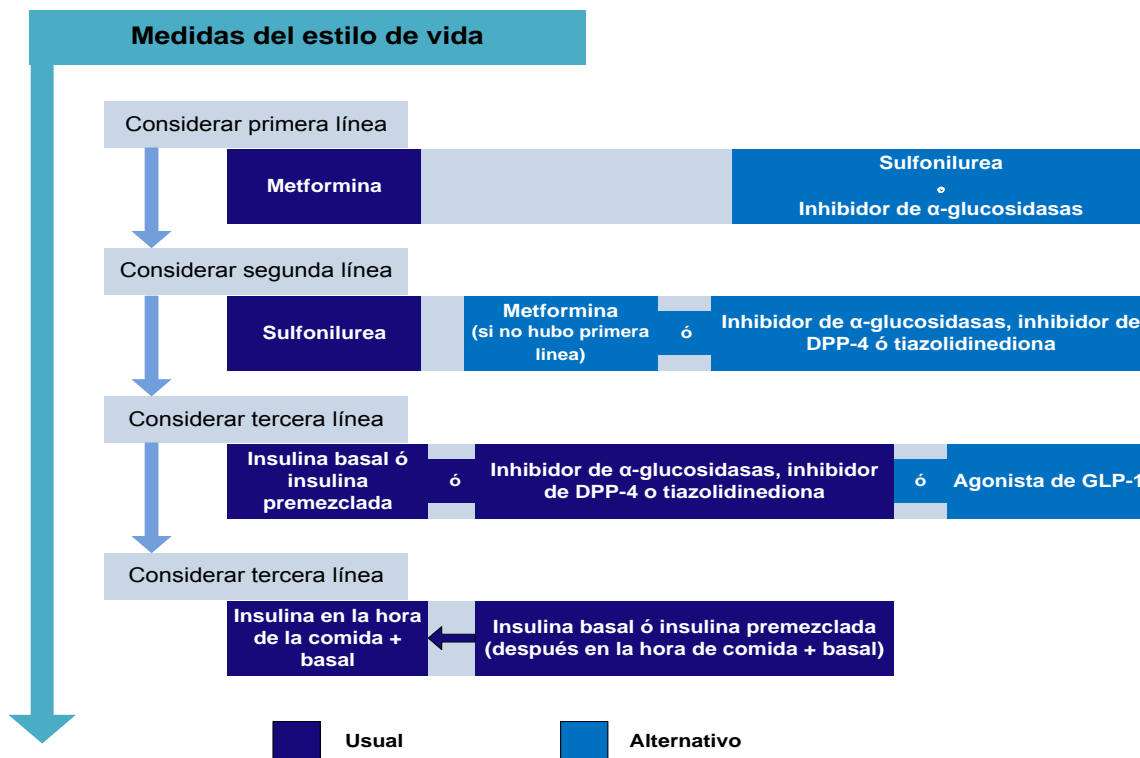


Figura 3. Algoritmo para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (modificado de IDF, 2013).

Cuadro 3. Tipos de hipoglucemiantes orales utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2

Tipos de hipoglucemiantes orales	Ejemplos	Mecanismo de acción
Sulfonilureas	Glibenclamida Tolbutamida Glimepirida	Reducen la permeabilidad al K^+ de las células β a través del bloqueo de los canales K_{ATP} , lo que provoca despolarización, entrada de Ca^{+} y secreción de insulina.
Biguanidas	Metformina Fenformina	Aumenta la captación y utilización de la glucosa por el músculo esquelético y disminuyen su síntesis hepática.
Tiazolidinedionas	Pioglitazona Rosiglitazona	Se unen al receptor nuclear $PPAR\gamma$ que se encuentra principalmente en el tejido adiposo; este interviene en la diferenciación de los adipositos, incrementa la lipogenia y estimula la captación de ácidos grasos y glucosa.
Meglitinidos	Repaglinida	Actúan, al igual que las sulfonilureas, bloqueando el receptor de sulfonilureas de los canales K_{ATP} de la membrana de las células β pancreáticas, estimulando la secreción de insulina.
Inhibidores de SGLT-2	Dapagliflozina	Inhibe el transportador de sodio de tipo 2 en el riñón, favoreciendo la excreción de la glucosa.
Inhibidores de la α-glucosidasa	Acarbosa Miglitol	Inhiben la enzima α -glucosidasa en el intestino disminuyendo la absorción de los carbohidratos.

Fuente, Goodman and Gilman's, 2007; Haddad, et al., 2012.

II. JUSTIFICACIÓN

En México las plantas medicinales han constituido, desde épocas precolombinas, el recurso más importante con el que cuenta la población para procurar alivio de sus enfermedades. El empleo de las hierbas medicinales con fines curativos no se restringe al medio indígena y el rural, sino también a la población de zonas urbanas y suburbanas. Por lo tanto no resulta sorprendente que la población que padece diabetes utilice para su tratamiento tanto la medicina convencional como la tradicional. De tal forma que muchos pacientes, una vez que se les diagnostica la DMT2 en algún centro de salud, se les prescribe el tratamiento alopático apropiado; sin embargo, la mayoría de éstos lo abandona y recurre a los curanderos locales o vendedores de hierbas para obtener terapias de tipo herbolario (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005), ello ante la creencia de que las plantas y sus derivados por ser naturales son inocuos y más efectivos; además, estos tratamientos a menudo les resultan más económicos y accesibles que los alopáticos. En otros casos, los pacientes no tienen acceso a las terapias orales modernas por sus altos costos, entre otros factores, y recurren en primera instancia a terapias a base de plantas. Finalmente, un grupo importante de enfermos con DMT2 combina las terapias alopáticas y alternativas.

De acuerdo a varias revisiones recientes se estima que en México hay alrededor de 500 especies de plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la DMT2 (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Soumyanath, 2006). Muchas de estas plantas se analizaron a principios del siglo XX, en el Instituto Médico Nacional, dependencia oficial que comenzó a inventariar algunas especies que eran utilizadas por la población como remedios contra la diabetes. Entre estas plantas destacan el copalchi (*Hintonia latiflora*), el guarumbo (*Cecropia obtusifolia*), la tronadora (*Tecoma stans*) y el matarique (*Psacalium* sp.), por mencionar algunas (Aguilar & Xolalpa, 2002). Posteriormente esta lista se incrementó sensiblemente a lo largo del siglo XX a medida que la enfermedad cobró importancia por su creciente impacto en la población mexicana. Así surgen el wareque (*Ibervillea sonora*), el nopal y cientos de plantas que actualmente se emplean en México para tratar la diabetes. Esta circunstancia indica que nuestra medicina herbolaria, al igual que en otras partes del mundo, se encuentra en continuo proceso de adecuación a nuevas circunstancias. En recientes revisiones acerca de plantas utilizadas para tratar la DMT2 se describen los aspectos etnobotánicos más relevantes de algunas de las plantas

más utilizadas en el México contemporáneo para tratar la diabetes. Sin embargo, el uso de muchas otras no se encuentra documentado a pesar del papel importante que juegan estas plantas en la terapéutica de la diabetes en distintas regiones del país. Tal es el caso de la especie objeto del presente estudio, *Hydrangea semanii* L. Riley, que se comercializa en muchos mercados del estado de Chihuahua para el tratamiento de la enfermedad.

De manera general, la eficacia de las plantas mexicanas utilizadas para tratar la DMT2 no ha sido comprobada y el conocimiento de sus principios activos es limitado, aunque algunas estudios han permitido demostrar el potencial antidiabético de especies selectas de nuestra flora medicinal a través de pruebas farmacológicas convencionales (Aguilar y Xolalpa, 2002 y referencias ahí citadas; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Alarcón-Aguilar y Román-Ramos 2006; Mata *et al.*, 2013) y en menor proporción por medio de estudios clínicos (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Aguilar y Xolalpa, 2002 y referencias ahí citadas; Herrera-Arellano *et al.*, 2004, *inter alia*).

Este breve recuento acerca del uso de las plantas medicinales en México para tratar la diabetes deja en claro la necesidad de intensificar los estudios conducentes a establecer la eficacia, seguridad y criterios de calidad de estas plantas a fin de asegurar el uso racional de las mismas. En este contexto el presente proyecto pretende completar el estudio de Brindis en relación al establecimiento del potencial de la especie *H. semanii* como agente antidiabético.

III. HIPÓTESIS

El uso popular de la especie *Hydrangea seemannii* para el tratamiento de la diabetes sugiere que la infusión de la planta posee propiedades hipoglucemiantes y/o antihiper glucémicas. Por lo tanto, este preparado debe contener compuestos capaces de conferirle dichas propiedades farmacológicas.

IV. OBJETIVOS

3.1 Objetivos generales

Establecer el efecto de la infusión de *H. seemannii* L. Riley sobre las enzimas α -glucosidasas mediante estudios farmacológicos *in vivo* e *in vitro*, con la finalidad de completar los estudios conducentes a determinar su potencial antidiabético.

Establecer los principios activos hipoglucemiantes y antihiper glucémicos de *H. seemannii*, hasta ahora desconocidos, con la finalidad de descubrir nuevos o conocidos agentes antidiabéticos que justifiquen las propiedades farmacológicas de los preparados de la planta y permitan en un futuro el desarrollo de las pruebas de calidad de la misma.

El cumplimiento de estos objetivos sentará las bases para el uso racional de la especie en las prácticas médicas populares del estado de Chihuahua.

3.2 Objetivos particulares

Determinar el efecto antihiper glucémico de la infusión de *Hydrangea seemannii* L. Riley (Hydrangeaceae) mediante una prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones normales y diabéticos.

Determinar el efecto de la infusión y sus fracciones preparadas a partir de la droga cruda de *H. seemannii* sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas a través de un ensayo enzimático de naturaleza espectrofotométrica.

Aislar y caracterizar los principios activos de la infusión mediante estudios fitoquímicos convencionales.

Establecer el perfil cromatográfico de la infusión mediante UPLC con la finalidad de iniciar los estudios conducentes a determinar los parámetros de calidad de la especie.

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Material vegetal

Las partes aéreas (5.5 Kg) de la especie vegetal *Hydrangea seemannii* procedentes de San Rafael, Chihuahua, fueron proporcionados el 26 de mayo del 2008 por el Dr. Robert Bye, investigador en el Instituto de Biología de la UNAM. Un ejemplar de referencia se depositó en el Herbario Nacional (MEXU, número de referencia Bye & Linares 35130). El material vegetal fue sometido a un proceso de desecación a temperatura ambiente por ocho días y posteriormente fragmentado (2 micras) en un molino Willey modelo 4.

5.2 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se realizaron sobre placas de aluminio de diferentes dimensiones, recubiertas con una capa de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (60 F₂₅₄ Merck), utilizando como sistema de elución AcOEt–H₂O–HCOOH (8:1:1); la visualización de las placas se realizó inicialmente con luz UV (onda corta, 254nm y onda larga, 365nm) y posteriormente revelando con los agentes cromógenos sulfato cérico amoniacal en H₂SO₄ o anisaldehído en MeOH.

La cromatografía en columna abierta se realizó con Sephadex® LH-20 (Pharmacia) utilizando diferentes sistemas de elución.

Los análisis por Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia se realizaron empleando un cromatógrafo Waters (ACQUITY UPLC® clase H), equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA), bomba cuaternaria, inyector automático y el software Empower versión 3; se utilizó la columna BHE® Shield RP18 (Waters Chromatography Division) de 2.1 mm de diámetro interno, 100 mm de longitud y 1.7 µm de tamaño de partícula. Los analitos se prepararon disolviendo un miligramo de muestra en un mililitro de la mezcla de MeOH–H₂O (40:60), posteriormente se filtraron a través de membranas de nylon (Acrodisc®) de 0.2 µm x 13 mm.

5.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fischer-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros en el infrarrojo (IR) se obtuvieron por reflectancia en un espectrofotómetro FTIR de rejilla Modelo 1605 marca Perkin-Elmer. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN- ^1H) y de Carbono-13 (RMN- ^{13}C), así como los espectros de RMN bidimensionales homonucleares COSY (Correlated Spectroscopy) y NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), o heteronucleares HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) y HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), se registraron en aparatos Varian Unity INOVA, operados a una radiofrecuencia de 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C . Los espectros se realizaron en $\text{MeOH-}d_4$; los desplazamientos químicos se designaron en unidades δ (ppm) referidas al tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM-IE) se determinaron en un aparato JEOL JMS-SX102A Hewlett-Packard 5890 serie II mediante inducción directa a 70 eV y bombardeo rápido de átomos (EM-FAB).

5.4 Preparación y fraccionamiento de la infusión de *Hydrangea seemannii*

La infusión de las partes aéreas secas y molidas de la especie vegetal *Hydrangea seemanni* se realizó mediante el procedimiento de infusión, utilizando 648 gramos del material vegetal y 16.2 litros de agua destilada; el extracto acuoso resultante se sometió a un fraccionamiento primario por medio de un proceso de reparto entre acetato de etilo (AcOEt) y agua; la fracción orgánica resultante se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró al vacío para obtener 8.81 gramos de la fracción orgánica; la fracción acuosa se descartó debido a su poca actividad. La fracción orgánica resultante se fraccionó por medio de una cromatografía en columna abierta (CCA) sobre Sephadex LH-20 utilizando MeOH como eluyente, para obtener 240 fracciones de cinco mL cada una, las cuales fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina y combinadas de acuerdo a su similitud cromatográfica. Este último proceso cromatográfico generó diecisiete fracciones (**F1-F17**), tal como se muestra en el Cuadro 4.

5.4.1 Aislamiento de camperol (1) a partir de la fracción F14

De la fracción **F14** precipitaron de manera espontánea 0.0118 g de camperol (**1**) como un sólido vítreo amarillo claro, **EM-IE** m/z 287 $[M+H]^+$; **IR** 3287, 1661, 1606, 1590, 1520, 1498, 1260.

5.4.2 Aislamiento de quercetina (2) a partir de la fracción F16

De la fracción **F16** precipitaron de manera espontánea 0.0064 g de quercetina (**2**) como un sólido amarillo, **EM-IE** m/z 303 $[M+H]^+$, **IR** 3207, 1661, 1601, 1586, 1498, 1263.

La Figura 4 resume el proceso de preparación y fraccionamiento de la infusión de *H. seemannii*, así como el aislamiento de quercetina (**2**) y camperol (**1**).

Cuadro 4. Fraccionamiento del extracto orgánico de la infusión de *H. seemannii*

Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
1-21	F1	0.3751
22-65	F2	4.3446
65-85	F3	0.8890
86-90	F4	0.3437
91-94	F5	0.3334
95-105	F6	0.8890
106-109	F7	0.2113
110-115	F8	0.2324
116-125	F9	0.2466
126-132	F10	0.1441
133-145	F11	0.1228
146-155	F12	0.0296
156-160	F13	0.0051
161-175	F14	0.0118
176-180	F15	0.0039
181-201	F16	0.0064
201-240	F17	0.0068

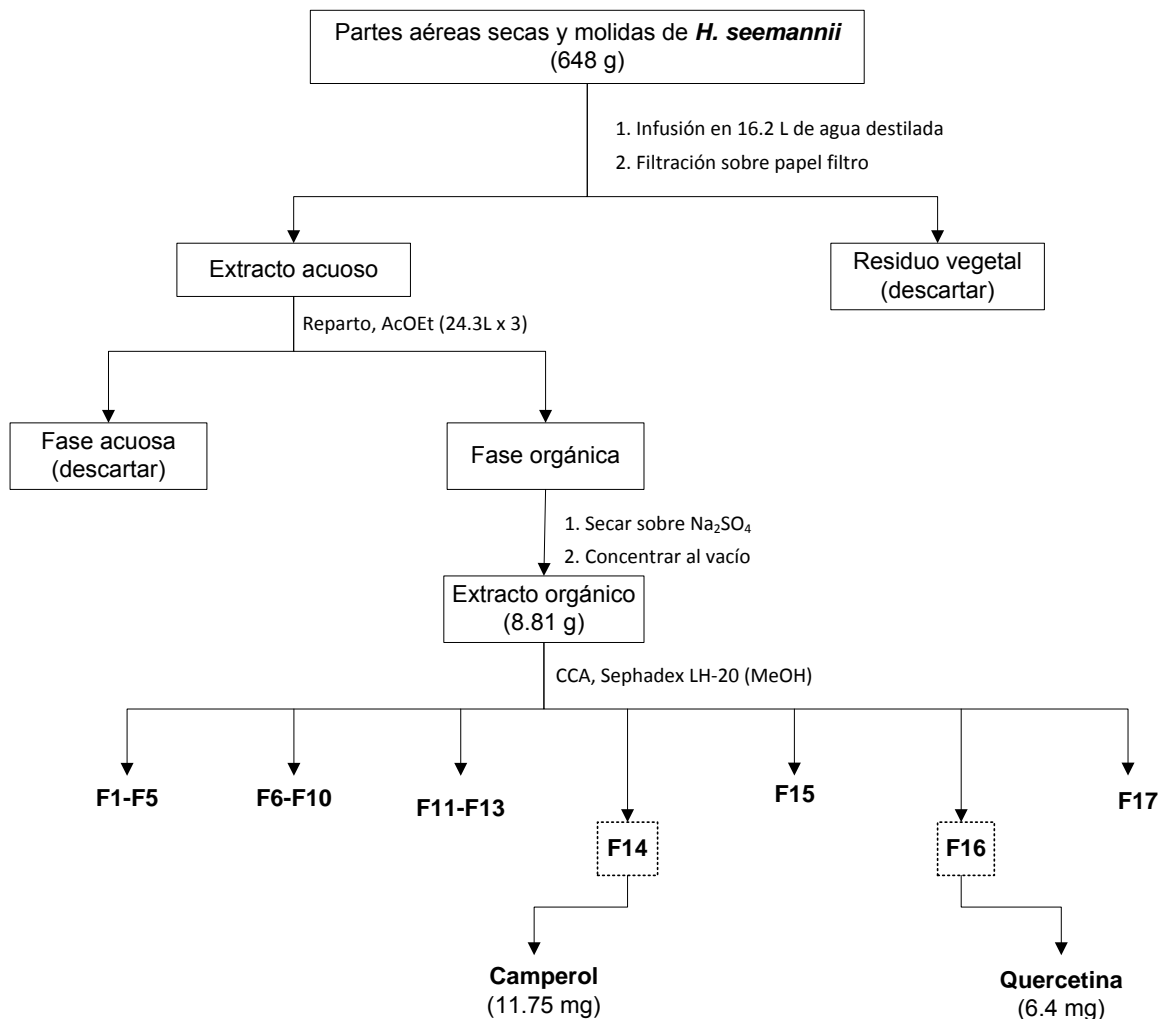


Figura 4. Preparación y fraccionamiento de la infusión de *H. seemannii* y separación de camperol (1) y quercetina (2).

5.4.3 Aislamiento de astragalina (3) a partir de la fracción F4

La fracción **F4** (0.344 g) se reconstituyó en MeOH; de la solución resultante precipitó un sólido que fue separado por decantación. El sólido se lavó con AcOEt (3 x 5 mL); las aguas madres resultantes se reunieron y concentraron al vacío para obtener 0.0132 g de astragalina (3) como un sólido amorfo, amarillo claro, **EM-IE** m/z 449 $[M+H]^+$; **IR** 3265, 1660, 1612, 1594, 1497, 1431, 1258. En la Figura 5 se resume el proceso de aislamiento de astragalina (3) a partir de la fracción **F4**.

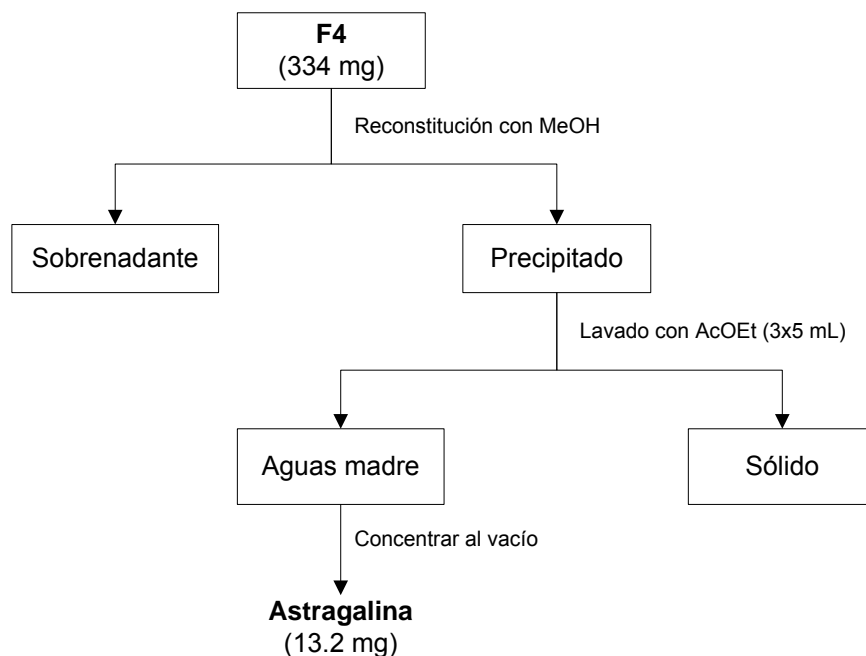


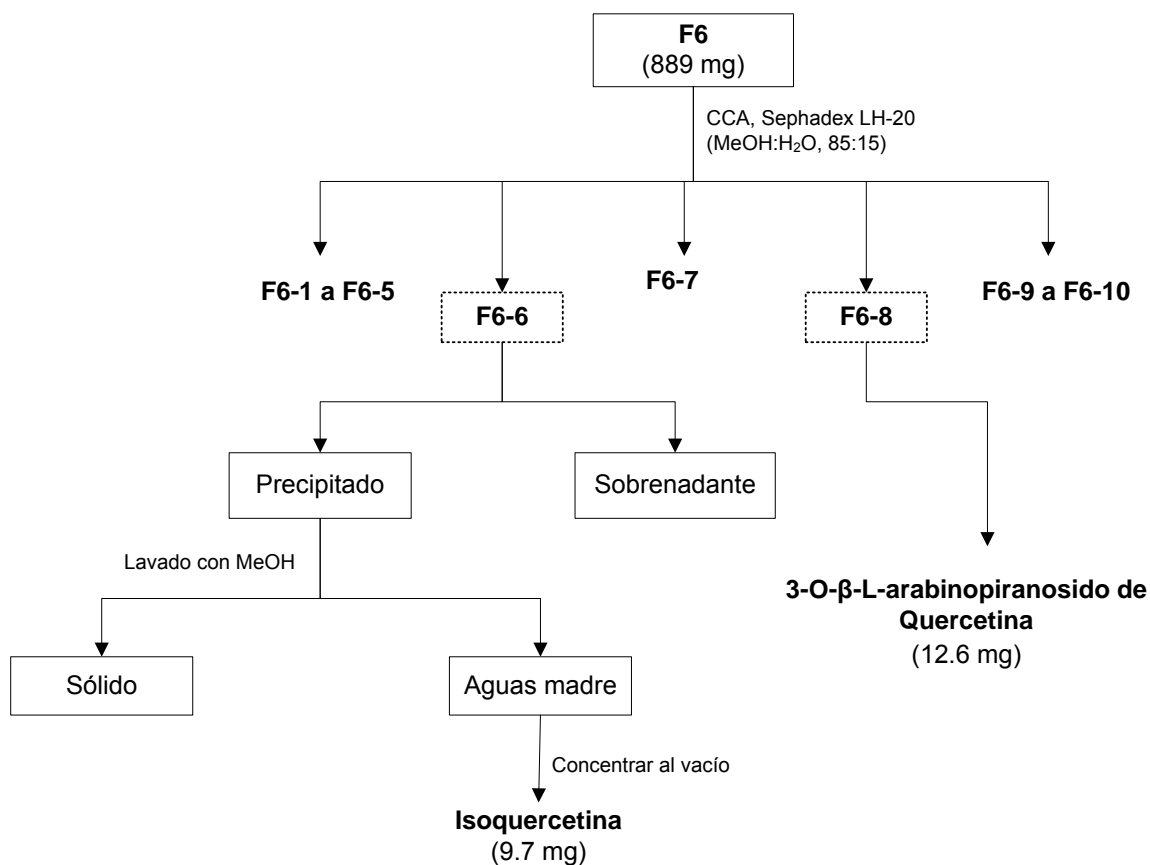
Figura 5. Aislamiento de astragalina (**3**) a partir de la fracción secundaria **F4**.

5.4.4 Aislamiento de isoquercetina (**4**) y del 3-*O*- β -*L*-arabinopiranosido de quercetina (**5**) a partir de la fracción **F6**

La fracción **F6** (0.889 g) fue sometida a un fraccionamiento terciario mediante una cromatografía en columna abierta (CCA) sobre Sephadex LH-20 (MeOH–H₂O, 85:15), obteniéndose 105 fracciones de cinco mL cada una. Tras un cuidadoso análisis por cromatografía en capa fina, las fracciones similares se combinaron para generar diez fracciones (**F6-1** a **F6-10**) [Cuadro 5]. De la fracción **F6-8** se obtuvieron 0.0126 mg del 3-*O*- β -*L*-arabinopiranosido de quercetina (**5**), como un sólido vítreo anaranjado, **EM-IE** m/z 435 [M+H]⁺; **IR** 3209, 1661, 1604, 1587, 1498, 1450, 1262. Por otra parte, de la fracción **F6-6** precipitó un sólido amarillo claro, que se lavó repetidamente con MeOH. Las aguas de lavado se concentraron a sequedad para generar 0.0097 g de isoquercetina (**4**) como un sólido amorfo, amarillo claro, **EM-IE** m/z 465 [M+H]⁺; **IR** 3370, 1654, 1594, 1498, 1443. La Figura 6 resume el proceso de aislamiento de estos dos compuestos a partir de la fracción **F6**.

Cuadro 5. Fraccionamiento de la fracción **F6**

Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
1-10	F6-1	0.0937
11-16	F6-2	0.1743
17-19	F6-3	0.1988
20-25	F6-4	0.2961
26-28	F6-5	0.0411
29-40	F6-6	0.0097
41-44	F6-7	0.0208
45-70	F6-8	0.0126
71-90	F6-9	0.0083
90-105	F6-10	0.0091


Figura 6. Aislamiento de isoquercetina (**4**) y del 3-O-β-L-arabinopiranosido de quercetina (**5**) a partir de la fracción secundaria **F6**.

5.4.5 Aislamiento de los ácidos 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (9) y 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (10) a partir de la fracción F7

El fraccionamiento de la fracción **F7** (0.211 g) se llevó a cabo mediante una cromatografía en columna abierta (CCA) sobre Sephadex LH-20, utilizando una mezcla de (CH₃)₂CO–MeOH (80:20) como eluyente; se obtuvieron 80 fracciones de cinco mL cada una, las cuales fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina y combinadas de acuerdo a su similitud cromatográfica (Cuadro 6), para finalmente obtener siete fracciones (**F7-1** a **F7-7**). De la fracción **F7-7** precipitaron espontáneamente 0.0143 mg de ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (**9**) como un sólido amorfo, café claro, **EM-IE** *m/z* 517 [M+H]⁺; **IR** 3370, 1687, 1639, 1601, 1517. De la fracción **F7-6** precipitaron 0.0112 g de ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (**10**) como un sólido amorfo, café claro, **EM-IE** *m/z* 517 [M+H]⁺; **IR** 3366, 1670, 1640, 1601, 1521. En la Figura 7 se resume el proceso de aislamiento de estos compuestos a partir de la fracción **F7**.

Cuadro 6. Fraccionamiento de la fracción **F7**

Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
1-4	F7-1	0.0302
5-13	F7-2	0.0586
14-23	F7-3	0.0704
24-30	F7-4	0.0193
31-41	F7-5	0.0124
42-53	F7-6	0.0112
54-80	F7-7	0.0143

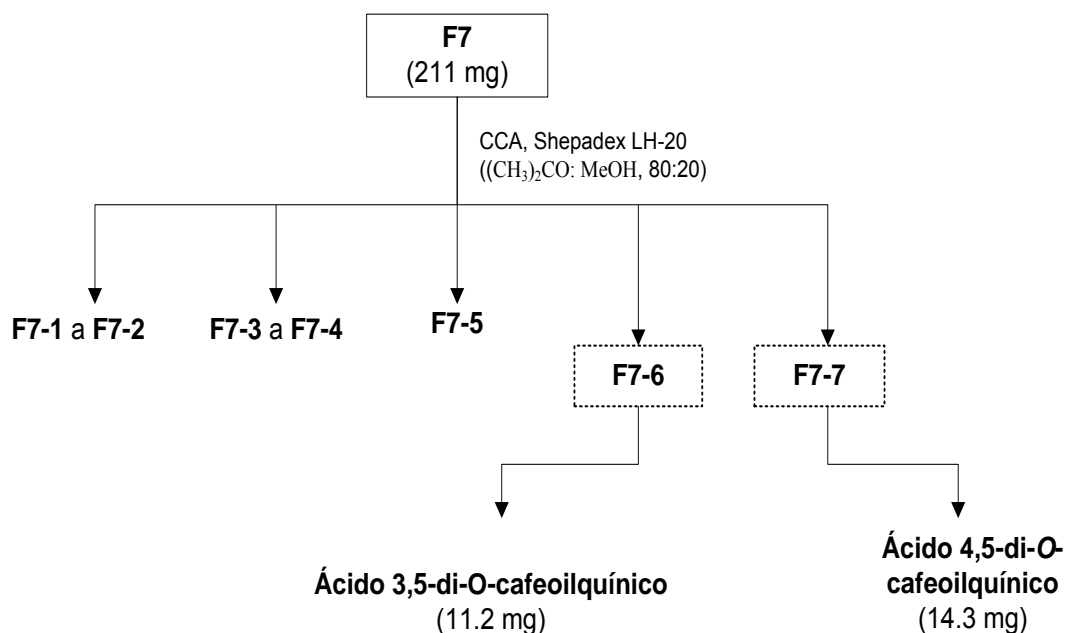


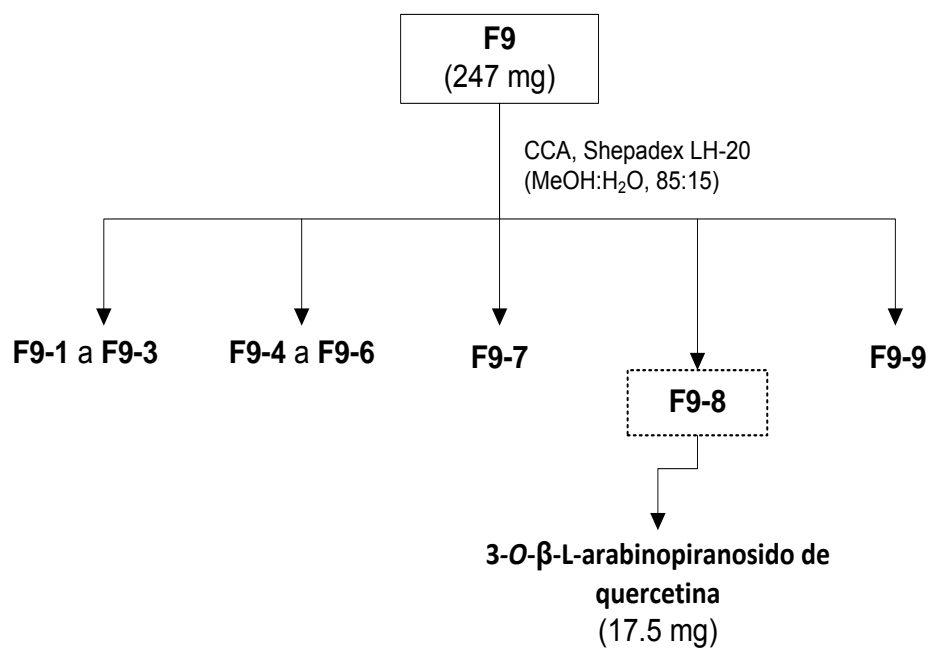
Figura 7. Aislamiento de los ácidos 4,5-di-O-cafeoilquinico (9) y 3,5-di-O-cafeoilquinico (10) a partir de F7.

5.4.6 Aislamiento del 3-O-β-L-arabinopiranosido de quercetina (5) a partir de la fracción F9

La fracción **F9** (0.247 g) se sometió a un fraccionamiento por medio de cromatografía en columna abierta (CCA) sobre Sephadex LH-20 (MeOH-H₂O, 85:15) para obtener 75 fracciones de cinco mL cada una, éstas se analizaron por medio de una cromatografía en capa fina y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica (Cuadro 7), para finalmente obtener nueve fracciones (**F9-1** a **F9-9**). En la fracción **F9-8** precipitaron de manera espontánea 0.0175 g del 3-O-β-L-arabinopiranosido de quercetina (**5**). La Figura 8 muestra el proceso de aislamiento de este compuesto a partir de la fracción **F9**.

Cuadro 7. Fraccionamiento de la fracción **F9**

Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
1-10	F9-1	0.0422
11-20	F9-2	0.0509
21-22	F9-3	0.0233
23-25	F9-4	0.0363
26-28	F9-5	0.0210
29-30	F9-6	0.0145
31-33	F9-7	0.0138
34-50	F9-8	0.0175
51-75	F9-9	0.0100


Figura 8. Aislamiento del 3-*O*-β-L-arabinopiranosido de quercetina (5) a partir de la fracción **F9**.

5.4.7 Aislamiento de ácido clorogénico (8), rutina (6) y nicotiflorina (7) a partir de la fracción F3

Se llevó a cabo el fraccionamiento de la fracción **F3** (1.0890 g) por medio de cromatografía en columna abierta (CCA) sobre Sephadex LH-20, utilizando como eluyente una mezcla de $(\text{CH}_3)_2\text{CO}-\text{MeOH}$ (70:30). Se obtuvieron 85 fracciones de cinco mL cada una, se analizaron por medio de cromatografía en capa fina y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica (Cuadro 8); finalmente se obtuvieron ocho fracciones (**F3-1** a **F3-8**). La fracción **F3-5** (0.1786 g) fue sometida a fraccionamiento adicional mediante cromatografía en columna abierta (CCA) sobre Sephadex LH-20, eluyendo con una mezcla de $(\text{CH}_3)_2\text{CO}-\text{MeOH}$ (80:20). De este procedimiento se obtuvieron 80 fracciones de cinco mL cada una. Estas fracciones fueron analizadas por medio de cromatografía en capa fina y combinadas de acuerdo a su similitud cromatográfica (Cuadro 9) para finalmente obtener diez fracciones (**F3-5-1** a **F3-5-10**). La fracción **F3-5-9** (0.0344 g) se reconstituyó en agua y se observó la formación de un precipitado; el sobrenadante se sometió a un proceso de reparto con AcOEt (3 x 5ml) y la fase acuosa resultante se concentró a presión reducida para obtener 0.0128 g de ácido clorogénico (**8**) como un sólido amorfo, café claro, **p.f.** 206-209 °C; **EM-IE** m/z 355 $[\text{M}+\text{H}]^+$; **IR** 3370, 1688, 1646, 1600, 1519. Por otra parte, de la fracción **F-3-5-5** precipitaron 0.0066 g de rutina (**6**) como un sólido amorfo amarillo pálido, **p.f.** 194-195 °C; **EM-IE** m/z 611 $[\text{M}+\text{H}]^+$; **IR** 3400, 1690, 1610, 1496, 1260. Por último de la fracción **F-3-5-6** precipitaron 0.0096 g de una mezcla de rutina (**6**) y nicotiflorina (**7**). La Figura 9 muestra el proceso de aislamiento de los compuestos anteriores a partir de la fracción primaria **F3**.

Cuadro 8. Fraccionamiento de la fracción **F3**

Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
1-10	F3-1	0.1620
11-15	F3-2	0.1257
16-20	F3-3	0.1642
21-25	F3-4	0.1046
26-54	F3-5	0.1786
55-65	F3-6	0.0928
66-80	F3-7	0.0963
81-85	F3-8	0.0752

Cuadro 9. Fraccionamiento de la fracción **F3-5**

Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
1-5	F3-5-1	0.0244
6-10	F3-5-2	0.0300
11-17	F3-5-3	0.0297
18-23	F3-5-4	0.0132
24-29	F3-5-5	0.0066
30-33	F3-5-6	0.0096
34-40	F3-5-7	0.0098
41-44	F3-5-8	0.0085
45-80	F3-5-9	0.0344

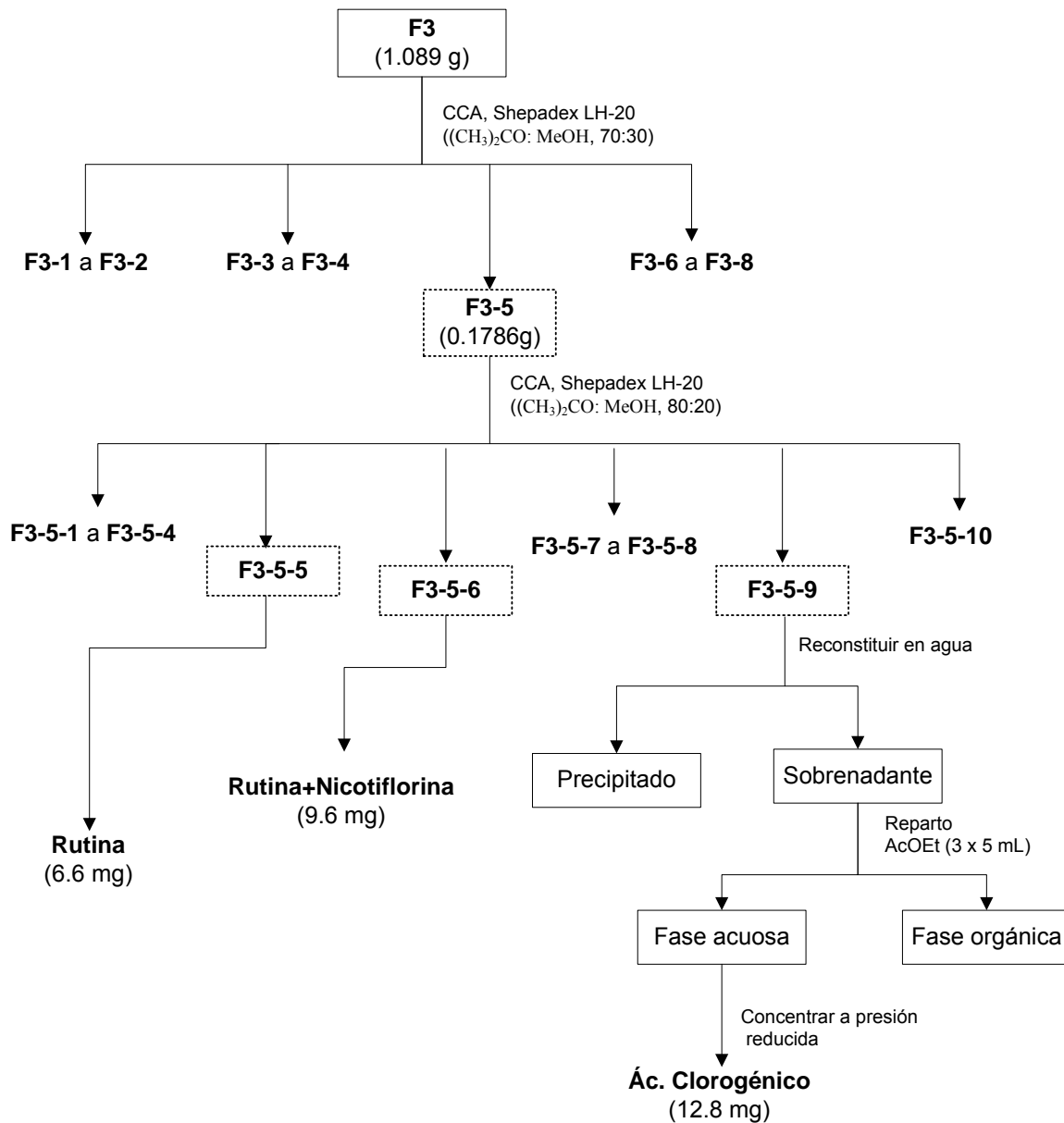


Figura 9. Aislamiento de ácido clorogénico (8), rutina (6) y nicotiflorina (7) a partir de la fracción primaria F3.

5.5 Establecimiento del perfil cromatográfico de la especie *Hydreangea seemannii*

El perfil cromatográfico se obtuvo utilizando un sistema de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia ACQUITY UPLC[®], la separación se realizó con una columna BHE[®] Shield RP18 (100 mm x 2.1 mm x 1.7 μm) a una temperatura de 40 °C; el análisis se realizó por medio de un gradiente de elución con (A) MeOH y (B) agua (0.4% de ácido acético) como fase móvil a un flujo de 0.30 mLmin⁻¹. Las condiciones del gradiente de la fase móvil fueron: A, 19-35%, 0-1.0 min; elución isocrática de A, 35%, 1.0-18.0 min; A, 35-19%, 18.0-20.0 min.

5.6 Ensayo para inhibidores de α-glucosidasas

El extracto acuoso (infusión), sus fracciones orgánica y acuosa, el compuesto **5** y la acarbosa (control positivo) fueron disueltos en MeOH ó en agua destilada. Se tomaron alícuotas de 0-10 μL de los materiales de prueba (por triplicado) y se incubaron durante diez minutos con 20 μL de una solución stock de la enzima [0.75 unidades de αGHY (α-glucosidasa de levadura de cerveza) en 100 mM de una solución buffer de fosfato de sodio]. Después de la incubación, se agregaron 10 μL de sustrato (pNPG, 5mM) y se incubó durante 20 minutos a 37 °C; posteriormente se determinaron las absorbancias.

Para el extracto y las fracciones la actividad inhibitoria se determinó como el porcentaje por comparación con el blanco (MeOH) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \alpha GHY = \left(1 - \frac{A_{405t}}{A_{405c}} \right) \times 100\%$$

Donde, % αGHY es el porcentaje de inhibición, A_{405t} es la absorbancia corregida del extracto, fracción o compuesto en prueba ($A_{405final} - A_{405inicial}$) y A_{405c} es la absorbancia para el blanco ($A_{405blancofinal} - A_{405blancoinicial}$). La concentración requerida para tener una inhibición del 50% de la actividad de la enzima (IC₅₀) se calculó mediante un análisis de regresión, utilizando la siguiente ecuación:

$$\%Inhibicion = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^s}$$

Donde A_{100} representa la inhibición máxima, I es la concentración del inhibidor, IC_{50} es la concentración requerida para tener un 50% de inhibición de la actividad de la enzima y s es el grado de cooperatividad (Copeland, 2000).

5.7 Ensayo de tolerancia a la sacarosa de la infusión de *Hydrangea seemannii*

Con la finalidad de complementar los estudios del efecto antihiper glucémico de la infusión de *H. seemannii*, se realizó la prueba oral de tolerancia a la sacarosa (POTS) en ratones normoglucémicos y diabéticos.

La DMT2 se indujo en los ratones mediante la administración de una dosis única de estreptozotocina (STZ, 100 mg/kg i.p.) después de un tratamiento previo con adenin nicotidamida (NA por sus siglas en inglés, 30 mg/kg). Los niveles de glucosa se determinaron ocho días después de la administración de la STZ y aquellos que presentaron niveles de glucosa sanguínea mayores a 200 mg/dL fueron considerados diabéticos e incluidos en los estudios.

Las muestras sanguíneas fueron recolectadas de la vena caudal de los animales a través de una pequeña incisión en el final de la cola. Los niveles de glucosa en sangre se midieron por el método enzimático de la glucosa oxidasa utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra, Jonhson-Jonhson, Milpitas, CA, EE.UU.).

La sacarosa, acarbosa, STZ y el NA utilizados en los ensayos se compraron a Sigma-Aldrich (St. Lois, MO. USA).

Después de un ayuno de ocho horas, los ratones normoglucémicos o diabéticos, según el caso, se dividieron en cinco grupos: al grupo uno se le administró el vehículo (solución salina, NaCl 0.9%), el segundo grupo fue administrado con el control positivo (acarbosa, 3 mg/kg). Los grupos III-V fueron tratados con dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg del extracto acuoso (infusión).

Treinta minutos después de haber iniciado el tratamiento, todos los animales recibieron por vía oral una solución de sacarosa (3 g/kg); posteriormente los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 0, 30, 60, 90, 120 y 240 minutos después de la administración de los carbohidratos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Efecto antihiper glucémico de la infusión de *Hydrangea seemannii*

Con la finalidad de complementar los estudios del potencial antidiabético de la especie *Hydrangea seemannii* se realizó una prueba oral de tolerancia a la sacarosa (POTS) de la infusión en ratones normoglucémicos y diabéticos (NA-STZ). La infusión se seleccionó debido a que es el preparado comúnmente utilizado en las prácticas médicas populares. La POTS se efectuó con la finalidad de establecer si la infusión contiene principios inhibidores de las α -glucosidasas capaces de disminuir los niveles de glucosa postprandial (Bilous & Donnelly, 2010; Martínez Vizcaino & Salcedo Aguilar, 1997). El efecto de la infusión en ratones normoglucémicos se muestra en la Figura 10 donde se observa una disminución significativa ($p < 0.001$) del pico postprandial a los treinta minutos para todas las dosis ensayadas, en los tres casos el efecto es mayor que el de la acarbosa, utilizada como control positivo. En el caso de la dosis de 100 mg/Kg, los niveles de glucosa se mantienen constantes en los distintos tiempos de medición, lo que podría indicar que la infusión de *H. seemannii* a esta dosis no solamente evita el aumento de la glucosa en la sangre después de una carga de carbohidratos, sino que controla los niveles de glucemia, manteniendo el porcentaje de variación constante durante todo el tiempo del ensayo. En cuanto a los experimentos realizados en animales diabéticos, la Figura 11 muestra, de nueva cuenta, una disminución significativa ($p < 0.001$) del pico postprandial a todas las dosis ensayadas. A la mayor dosis el efecto fue comparable al del control positivo.

Los resultados recién descritos evidenciaron claramente el efecto antihiper glucémico de la infusión de *H. seemanni* debido a la inhibición de las α -glucosidasas. Por lo tanto a continuación se decidió realizar un ensayo enzimático para evaluar la inhibición de α -glucosidasas de las fracciones primarias de la infusión obtenidas por un proceso de reparto entre agua y AcOEt. El ensayo enzimático utilizado consiste en determinar la cantidad de sustrato que se hidroliza por acción de una α -glucosidasa en presencia del potencial inhibidor de la actividad enzimática. En este caso se utilizó un método espectrofotométrico basado en el descrito por Oki y colaboradores (1999). Como sustrato se utilizó el α -D-glucopiranosido de *p*-nitrofenilo (pNGP),

y como control positivo la acarbosa. De acuerdo a los resultados del presente estudio sólo la fracción orgánica (AcOEt) inhibió la actividad de las α -glucosidasas de prueba, presentando un porcentaje de inhibición máxima de 60 a 1000 ppm y una concentración de inhibición media (CI_{50}) de 485.4 ± 22.4 ppm. En contraste, la fracción acuosa no fue activa.

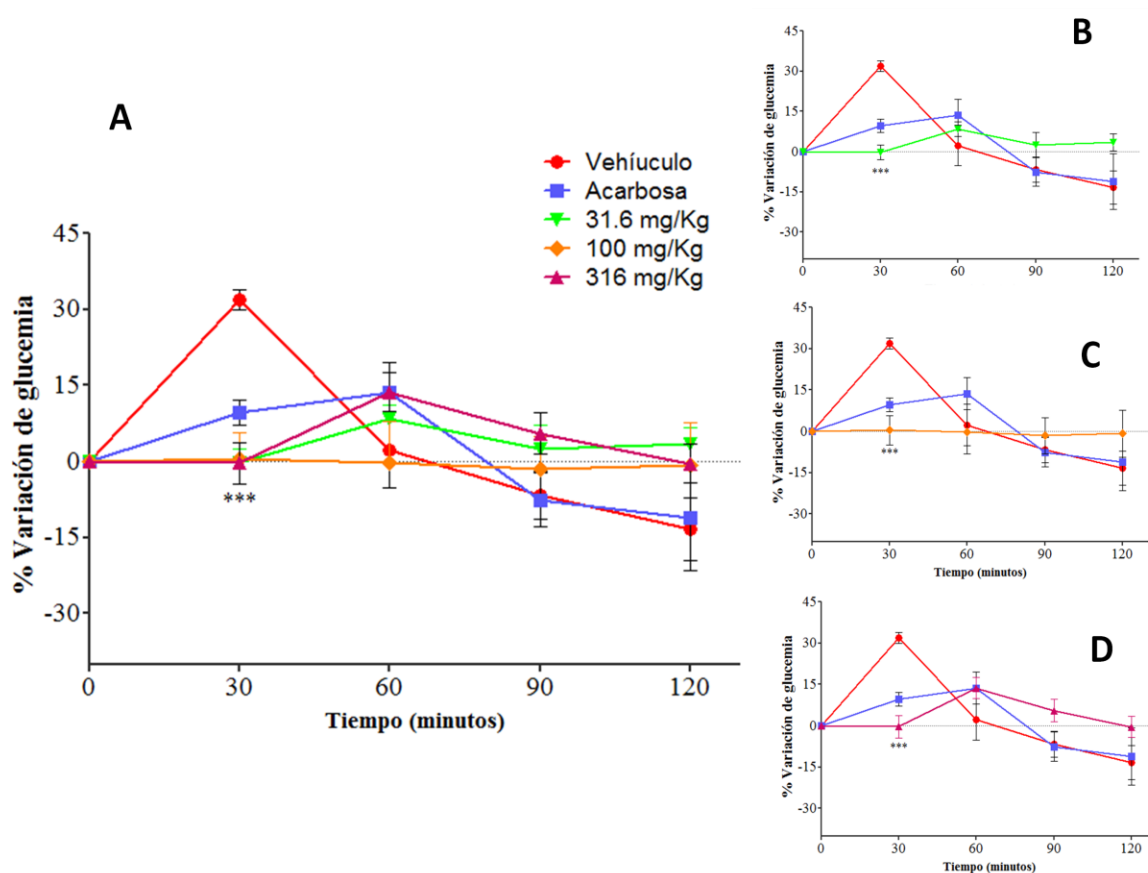


Figura 10. A. Prueba de tolerancia a la sacarosa de la infusión de *H. seemannii* en animales normoglucémicos. B. Dosis **31.6 mg/Kg** ($n=6$), C. Dosis **100 mg/Kg** ($n=7$), D. Dosis **316 mg/Kg** ($n=6$). Vehículo: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=7$), Acarbosa 3 mg/Kg ($n=7$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. *** $p<0.001$.

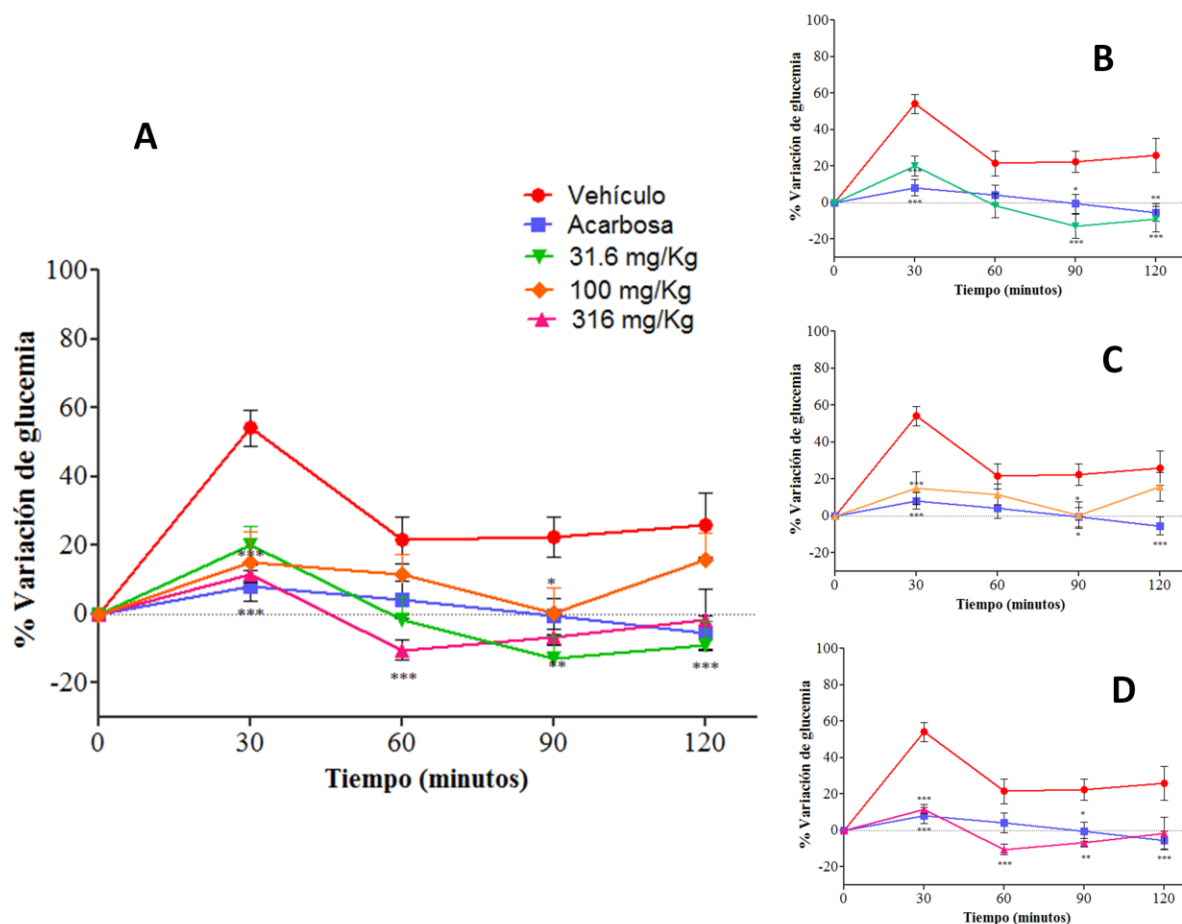


Figura 11. A. Prueba de tolerancia a la sacarosa de la infusión de *H. seemanii* en animales diabéticos. B. Dosis **31.6 mg/Kg** ($n=6$), C. Dosis **100 mg/Kg** ($n=6$), D. Dosis **316 mg/Kg** ($n=6$). Vehículo: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=6$), Acarbosa 3 mg/Kg ($n=7$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Integrando estos resultados con los de Brindis (2011) la fracción orgánica de la infusión contiene no sólo los inhibidores de las α -glucosidasas sino también los principios hipoglucemiantes.

6.2 Estudio fitoquímico de la fracción activa de la infusión

Con la finalidad de separar los principios activos de la infusión, la fracción orgánica fue sometida a los diversos procesos cromatográficos descritos en la parte experimental. Esta metodología permitió el aislamiento de diez metabolitos secundarios. Los productos incluyen

siete flavonoles (**1-7**) y tres fenilpropanoides (**8-10**). Los flavonoides se caracterizaron como camperol (**1**), quercetina (**2**), astragalina (**3**), isoquercetina (**4**), 3-*O*- β -L-arabinopiranosido de quercetina (**5**), rutina (**6**) y nicotiflorina (**7**). Los fenilpropanoides se caracterizaron como ácido clorogénico (**8**), ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (**9**) y ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (**10**). En el Cuadro 10 se indican los rendimientos de los compuestos aislados, mientras que sus estructuras moleculares se presentan en la Figura 12.

Cuadro 10. Compuestos aislados a partir de la fracción de AcOEt de la infusión de *H. seemanii*

Compuesto	Rendimiento (% en peso seco)
Camperol (1)	0.0018
Quercetina (2)	0.0010
Astragalina (3)	0.0020
Isoquercetina (4)	0.0015
3- <i>O</i> - β -L-arabinopiranosido de quercetina (5)	0.0046
Rutina (6)	0.0010
Nicotiflorina (7)	0.0015 (en mezcla con rutina)
Ácido clorogénico (8)	0.0020
Ácido 4,5-Di- <i>O</i> -cafeoilquínico (9)	0.0022
Ácido 3,5-Di- <i>O</i> -cafeoilquínico (10)	0.0017

Con la excepción de la nicotiflorina (**7**), cuya identificación se realizó por co-elución con una muestra auténtica, la caracterización de los demás compuestos se verificó al comparar sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas con las descritas en la literatura. A continuación se discutirá en forma breve el análisis de los datos que permitieron proponer las estructuras de los compuestos **1-6**, **8-10** y para facilitar el seguimiento del mismo se discutirán conjuntamente aquellos compuestos que muestren una mayor similitud estructural.

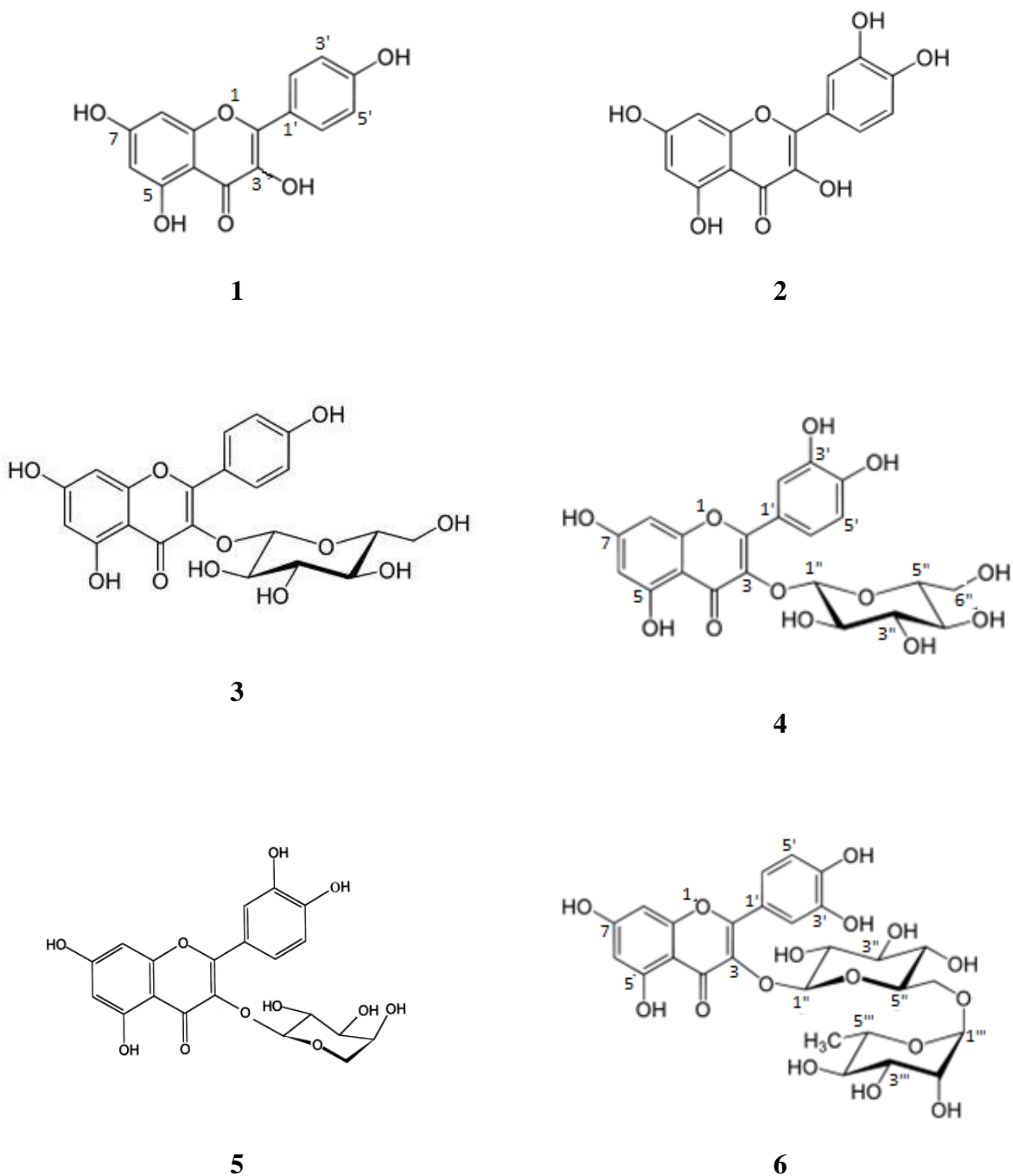
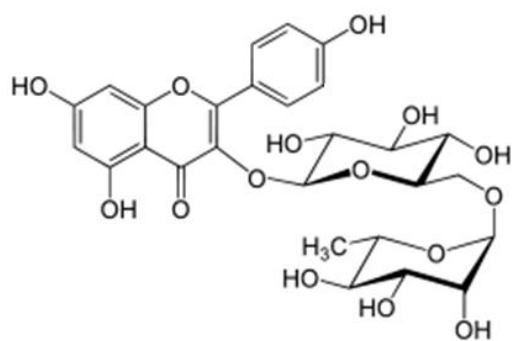
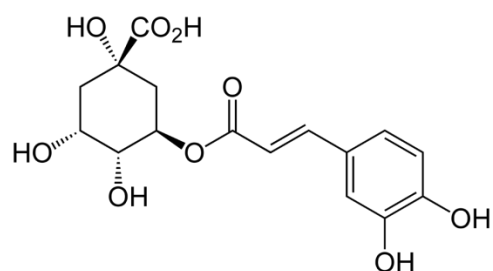


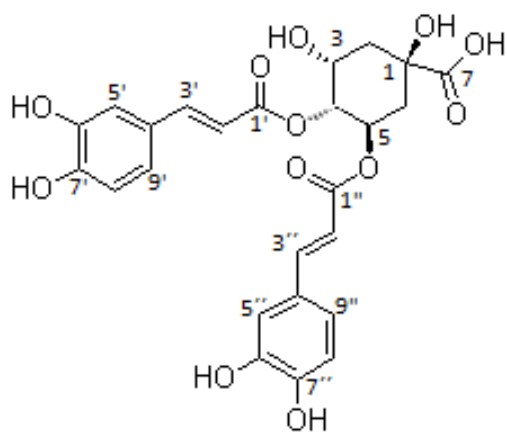
Figura 12. Estructuras moleculares de los compuestos aislados de *Hydrangea seemanii*.



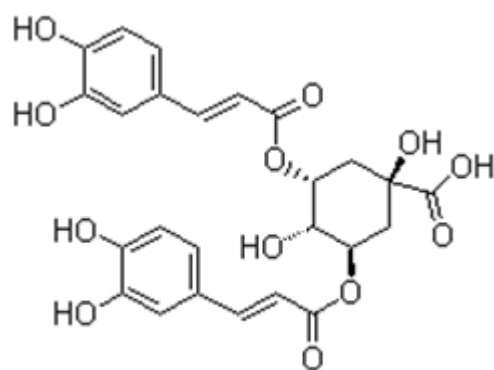
7



8



9



10

Figura 12. Estructuras moleculares de los compuestos aislados de *Hydrangea seemanii*. (Continuación)

6.2.1 Caracterización de los compuestos **1** y **3**

Los compuestos **1** y **3** son derivados de la 3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona. Los espectros en el UV presentan dos bandas de absorción máxima (λ_{\max}) a 264 (banda II) y 364 (banda I) nm. Los espectros en el infrarrojo presentaron como características relevantes bandas de absorción para hidroxilos (banda ancha centrada en $\sim 3287\text{ cm}^{-1}$ en el caso de **3**), carbonilo de γ -pirona ($\sim 1661\text{ cm}^{-1}$), y aromaticidad ($\sim 1600, 1571$ y 1497 cm^{-1}). Los espectros de masas generados por la técnica de FAB en su modalidad positiva permitieron determinar sus iones pseudo-moleculares $[M+H]^+$ en una relación m/z de 287 y 449 para **1** y **3**, respectivamente. Los espectros de RMN- ^1H (Cuadro 11) presentaron señales para cuatro hidrógenos aromáticos correspondientes a un sistema A_2X_2 (δ_{H} 8.08 y 6.90 para **1**; 7.96 y 6.79 para **3**) y dos protones para un sistema AB (δ_{H} 6.39 y 6.18 para **1**; 6.31 y 6.11 para **3**) los cuales se presentan como dos dobletes, en cada caso, con valores de J de 8.9 (**1**), 9.0 (**3**) y 1.9 (**1**), 2.1 (**3**) Hz, respectivamente. Este conjunto de señales son típicas del anillo B p -sustituido y del anillo A con sustituyentes en las posiciones C5 y C7 de un flavonoide. La ausencia de la señal para H-3 y el número de hidroxilos requeridos por la fórmula molecular indicaron, a priori, que ambos compuestos eran flavonoles. Por otro lado, el espectro del compuesto **3** presentó las señales típicas para los hidrógenos de una hexosa, incluyendo el hidrógeno anomérico que se observó como un doblete ($J = 7.6\text{ Hz}$) en δ_{H} 5.15. Los espectros de RMN ^{13}C (Cuadro 11) de **1** y **3** presentaron el perfil típico de un flavonol y de un glucósido de flavonol, respectivamente. El azúcar del compuesto **3** se determinó como glucosa a partir de los valores de desplazamientos químicos de los seis carbonos en el rango δ_{C} 102.6–61.2. La unión del azúcar a la aglicona se estableció a través del hidroxilo en C-3, ya que en el espectro HMBC se observó claramente una correlación entre el protón anomérico H-1" (δ_{H} 5.15) y el C-3 (δ_{C} 134.0). Por último, la configuración β de la glucosa se estableció a partir de la constante de acoplamiento observada para el hidrógeno anomérico ($J = 7.6\text{ Hz}$).

Con base en estas evidencias, el compuesto **1** se caracterizó como el camperol y el compuesto **3** como la astragalina, los cuales presentan una distribución alta y media en la naturaleza, respectivamente.

6.2.2 Caracterización de los compuestos 2, 4, 5 y 6

El siguiente grupo de compuestos son derivados del flavonol quercetina (**2**). Los espectros en el infrarrojo resultaron similares a los derivados del camperol, como se describe en la sección experimental; sin embargo, las bandas I y II del espectro de UV se observaron en λ_{\max} 364 y 255 nm, respectivamente. Las fórmulas moleculares se establecieron con base en los espectros de masas obtenidos por la técnica de FAB modalidad positiva. En este caso los iones pseudo-moleculares $[M+H]^+$ de **2**, **4-6** se observaron en una relación m/z de 303, 465, 435 y 611 respectivamente.

Los espectros de RMN 1H de la quercetina (**2**) [Cuadro 12] resultaron muy similares a los del camperol (**1**). Sin embargo, en lugar del sistema A_2X_2 en el espectro de RMN- 1H se encuentra un sistema ABX [δ_H 7.70 (d, $J= 2.1$ Hz), 7.60 (dd, $J= 2.1, 8.5$ Hz) y 6.90 (d, $J= 8.5$ Hz)] que corresponde al anillo B trisustituido en las posiciones 1', 3' y 4'. Por otro lado, en relación al camperol (**1**), el espectro de RMN ^{13}C de **2** presentó una señal adicional para un carbono oxigenado cuaternario en δ_C 144.8 (C-3').

Así mismo, los espectros de RMN de los compuestos **4-6** fueron similares a los de la quercetina (**2**) [Cuadro 12]. La principal diferencia observada en todos los casos fue la presencia de las señales atribuibles a una o más unidades de hexosa en los espectros. La comparación de los espectros de RMN ^{13}C con los de una serie de modelos (Kurkin, *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2012) indicó que los azúcares eran arabinosa, glucosa, y rutinósido, respectivamente, siendo este último un disacárido conformado por glucosa y ramnosa. En el caso del compuesto **6**, el azúcar unido directamente a la aglicona se estableció preliminarmente como la β -D-glucosa en virtud de las pérdidas neutras consecutivas a partir del ion pseudomolecular de un residuo de metil pentosa y de glucosa $[(M+H-C_6H_{10}O_4)]^+$ y $[M+H-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_5]^+$; las pérdidas se observaron en el espectro de masas en una relación m/z de 465 y 303, respectivamente.

De nueva cuenta, la configuración de la β de la glucosa en **4** y **6** y de la arabinosa en **5** se estableció a partir de las constantes de acoplamiento ($J = 7.4, 5.10$ y 6.6 Hz, respectivamente) de los protones anoméricos en los espectros de RMN 1H . La configuración α del protón anomérico de la ramnosa del rutinósido se estableció con base en el valor de la constante de acoplamiento

anomérico que en este caso fue de 1.5 Hz, indicando su disposición axial. El enlace 1→6 glicosídico entre la ramnosa y la glucosa se estableció a través de la correlación HMBC observada entre C-6 (δ_C 67.1) de la glucosa y el hidrógeno anomérico de la ramnosa [δ_H 4.52 (d, $J=$ 1.5 Hz)].

Al igual que en el compuesto **3**, el punto de unión del carbohidrato a la aglicona correspondiente se estableció mediante los experimentos de HMBC. Entonces, la unión del residuo carbohidrato a la aglicona se estableció a través del hidroxilo en C-3, ya que en los espectros HMBC se observan claramente una correlación entre los protones anoméricos H-1" de cada compuesto [δ_H 5.17; δ_H 5.14 y δ_H 5.10 (H-1"-Glucosa) para **4-6**, respectivamente] con el correspondiente C-3 [δ_C 134.3, δ_C 134.2; δ_C 134.2 para **4-6**, respectivamente].

Por lo tanto, el compuesto **4** se caracterizó como isoquercetina, el **5** como 3-O- β -L-arabinopiranosido de quercetina, y el **6** como la rutina. El flavonoide **5** es de poca de distribución en la naturaleza; sin embargo, **4** y **6** presentan una amplia distribución.

6.2.3 Caracterización de los compuestos **8**, **9** y **10**

El último grupo de compuestos aislados corresponde a los derivados de ácidos hidroxicinámicos. En los espectros de UV se observan dos bandas de absorción máxima (λ_{max}) a 243 y 327 nm. Las características relevantes en los espectros de infrarrojo fueron la presencia de bandas de absorción para hidroxilos (~ 3370 cm^{-1}), para carbonilo de éster α,β -insaturado (~ 1687 cm^{-1}), una función olefínica conjugada (~ 1639 cm^{-1}) y aromaticidad (~ 1601 y 1517 cm^{-1}). Los iones pseudo-moleculares $[M+H]^+$ determinados mediante los espectros de masas generados por la técnica de FAB en su modalidad positiva fueron en una relación m/z , de 355 para **8** y 517 para **9** y **10**.

Los espectros de RMN para estos tres compuestos son muy similares y presentan el patrón característico de derivados cafeoilquínicos. Así, el espectro de RMN- 1H del derivado mono-cafeoilquínico (Cuadro 13) presenta en la región aromática las señales de un sistema ABX [δ_H 7.04 (d, $J=$ 1.7 Hz), 6.93 (dd, $J=$ 8.2, 1.8 Hz) y 6.77 (d, $J=$ 8.2 Hz)], que corresponden a los protones aromáticos del residuo de ácido cafeico. Se observan también las señales para un sistema AX [δ_H 7.56 (d, $J=$ 15.9 Hz) y 6.30 (d, $J=$ 15.9 Hz)] correspondientes a los protones de la

porción olefina α,β -insaturada (H-3' y H-2') del ácido. El valor de la constante de acoplamiento indicó la configuración *E* de la doble ligadura. Este conjunto de señales correlaciona en el espectro HSQC con las absorciones en δ_C 112.9-166.7 corroborando así la presencia del residuo cafeilo en la molécula. Finalmente, los espectros presentan las señales típicas de la porción de ácido quínico ya que se aprecian señales para dos metilenos [δ_H 2.08 (m, 4-H)/ δ_C 36.3 2-C, 37.5, 2-C] un grupo carboxilo (δ_C 166.7) y tres carbonos unidos a función oxigenada [δ_H 5.37 (m), 3.70 (dd, $J= 9.2, 2.7$) y 4.15 (s) / δ_C 72.1, 70.0, 69.7]. El desplazamiento químico a campo más bajo de una de estas señales sugiere que el residuo cafeilo se encuentra esterificando uno de los hidroxilos del ácido quínico. (Horman *et al.*, 1984; Clifford, 1986; Slacanin *et al.*, 1991). Al comparar el espectro de RMN del producto natural con los descritos para el ácido quínico (Tolonen *et al.*, 2002) se comprobó que la señal de H-5 está desplazada paramagnéticamente hasta δ_H 5.37, por lo tanto el residuo cafeilo se une en esa posición. Entonces el compuesto se caracterizó como ácido clorogénico (**8**).

En el caso de los compuestos **9** y **10** los espectros muestran una gran similitud con respecto a los del ácido clorogénico (**8**), sólo que el ácido quínico se encuentra esterificado por dos residuos de ácido cafeico. De tal manera que la región aromática de ambos compuestos en los espectros de RMN presenta un mayor número de señales, mismas que se asignaron mediante los espectros HSQC y COSY como se indica en el cuadro 13.

En el caso del compuesto **9**, las señales de H-5 [δ_H 5.72-5.61 (m)] y H-4 [δ_H 5.10 (dd, $J= 9.8, 2.8$ Hz)] se encuentran desplazadas paramagnéticamente, sugiriendo que los residuos de cafeico se encuentran esterificando los hidroxilos de esas posiciones. Por otro lado, en el compuesto **10**, las señales desplazadas paramagnéticamente son los metinos geminales a los hidroxilos en C-5 y C-3 [δ_H 5.59-5.50 (m), 5.38 (dd, $J= 6.5, 3.1$)], indicando que en este caso los residuos de cafeico se encontraban esterificando los hidroxilos de esas posiciones. En consecuencia los compuestos **9** y **10**, se caracterizaron como los ácidos 4,5-*O*-dicafeoilquínico y 3,5-*O*-dicafeoilquínico, respectivamente.

Cuadro 11. Datos de RMN* de ^1H y ^{13}C de los compuestos **1** y **3**

	1		3	
	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> en Hz)
2	159.1		157.1	
3	135.7		134.0	
4	175.9		178.1	
5	161.1		161.7	
6	97.9	6.18 (d, 1.9)	98.4	6.11 (d, 2.1)
7	164.2		164.6	
8	93.0	6.39 (d, 1.9)	93.3	6.31 (d, 2.1)
8a	103.1		157.6	
4a	156.8		104.5	
1'	146.6		121.4	
2'	129.2	8.08 (d, 8.9)	130.8	7.96 (d, 9.0)
3'	114.9	6.90 (d, 8.9)	114.6	6.79 (d, 9.0)
4'	159.9		160.1	
5'	114.8	6.90 (d, 8.9)	114.6	6.79 (d, 9.0)
6'	129.2	8.08 (d, 8.9)	130.8	7.96 (d, 9.0)
1''			102.6	5.15 (d, 7.6)
2''			74.3	3.37-3.28 (m)
3''			76.6	3.37-3.28 (m)
4''			69.9	3.24-3.21 (m)
5''			77.0	3.14-3.07 (m)
6''			61.2	3.59 (dd, 2.4, 11.9) 3.43 (dd, 5.5, 11.9)

* 100 MHz y 400 MHz, CD_3OD .

Cuadro 12. Datos de RMN* de ^1H y ^{13}C de los compuestos **2**, **4**, **5** y **6**

	2		4		5		6	
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
2	156.8		157.0		157.2		157.9	
3	135.8		134.3		134.2		134.2	
4	175.9		178.1		177.9		178.0	
5	161.1		161.6		161.6		161.5	
6	97.8	6.20 (d, 2.0)	98.5	6.20 (d, 2.0)	98.7	6.18 (d, 2.1)	98.6	6.20 (d, 2.1)
7	164.1		164.7		165.3		164.6	
8	93.0	6.38 (d, 2.0)	93.3	6.39 (d, 2.0)	93.4	6.37 (d, 2.1)	93.4	6.39 (d, 2.1)
8a	147.3		157.4		156.1		157.1	
4a	103.1		104.0		104.0		104.2	
1'	127.3		121.4		121.6		121.7	
2'	114.8	7.70 (d, 2.1)	116.1	7.83 (d, 2.1)	116.0	7.73 (d, 2.2)	116.3	7.66 (d, 2.2)
3'	144.8		144.4		144.6		144.4	
4'	145.6		148.6		148.5		148.4	
5'	114.6	6.90 (d, 8.5)	114.7	6.86 (d, 8.5)	114.7	6.86 (d, 8.5)	114.6	6.87 (d, 8.5)
6'	122.7	7.60 (dd, 2.1, 8.5)	121.5	7.58 (dd, 2.2, 8.5)	121.5	7.57 (dd, 2.2, 8.5)	122.1	7.62 (dd, 2.2, 8.5)
1''			104.2	5.17 (d, 7.4)	103.3	5.14 (d, 6.6)	103.3	5.10 (d, 7.6)
2''			68.6	3.92-3.75 (m)	71.4	3.89 (dd, 6.6, 8.4)	74.3	3.49-3.38 (m)
3''			75.8	3.50-3.44 (m)	72.7	3.63 (dd, 3.2, 8.4)	75.8	3.49-3.38 (m)
4''			73.7	3.59-3.51 (m)	67.7	3.81-3.77 (m)	70.6	3.49-3.38 (m)
5''			71.8	3.92-3.75 (m)	65.5	3.85-3.82 (m)	76.8	3.49-3.38 (m)
6''			60.5	3.67-3.60 (m) 3.59-3.51 (m)		3.44 (dd, 3.0, 13.3)	67.1	3.80 (dd, 1.1, 10.8) 3.32 (m)
1'''							101.0	4.52 (d, 1.5)
2'''							70.7	3.63 (dd, 1.7, 3.4)
3'''							70.8	3.53 (dd, 3.4, 9.5)
4'''							72.5	3.26 (m)
5'''							68.3	3.37 (m)
6'''							16.5	1.12 (d, 6.2)

 * 100 MHz y 400 MHz, CD_3OD .

Cuadro 13. Datos de RMN* de ^1H y ^{13}C de los compuestos **8**, **9** y **10**

	8		9		10	
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
2	36.3	2.08-1.94 (m)	37.3	2.12-1.95 (m)	36.3	2.14-2.03 (m)
3	70.0	4.15(s)	68.9	4.33 (d, 2.1)	73.9	5.38 (dd, 3.1, 6.5)
4	72.1	3.70 (dd, 2.7, 9.2)	75.3	5.10 (dd, 2.8, 9.8)	74.9	3.90 (dd, 3.5, 9.9)
5	69.7	5.40-5.30 (m)	67.9	5.72-5.61 (m)	71.9	5.59-5.50 (m)
6	37.5	2.23-2.10 (m)	38.9	2.34-2.18 (m)	39.7	2.31-2.20 (m)
7	166.7		177.6		180.2	
1'	166.7		167.2		168.0	
2'	113.2	6.30 (d, 15.9)	113.4	6.26 (d, 15.9)	114.7	6.36 (d, 15.9)
3'	144.7	7.56 (d, 15.9)	146.2	7.58 (d, 15.9)	145.4	7.60 (dd, 9.2, 15.9)
4'	125.6		126.3		126.7	
5'	112.9	7.04 (d, 1.7)	113.7	6.99 (dd, 2.0, 8.4)	113.7	7.06 (dd, 1.9, 9.2)
6'	144.5		145.3		145.3	
7'	147.3		148.2		148.1	
8'	114.2	6.77 (d, 8.2)	115.0	6.73 (dd, 2.8, 8.1)	115.1	6.78 (d, 8.1)
9'	120.7	6.93 (dd, 1.8, 8.2)	121.9	6.89 (dd, 6.7, 8.4)	121.5	6.96 (dd, 5.9, 8.1)
1''			167.0		167.6	
2''			113.4	6.26 (d, 15.9)	114.2	6.26 (d, 15.9)
3''			146.0	7.58 (d, 15.9)	145.4	7.60 (dd, 9.2, 15.9)
4''			126.2		126.5	
5''			113.7	6.99 (dd, 2.0, 8.4)	113.7	7.06 (dd, 1.9, 9.2)
6''			145.3		145.3	
7''			148.2		147.9	
8''			115.0	6.73 (dd, 2.8, 8.1)	115.0	6.78 (d, 8.1)
9''			121.7	6.89 (dd, 6.7, 8.4)	121.5	6.96 (dd, 5.9, 8.1)

 * 100 MHz y 400 MHz, CD_3OD .

6.3 Establecimiento del perfil cromatográfico mediante CLUE

Por definición, la huella digital cromatográfica de una droga cruda o preparado herbolario es un patrón cromatográfico de los componentes farmacológicamente activos y/o químicamente característicos presentes en éstos (State Drug Administration of China, 2000; Li, *et al.*, 2007). Tradicionalmente se empleaban sólo unos pocos marcadores de los constituyentes farmacológicamente activos para evaluar la calidad y la autenticidad de las drogas crudas y fitomedicamentos; sin embargo, los efectos terapéuticos de los mismos se basan en la interacción compleja de numerosos componentes, a diferencia de los medicamentos alopáticos, lo que ha hecho necesario el empleo de la cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), y técnicas acopladas (CLAE-DAD, CG-EM, CLAE-EM, CLAE-RMN), para determinar simultáneamente estos compuestos. Recientemente la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (CLUE) se ha convertido en una herramienta valiosa para la detección de analitos presentes en niveles traza y para el análisis de un gran número de muestras. Esta técnica, que tiene una mayor sensibilidad, resolución más alta y un tiempo de ejecución más corto que el de la CLAE ha adquirido gran popularidad en el establecimiento de perfiles cromatográficos de productos herbolarios (Chen, *et al.*, 2008; Deng, *et al.*, 2008). De tal forma que el análisis mediante un perfil cromatográfico de alto rendimiento representa un enfoque cualitativo integral con el propósito de la autenticación de las especies, la evaluación de la calidad y garantizar la consistencia y estabilidad de los fitomedicamentos y productos relacionados. El patrón completo de compuestos puede, entonces, ser evaluado para determinar no sólo la presencia o ausencia de los marcadores o constituyentes activos deseados, si no como el conjunto completo de las relaciones entre todos los analitos detectables (Liang *et al.*, 2004; Alaert *et al.*, 2010).

Una vez que se aislaron los compuestos **1-10**, a partir de la fracción de AcOEt proveniente de la infusión de *H. seemannii*, se llevó a cabo la búsqueda de las condiciones idóneas para el establecimiento del perfil cromatográfico mediante CLUE; este servirá como prueba de identidad en el eventual proceso de control de calidad de la planta.

La optimización de las condiciones cromatográficas se realizó tomando en cuenta que los productos mayoritarios de la infusión son de naturaleza flavonoide y derivados del ácido cafeico. De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, en la mayoría de los casos, los autores reportan

obtener buenas separaciones de este tipo de compuestos empleando fase reversa (C_{18}) y un modo de elución en gradiente con variaciones en los soportes y los sistemas de elución (Deng, *et al.*, 2008; Ignat, *et al.*, 2011; Li, *et al.*, 2007; Suan Chua, *et al.*, 2011; Zu, *et al.*, 2006; etc.). En consecuencia se optó por emplear una columna C_{18} y un modo de elución en gradiente lineal. Para establecer la mezcla de elución se ensayaron sistemas de ACN– H_2O , MeOH– H_2O , (ACN– H_2O , 4:6)– H_2O y (ACN–MeOH, 2:8)– H_2O en distintas proporciones, agregando diferentes ácidos orgánicos a la fase acuosa para minimizar el ensanchamiento y el coleo de los picos. Se ensayaron varias concentraciones de ácido fórmico (0.1-0.5%) y ácido acético (0.1-1%), así como distintas velocidades de flujo (0.2, 0.3, 0.35 y 0.4 mL/min).

El mejor sistema resultó ser el de MeOH- H_2O +0.4% ácido acético así que el gradiente de elución se estableció variando las proporciones de esta mezcla; se observó que a una concentración de MeOH menor al 30% o mayor al 40% no se lograba la separación de los analitos; en el primer caso debido a la alta retención de la muestra, y en el segundo debido a la falta de retención de la misma. Así se estableció un gradiente en el cual la concentración de MeOH llegara a un máximo de 35%, permitiendo una retención satisfactoria. Entonces la mejor separación de los analitos se logró con MeOH como fase orgánica y ácido acético 0.4% como fase acuosa en proporciones de 19:81 y 35:65, a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. Estas condiciones presentaron la mejor resolución de la muestra en un buen tiempo de análisis. La separación de los flavonoides y ácidos cafeoilquínicos se completó en 20 minutos lo cual es varias veces más rápido que lo reportado para CLAE (aproximadamente 30-70 min) [Inbaraj *et al.*, 2010; Prokudina *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2008].

La presencia de los compuestos **3-5**, **8** y **10** se corroboró mediante la coelución de estándares puros con una muestra de la fracción de AcOEt de la infusión de *H. seemanii*, y se estableció el ácido 3,5-dicafeoilquínico (**10**) como compuesto mayoritario, seguido de la isoquercetina (**4**) y el ácido clorogénico (**8**). En la Figura 13 se muestra el perfil cromatográfico obtenido.

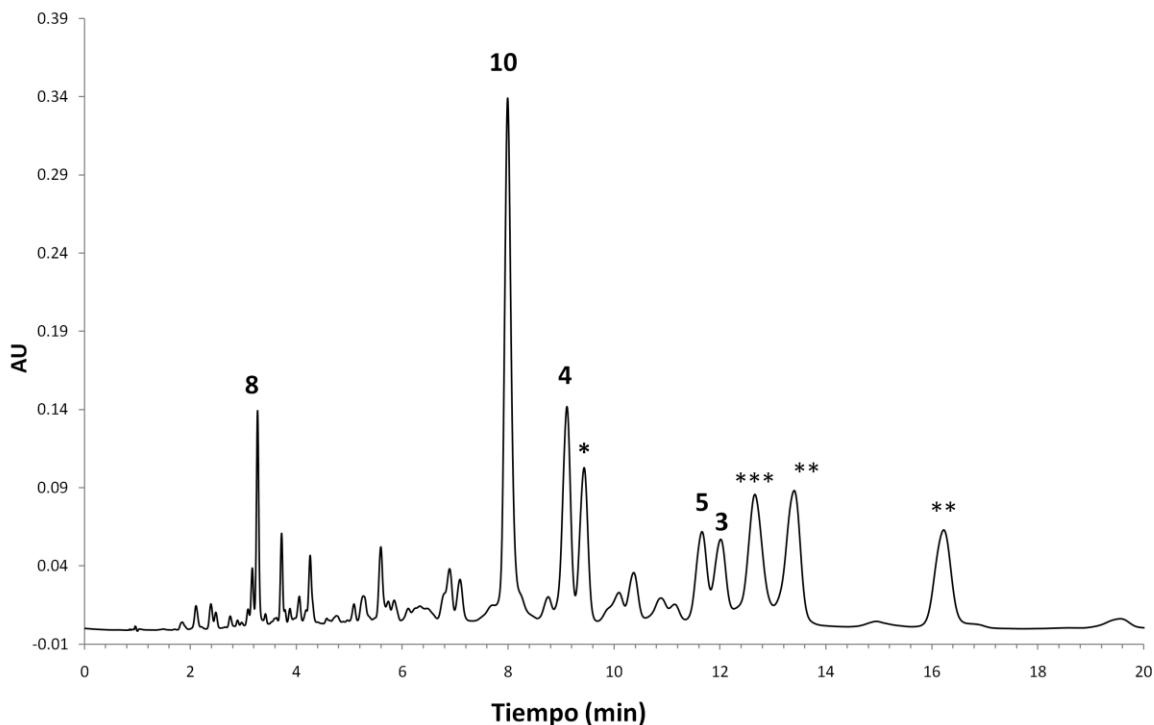


Figura 13. Perfil cromatográfico por CLUE de la fracción de ACOEt de la infusión de *H. seemanni*. Columna BHE[®] Shield RP18 (100 mm x 2.1 mm x 1.7 μm). Fase móvil, (A) MeOH y (B) H₂O+CH₃COOH 0.4%. Gradiente de elución, A, 19-35%, 0-1.0 min; elución isocrática de A, 35%, 1.0-18.0 min; A, 35-19%, 18.0-20.0 min. Velocidad de flujo, 0.30 mLmin⁻¹, Volúmen de inyección, 5 μL . *Derivado de quercetina; **Derivado de camperol; ***Derivado del ácido cafeoilquinico.

Cuadro 144. Tiempo de retención y λ_{max} de absorción de los compuestos mayoritarios presentes en el perfil cromatográfico

t_R (min)	λ_{max} (nm)	Compuesto
3.262	325.5, 243.4	Ácido clorogénico (8)
8.014	326.4, 243.8	Ácido 3,5-DCQ (10)
9.109	364.2, 254.5	Isoquercetina (4)
9.426	364.2, 255.3	Derivado de quercetina (*)
11.655	361.4, 254.1	3- <i>O</i> - β -L-arabinopiranosido de quercetina (5)
12.014	364.3, 263.6	Astragalina (3)
12.666	325.6, 243.8	Derivado de ácido CQ (***)
13.415	364.2, 264.8	Derivado de camperol (**)
16.240	364.4, 264.8	Derivado de camperol (**)

6.4 Propiedades hipoglucemiantes y antihiper glucémicas de los compuestos aislados de la infusión de *Hydrangea seemannii*

La presencia en *Hydrangea seemannii* de los flavonoides camperol (**1**), quercetina (**2**), astragalina (**3**), isoquercetina (**4**), 3-*O*- β -L-arabinopiranosido de quercetina (**5**), rutina (**6**) y nicotiflorina (**7**); y de los derivados del ácido cafeico [ácido clorogénico (**8**), ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (**9**) y ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (**10**)] permiten explicar los efectos hipoglucemiante y antihiper glucémico de la infusión que es la forma popular de consumo de la planta.

Los compuestos **1-10** presentan diferentes propiedades biológicas que les permiten interferir con un gran número de vías de señalización o procesos bioquímicos involucrados en la diabetes tipo 2, ó que mejoren la condición.

Uno de los mecanismos propuestos en la literatura, por el cual los flavonoides **1-7** y los compuestos **8-10** presentan propiedades antihiper glucemiantes es debido a su acción como inhibidores de las α -glucosidasas. En el Cuadro 15 se muestran algunos de los valores de IC₅₀ para estos compuestos hacia las α -glucosidasas reportados en la literatura.

En seguida se resumen algunos de los estudios realizados en los últimos años, reportados en la literatura especializada, sobre las propiedades hipoglucemiantes y antihiper glucémicas de los compuestos aislados.

De los productos aislados, quizás el **1** es el que ha recibido una mayor atención. Existen diversos estudios que demuestran la capacidad de la quercetina para mejorar y/o prevenir algunas de las condiciones de alteración metabólica que se presenta en la DMT2.

En experimentos realizados con ratas de la cepa Wistar con diabetes inducida (STZ), la quercetina (**1**) permitió la normalización de sus niveles de glucosa sanguínea, provocó un aumento del contenido de glucógeno en el hígado, la reducción significativa de los niveles de colesterol sérico, lípidos de baja densidad (LDL) y triglicéridos (TG) y mostró un aumento en la concentración de lípidos de alta densidad (HDL) [Nuraliev and Avezov, 1992; Torres-Piedra, *et al.*, 2010].

Cuadro 15. Valores de CI_{50} reportados en la literatura para los compuestos **1-10** como inhibidores de α -glucosidasas

Compuesto	CI_{50} (μM)			Referencias
	α -Glucosidasa de levadura	Sacarasa (intestino delgado de rata)	Maltasa (intestino delgado de rata)	
1	12			(Tadera, <i>et al.</i> , 2006)
		5.2×10^3	5.6×10^3	(Wang, Du, & Song, 2010)
2	7			(Tadera, <i>et al.</i> , 2006)
	17			(Qin Li, <i>et al.</i> , 2009)
		3.5×10^3	4.8×10^3	(Wang, Du, & Song, 2010)
3	662.9			(Tao, <i>et al.</i> , 2012)
4	88.7			(Wan, <i>et al.</i> , 2012)
	185			(Qin Li, <i>et al.</i> , 2009)
	462.1			(Tao, <i>et al.</i> , 2012)
6	196			(Qin Li, <i>et al.</i> , 2009)
9			890	(Gao, <i>et al.</i> , 2008)
10	99.9			(Wan, <i>et al.</i> , 2012)
			900	(Gao, <i>et al.</i> , 2008)

Vessal y colaboradores (2003) demostraron que la quercetina (**1**) administrada por vía intraperitoneal provoca un efecto hipoglucemiante, dosis-dependiente en ratas (Wistar) diabéticas; sin embargo, no afecta los niveles de glucosa en ratas normoglucémicas de la misma cepa. En pruebas de tolerancia a la glucosa, los tratamientos con el flavonol provocaron una disminución importante del pico postprandial en las ratas diabéticas. Además, los autores demostraron los efectos hipolipemiantes y el incremento de la actividad de la glucocinasa hepática provocados por **1**. Durante el análisis histopatológico de los tejidos de los animales que utilizaron en el estudio, no se observaron cambios en los hepatocitos o en los túbulos y glomérulos renales, pero sí un incremento significativo del número de islotes pancreáticos en los grupos de animales normoglucémicos y diabéticos tratados con la quercetina. De manera que ellos atribuyeron la disminución de glucosa plasmática, colesterol y TG, provocadas por este compuesto, a una regeneración de las células beta pancreáticas y al aumento de la liberación de insulina (Vessal, Hemmati, & Vasei, 2003).

El transportador de glucosa GLUT2 apical o luminal es una importante vía de absorción de azúcar, y por lo tanto un objetivo atractivo para agentes antidiabéticos potenciales. En este sentido, un estudio realizado por Kwon y colaboradores (2007), demostró que los flavonoles quercetina, miricetina, fisetina y su precursor isoquercetina presentan una inhibición no competitiva del transporte de glucosa y fructosa por GLUT2 expresado en oocitos de *Xenopus laevis*. Así mismo, el transporte de azúcar por GLUT2 sobreexpresado en células pituitarias y presente de forma natural en las células intestinales Caco-2E fue inhibido de manera similar por la quercetina (Kwon et al., 2007, Perez-Vizcaino & Duarte, 2010).

Por otra parte, Torres-Piedra y colaboradores (2010) propusieron que la quercetina induce una sensibilización a la insulina mediante la disminución de los niveles de cortisol ya que el producto inhibe la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (11 β -HSD1); 11 β -HSD1 regula la acción de la hormona glucocorticoide en órganos blanco para la acción de la insulina y juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa. Este hallazgo es importante ya que numerosas evidencias han implicado a los glucocorticoides y a 11 β -HSD1 en la etiología

y / o mantenimiento de la diabetes y el síndrome metabólico (Hale & St. Jean, 2011; Webster & Pallin, 2007).

Cabe mencionar que la quercetina (**1**) disminuye el estrés oxidativo, con lo que se promueve la conservación de las células β -pancreáticas (Coskun, *et al.*, 2005).

Al igual que la quercetina, la isoquercetina (**4**) también es un potente inhibidor de las α -glucosidasas (Wan, *et al.*, 2012; Qin Li, *et al.*, 2009; Tao, *et al.*, 2012). Además, en estudios realizados utilizando un modelo animal de diabetes tipo 2 (ratón KK- A^y), este producto provocó una disminución de la concentración en sangre de: glucosa, C-péptido plasmático, triglicéridos y colesterol; también mejoró la tolerancia a la glucosa y promovió la inmunorreactividad de las células β pancreáticas. De manera que la isoquercetina tiene un papel en la regulación de los niveles de glucosa sanguínea así como de los lípidos y mejora la función de los islotes pancreáticos (Zhang, *et al.*, 2011). Por último, la isoquercetina inhibe el transportador SGLT-1, y en consecuencia la reabsorción de la glucosa en la nefrona y, a la postre la hiperglucemia.

Del mismo modo, diversos estudios muestran que el camperol (**1**) al igual que la quercetina tienen un efecto protector en ratas diabetizadas con STZ ya que disminuye el estrés oxidativo y ayudan en la preservación de la integridad de las células β pancreáticas. Además, mejoran significativamente el consumo de glucosa estimulado por insulina en adipocitos maduros 3T3-L1 (Xian-Kang F., *et al.*, 2007, Coskun, *et al.*, 2004).

Entre las propiedades biológicas reportadas de la rutina (**6**) están los efectos antihiper glucémico e hipoglucemiante en ratas diabéticas, debidos al incremento en la insulina y los niveles séricos de péptido C, el efecto protector sobre las células β pancreáticas mediado por sus propiedades antioxidantes, que reducen significativamente los daños ocasionados por la peroxidación de los ácidos grasos y proteínas, la restauración de contenido de glucógeno y actividad de hexoquinasa, la disminución de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa. El disacárido también inhibe la actividad de las maltasas de manera similar a la acarbosa siendo altamente específica para esta enzima, tiene efectos inhibitorios sobre α -glucosidasas y se ha demostrado, que al igual que la quercetina, este flavonoide es capaz de inhibir a la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) para reducir los niveles de glucemia e

incrementar la secreción de insulina (Li, *et al.*, 2009; Bansal *et al.*, 2011; Fontana Pereira, *et al.*, 2011).

Los flavonoides aislados presentan, además, efectos positivos sobre las principales complicaciones de la DMT2 o en la prevención de las mismas ya que, entre otras cosas, disminuyen la formación de los productos glicosilados (AGEs, por sus siglas en inglés). Estos productos se acumulan rápidamente en individuos con diabetes mellitus causando principalmente daño vascular. En un estudio realizado por Hyun y colaboradores en el 2010, los flavonoles quercetina (**2**), isoquercetina (**4**), astragalina (**3**) y guayaverina (3-*O*- α -L-arabinopiranosido de quercetina), presentaron un efecto significativo en la inhibición de la formación de los AGEs. Cabe mencionar que en dicho estudio la isoquercetina mostró un efecto mayor que el del control positivo, aminoguanidina (Kim, *et al.*, 2011).

Aunado a todo lo antes mencionado, se ha reportado que los flavonoles quercetina e isoquercetina son inhibidores de la aldosa reductasa (AR), una oxidorreductasa citosólica monómerica, que cataliza la conversión de glucosa a sorbitol en un estado hiperglucémico (Brownlee, 2001). El sorbitol y sus metabolitos se acumulan en los nervios, la retina, y los riñones debido a su pobre penetración a través de las membranas y su ineficiente metabolismo, ocasionando retinopatías, neuropatía y nefropatía (Ah Jung, *et al.*, 2011).

Así mismo, la astragalina (**3**), disminuye la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) en la retina, el cual es un factor biológico crucial para el desarrollo de la retinopatía del diabético (Ke, *et al.* 2012).

Diversos estudios muestran que la ingesta de ácido clorogénico (**8**) disminuye las concentraciones de glucosa sanguínea en ratas con hiperglucemia inducida (Rodriguez de Sotillo & Hadley, 2002; Andrade-Cetto & Wiedenfeld, 2001). Por otra parte, un ensayo aleatorio en personas con diabetes tipo 2, reveló que el consumo de extractos de hojas de *Cecropia obtusifolia*, ricos en ácido clorogénico, disminuyó significativamente las concentraciones de glucosa plasmática (Herrera-Arellano, *et al.*, 2004).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar los efectos benéficos de ácido clorogénico en el metabolismo de la glucosa: (i) En primer lugar puede retrasar la absorción de

glucosa en el intestino y disminuir la producción de glucosa hepática a través de la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa (Glc-6-Pasa), enzima que cataliza la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato (Glc-6-P) en la etapa final de la gluconeogénesis y glucogenólisis. La Glc-6-Pasa se ha implicado como un factor importante en la producción de altos niveles de glucosa hepática en un estado diabético (Herling, *et al.*, 1999). En estudios en microsomas intactos Arion y colaboradores (1997) demostraron que el ácido clorogénico se une de manera específica y reversible a T1, una translocasa específica perteneciente al sistema multicomponente de la Glc-6-Pasa, y que media la penetración de la glucosa-6-fosfato a través de la membrana. (ii) En segundo término, la actividad antioxidante (Clifford, 1999) del ácido puede tener efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa, ya que el estrés oxidativo se vincula con el desarrollo de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. (iii) El fenilpropanoide puede también actuar como un agente quelante de metales y cambiar composición mineral del tejido suave (por ejemplo, un aumento de las concentraciones de magnesio en el hígado) en ratas, lo cual, según los autores, mejora la tolerancia a la glucosa (Rodríguez de Sotillo & Hadley, 2002). (iv) Por último, este ácido puede inhibir la formación de compuestos N-nitrosos en el tracto gastrointestinal (Clifford, 1999), compuestos que se cree pueden contribuir al desarrollo de la diabetes tipo 2 a través de efectos tóxicos sobre las células β (van Dam, *et al.*, 2002).

Recientemente Cho y colaboradores (2010) reportaron que el ácido clorogénico mejora el peso corporal, el metabolismo de los lípidos y los niveles de hormonas relacionadas con la obesidad en ratones alimentados con una dieta rica en grasas. En dicho estudio los ratones tratados con ácido clorogénico mostraron una reducción significativa del peso corporal, la masa grasa visceral, las concentraciones de triglicéridos (en el plasma, hígado y corazón) y de colesterol (en el plasma, tejido adiposo y el corazón) en comparación con el grupo control de alto contenido en grasas. Además, las actividades de la sintasa 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa de ácidos grasos y de la acil-CoA: colesterol aciltransferasa se encontraban significativamente reducidas, mientras que la actividad de β -oxidación de ácidos grasos y la expresión de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas α (PPAR α) en el hígado incrementó con respecto al grupo de alto contenido en grasas (Cho, *et al.*, 2010).

El extracto de semillas de achicoria (*Cichorium intybus* L.) rico en ácidos mono y especialmente dicafeilquínicos, entre ellos ácido clorogénico (8) y los ácidos 4,5-dicafeilquínico

(9) y 3,5-dicafeoilquínico (10), resultó ser más eficaz que la rutina en la mejora de los trastornos metabólicos inducidos en ratas mediante una dieta rica en grasas y fructosa. El extracto mejoró los niveles de glucemia, disminuyó la actividad de las enzimas microbianas α y β -glucosidasas y α y β -galactosidasas, así como de la enzima de la mucosa intestinal sacarasa, disminuyó el índice aterogénico y aumentó el estado antioxidante de la sangre (Jurgonski, *et al.*, 2012).

Por último, se ha demostrado que los ácidos cafeoilquínicos presentan actividades inhibitoras de maltasa y sacarasa, y su intensidad depende del número de residuos cafeoil, entre más residuos más fuerte es la inhibición (Matsui, *et al.*, 2004).

VII. CONCLUSIONES

Los estudios farmacológicos presentados en este trabajo demuestran el potencial hipoglucemiante y antihiper glucémico de *Hydrangea seemannii* y constituyen una aportación al conocimiento de su eficacia preclínica. Los resultados de la prueba de tolerancia a la sacarosa y del potencial hipoglucemiante de la infusión sugirieron la presencia inhibidores de las α -glucosidasas y principios hipoglucemiantes en la infusión.

El estudio químico de la infusión realizado en el presente trabajo, el primero en su tipo para la especie vegetal *Hydrangea seemannii*, permitió el aislamiento y la caracterización de los compuestos camperol (1), quercetina (2), astragalina (3), isoquercetina (4), 3-O- β -L-arabinopiranosido de quercetina (5), rutina (6), nicotiflorina (7), ácido clorogénico (8), ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico (9) y ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico (10). Todos estos productos poseen propiedades hipoglucemiantes y/o antihiper glucémicas demostradas, corroborándose así la hipótesis de trabajo.

La presencia de flavonoides y derivados del ácido cafeico tiene precedentes en el género *Hydrangea* ya que en las especies *H. intergrifolia* Hayata, *H. macrophylla*, *H. heteromalia* D. Don, *H. paniculata* Sieb, *H. aspera* D. Don, *H. arborescens* L., *H. quercifolia* Bartram, se reportó la identificación de quercetina y camperol, mientras que en la especie *H. serrata* var. *Thunbergii* se reportó la presencia de rutina, isoquercetina y ácido clorogénico. Estos datos sugieren que el género biosintetiza flavonoides de tipo flavonol y derivados del ácido cafeoilquínico.

Se generó un perfil cromatográfico preliminar que sentará las bases para el desarrollo de las pruebas de identidad y composición de la planta *H. seemannii*.

De acuerdo a los estudios realizados sobre los compuestos aislados se puede concluir que la infusión de *H. seemannii* contiene un conjunto de compuestos que regulan la homeostasis de la glucosa a través de múltiples mecanismos de acción y mediante una vía compleja de señalizaciones intracelulares. Así, los productos quercetina y rutina estimulan la secreción de insulina; todos los flavonoles aislados así como los tres ácidos cafeoilquínicos regulan la absorción de glucosa en el lumen intestinal provocada por una inhibición de la digestión y

absorción de carbohidratos, o un retraso del aumento postprandial de glucosa por la inhibición de α -glucosidasas; camperol, quercetina, rutina e isoquercetina mejoran la acción de la insulina; y, por último, la quercetina inhibe la producción hepática de glucosa debido a la inhibición de la 11β -HSD1. El efecto neto es entonces la sinergia de los diferentes constituyentes presentes en la infusión.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar Contreras, A., & Xolalpa Molina, S. (2002). La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. *Ciencia* , 24-35.

Aguilar Salinas, C. A. (2002). Avances en el tratamiento de la diabetes tipo 2. *Ciencia* , 63-71.

Ah Jung, H., Nurul Islam, M., Soo Kwon, Y., Eun Jin, S., Kyung Son, Y., Ju Park, J., y otros. (2011). Extraction and identification of three major aldose reductase inhibitors from *Artemisia montana*. *Food and Chemical Toxicology* , 49, 376–384.

Alaerts G., Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J. y Heyden Y. V. (2010). Recent Developments in Chromatographic Fingerprints From Herbal Products: Set-Up and Data Analysis. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 13, 900-922.

Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* , 99, 325–348.

Andrade-Cetto, A., & Wiedenfeld, H. (2001). Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* , 78, 145-149.

Arion, W. J., Canfield, W. K., C. Ramos, F., Schindler, P. W., Burger, H.-J., Hemmerle, H., y otros. (1997). Chlorogenic Acid and Hydroxynitrobenzaldehyde: New Inhibitors of Hepatic Glucose 6-Phosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 339 (2), 315–322.

Ashraf Taha, K., Fang-Rong, C., Yue-Han, L., Chung-Yi, C., Chih-Chuang, L., Patnam, R., y otros. (2003). Chemical Constituents from the *Hydrangea chinensis*. *Archives of Pharmacal Research* , 26, 15-20.

Bansal, P., Paula, P., Mudgala, J., Nayaka, P. G., Pannakal, S. T., Priyadarsini, K. I., y otros. (2012). Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* , 64, 651-658.

Barba de Piña Chan, B. (2002). Diabetes y medicina tradicional en México. *Ciencia* , 18-23.

Bate-Smith, E. C. (1978). Astringent tannins of *viburnum* and *hydrangea* species. *Phytochemistry* , 17, 267-270.

Bilous, R., & Donnelly, R. (2010). *Handbook of Diabetes*. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.

Brindis, F., Rodriguez, R., Bye, R., Gonzalez-Andrade, M., & Mata, R. (2011). (Z)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an alfa-Glucosidase inhibitor. *Journal of Natural Products* , 74, 314-320.

Brindis-Hernandez F., Evaluación de la eficacia antihiper glucémica de *Ligusticum porteri* Coult., *Hydrangea seemannii* L. Riley y *Anoda cristata* (L.) Schltld; Tesis de doctorado en Ciencias Químicas, Facultad de Química. UNAM. México, D.F. 2011.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* , 414, 813-820.

Brunton, L., Blumenthal, D., Buxton, I., & Parker, K. (2007). *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics* . McGraw-Hill Professional.

Chen, X., Ji, H., Zhang, Q., Tu, P., Wang, Y., Guo, B., y otros. (2008). A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in Epimedium using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 46, 226–235.

China, S. D. (2000). Technical requirements of the fingerprint in injection of Chinese Materia Medica. *Chin. Tradit. Pat. Med.* , 22:825.

Cho, A.-S., Jeon, S.-M., Kim, M.-J., Yeo, J., Seo, K.-I., Choi, M.-S., y otros. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology* , 48, 937–943.

Clifford, M. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 79, 362-372.

Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., & Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and b-cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research* , 51, 117–123.

Deng, X., Gao, G., Zheng, S., & Li, F. (2008). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in the leaves of *Isatis indigatica* Fort. by ultra-performance liquid chromatography with PDA and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 48, 562–567.

Fang-Rong, C., Yue-Han, L., Yu-Liang, Y., Pei-Wen, H., Ashraf T., K., Chung-Yi, C., y otros. (2003). Secoiridoid Glycoside and Alkaloid Constituents of *Hydrangea chinensis*. *Journal of Natural Products* , 66, 1245-1248.

Fontana Pereira, D., Cazarolli, L. H., Lavado, C., Mengatto, V., Guedes, A., Pizzolatti, M. G., y otros. (2011). Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition* , 27, 1161–1167.

Gao, H., Huang, Y.-N., Gao, B., Xu, P.-Y., Inagaki, C., & Kawabata, J. (2008). α -Glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food Chemistry* , 106, 1195–1201.

Guillén González, M. A. (2002). Diabetes mellitus: cómo se manifiesta, cómo evoluciona y cómo se complica. *Ciencia* , 54-62.

Haddad, P. S., Musallam, L., Martineau, L. C., Harris, C., Lavoie, L., Arnason, J. T., y otros. (2012). Comprehensive Evidence-Based Assessment and Prioritization of Potential Antidiabetic Medicinal Plants: A Case Study from Canadian Eastern James Bay Cree Traditional Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-14.

Hale, C., & St. Jean, D. (2011). 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 as a Therapeutic Target for Type 2 Diabetes. En M. W. (Editor), *Metabolic Syndrome: Underlying Mechanisms and Drug Therapies*. New Jersey: John Wiley & Sons.

Herling, A., Burger, H., Schubert, G., Hemmerle, H., Schaefer, H., & Kramer, W. (1999). Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. *European Journal of Pharmacology*, 386, 75-82.

Herrera-Arellano, A., Aguilar-Santamaria, L., Garcia-Hernandez, B., Nicasio-Torres, P., & Tortoriello, J. (2004). Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine*, 11, 561-566.

IDF. (s.f.). Recuperado el 06 de Marzo de 2013, de International Diabetes Federation: <http://www.idf.org>

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.

Inbaraj, B., Lu, H., Kao, T., & Chen, B. (2010). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 549-556.

INEGI. (s.f.). Recuperado el 08 de Marzo de 2013, de Instituto Nacional De Estadística y Geografía: <http://www.inegi.org.mx>

Jurgonski, A., Juskiewicz, J., Zdunczyk, Z., & Krol, B. (2012). Caffeoylquinic acid-rich extract from chicory seeds improves glycemia, atherogenic index, and antioxidant status in rats. *Nutrition*, 28, 300-306.

Ke, M., Hu, X.-Q., Ouyang, J., Dai, B., & Yancheng Xu, Y. (2012). The effect of astragalín on the VEGF production of cultured Müller cells under high glucose conditions. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 22, 113-119.

Kim, H. Y., Lee, J. M., Yokozawa, T., Sakata, K., & Lee, S. (2011). Protective activity of flavonoid and flavonoid glycosides against glucose-mediated protein damage. *Food Chemistry*, 126, 892-895.

Kurkin, V. A., Akushskaya, A., Avdeeva, E. V., Velmyaikina, E. I., Daeva, E. D., & Kadentsev, V. I. (2011). Flavonoids from *Echinacea purpurea*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 37, 905-906.

Kwon, O. E. (2007). Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB Journal*, 21, 366-377.

Li, W., Deng, Y., Dai, R., Yu, Y., Khalid Saeed, M., Li, L., y otros. (2007). Chromatographic fingerprint analysis of *Cephalotaxus sinensis* from various sources by high-performance liquid chromatography–diodearray detection–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 38-46.

Liang, Y. Z., Xie, P., & Chan, K. (2004). Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, 812 (1-2), 53–70.

Machha, A., Achike, F. I., Mohd Mustafa, A., & Rais Mustafa, M. (2007). Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas. *Nitric Oxide*, 16, 442-447.

Martínez Vizcaino, V., & Salcedo Aguilar, F. (1997). *Nuevas perspectivas en el tratamiento de la diabetes tipo II*. La Mancha: Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha.

Matsuda, H., Shimoda, H., Uemura, T., Ueda, T., & Yamahara, J. &. (1999). Chemical constituents from the leaves of *hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* (III): Absolute stereostructures of Hydramacrosides A and B, Secoiridoid glucoside complexes with inhibitory activity on Histamine release. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1753-1758.

Matsuda, H., Shimoda, H., Yamahara, J., & Yoshikawa, M. (1999). Effects of phyllodulcin, hydrangenol, and their 8-O-glucosides, and Thunberginols A and F from *Hydrangea macrophylla* SERINGE var. *thunbergii* MAKINO on passive cutaneous anaphylaxis reaction in rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 22 (8), 870-872.

Matsuda, H., Shimoda, H., Yamahara, J., & Yoshikawa, M. (1999). Effects of Phyllodulcin, Hydrangenol, and their 8-O-Glucosides, and Thunberginols A and F from *Hydrangea macrophylla* SERINGE var. *thunbergii* MAKINO on Passive Cutaneous Anaphylaxis Reaction in Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 22 (8), 870–872.

Matsuda, H., Shimoda, H., Yamahara, J., & Yoshikawa, M. (1998). Immunomodulatory activity of thunberginol a and related compounds isolated from *hydrangeae dulcis folium* on splenocyte proliferation activated by mitogens. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8 (3), 215–220.

Matsuda, H., Wang, Q., Matsuhira, K., Nakamura, S., Yuan, D., & Yoshikawa, M. (2008). Inhibitory Effects of Thunberginols A and B Isolated from *Hydrangeae Dulcis Folium* on mRNA Expression of Cytokines and on Activation of Activator Protein-1 in RBL-2H3 Cells. *Phytomedicine*, 15 (3), 177–184.

Matsui, T., Ebuchi, S., Fujise, T., Abesundara, K., Doi, S., Yamada, H., y otros. (2004). Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-o-caffeoylquinic acid. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1797-1803.

Oki, T., Matsui, T., & Osajima, Y. (1999). Inhibitory Effect of α -Glucosidase Inhibitors Varies According to Its Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 550–553.

OMS. (s.f.). Recuperado el 08 de Marzo de 2013, de Organización Mundial de la Salud: www.who.int

Perez-Vizcaino, F., & Duarte, J. (2010). Flavonols and cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 478–494.

Prokudina, E., Lanková, P., Koblovská, R., Al-Maharik, N., & Lapčík, O. (2011). Development of sorbents for immunoaffinity extraction of isoflavonoids. *Phytochemistry Letters*, 4, 113–117.

Qin Li, Y., Zhou, F. C., Gao, F., Sheng Bian, J., & Shan, F. (2009). Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of α -Glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 11463–11468.

R. M. Perez G., M. A. (1998). Antidiabetic effect of compounds isolated from plants. *Phytomedicine*, 5 (1), 55-75.

Rodriguez de Sotillo, D., & Hadley, M. (2002). Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 717-726.

Sarabu, R., & Tilley, J. (2005). Recent Advances in Therapeutic Approaches to Type 2 Diabetes. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 40, 167–181.

Shaw, J., Sicree, R., & Zimmet, P. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87, 4-14.

Sheng Feng, W., Li Zhang, Y., Xiao, K. Z., Bo, Z., Li, G. Y., & Zhen, L. (2010). A new flavonol glycoside from *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Seringe. *Chinese Chemical Letters*, 21, 690–692.

Su, J., Fu, P., Shen, Y., Zhang, C., Liang, M., Liu, R., y otros. (2008). Simultaneous analysis of flavonoids from *Hypericum japonicum* Thunb. ex Murray (Hypericaceae) by HPLC-DAD-ESI/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 342–348.

Suan Chua, L., Abdul Latiff, N., Yean Lee, S., Tin Lee, C., Roji Sarmidi, M., & Abdul Aziz, R. (2011). Flavonoids and phenolic acids from *Labisia pumila* (Kacip Fatimah). *Food Chemistry*, 127, 1186–1192.

Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52, 149-153.

Tao, Y., Zhang, Y., Cheng, Y., & Wang, Y. (2012). Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomedical Chromatography*.

Torres-Piedra, M., Ortiz-Andrade, R., Villalobos-Molina, R., Singh, N., Medina-Franco, J. L., Webster, S. P., y otros. (2010). A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin/nicotinamide induced diabetic rats: Quercetin as a potential antidiabetic agent acting via

11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry* , 45, 2606-2612.

van Dam, R. (2006). Coffee and type 2 diabetes: From beans to beta-cells. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* , 16, 69e77.

van Dam, R., Willett, W., Rimm, E., Stampfer, M., & Hu, F. (2002). Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care* , 25, 417-424.

Vessal, M., Hemmati, M., & Vasei, M. (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* , 135, 357–364.

Wan, C., Yuan, T., Cirello, A. L., & Seeram, N. P. (2012). Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers. *Food Chemistry* , 135, 1929–1937.

Wang, H., Du, Y.-J., & Song, H.-C. (2010). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry* , 123, 6-13.

Wang, Z.-B., Gao, H.-Y., Yang, C.-J., Sun, Z., & Wu, L.-J. (2011). Novel Cyanoglucosides from the Leaves of *Hydrangea macrophylla*. *Helvetica Chimica Acta* , 94, 847-852.

Webster, S. P., & Pallin, T. D. (2007). 11 β hydroxysteroid dehydrogenasetype1 inhibitors as therapeutic agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* , 17, 1407-1422.

Wein, S., Behm, N., Petersen, R. K., Kristiansen, K., & Wolffram, S. (2010). Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR- α independent mechanism. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* , 41, 16–22.

WHO. (2006). *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia :report of a WHO/IDF consultation*. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services.

Yagi, A., Ogata, Y., Yamauchi, T., & Nishioka, I. (1977). Metabolism of phenylpropanoids in *Hydrangea serrata* var. *thunbergii* and the biosynthesis of phyllodulcin. *Phytochemistry* , 16, 1098-1100.

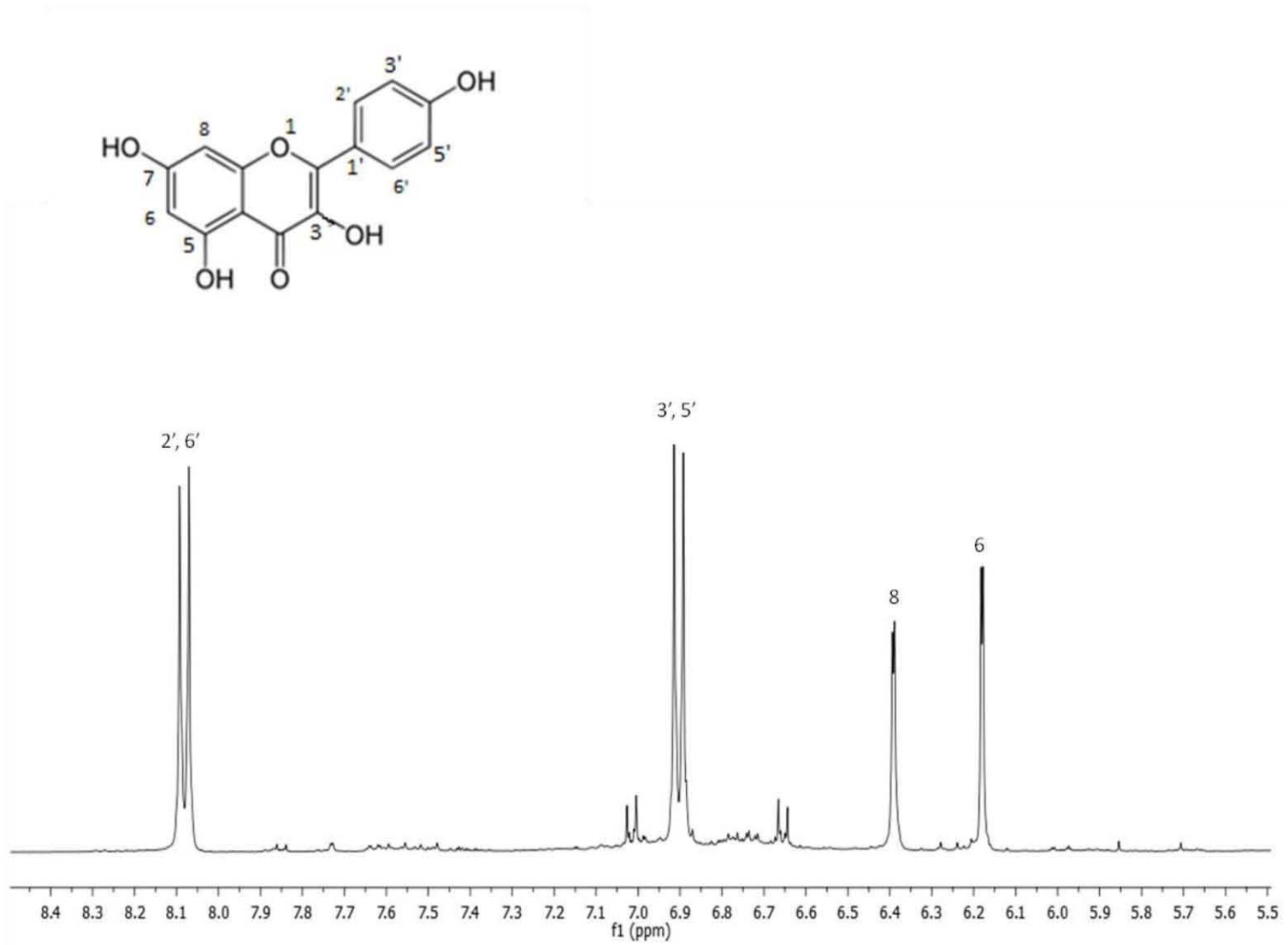
Yamahara, J., Matsuda, H., Shimoda, H., Wariishi, N., Yagi, N., Murakami, N., y otros. (1995). Effects of thunberginol a contained in *Hydrangeae dulcis* forium on types I-IV allergies. *Folia pharmacologica Japonica* , 105 (5), 365–379.

Yoshikawa, M., Uchida, E., Chatani, N., Kobayashi, H., Naitoh, Y., Okuno, Y., y otros. (1992). Thunberginols C, D, and E, New Antiallergic and Antimicrobial Dihydroisocoumarins, and Thunberginol G 3'-O-Glucoside and (-)-Hydrangenol 4'-O-Glucoside, New Dihydroisocoumarin Glycosides, from *Hydrangeae Dulcis Folium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* , 40 (12), 3352–3354.

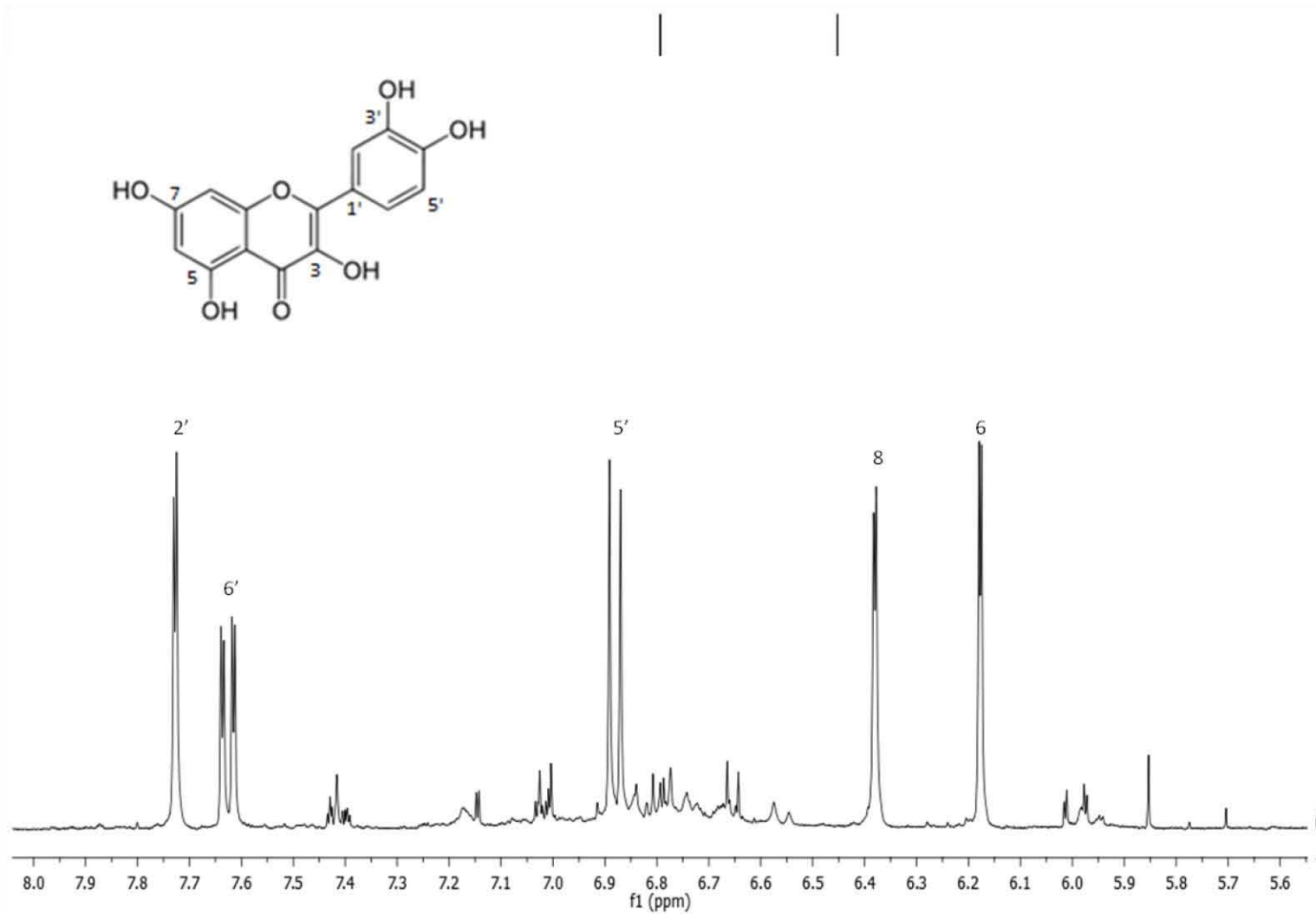
Zhang, H., Matsuda, H., Kumahara, A., Ito, Y., Nakamura, S., & Yoshikawa, M. (2007). New type of anti-diabetic compounds from the processed leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* (*Hydrangeae Dulcis Folium*). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *17*, 4972–4976.

Zhang, H., Matsuda, H., Yamashita, C., Nakamura, S., & Yoshikawa, M. (2009). Hydrangeic acid from the processed leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* as a new type of anti-diabetic compound. *European Journal of Pharmacology*, *606*, 255–261.

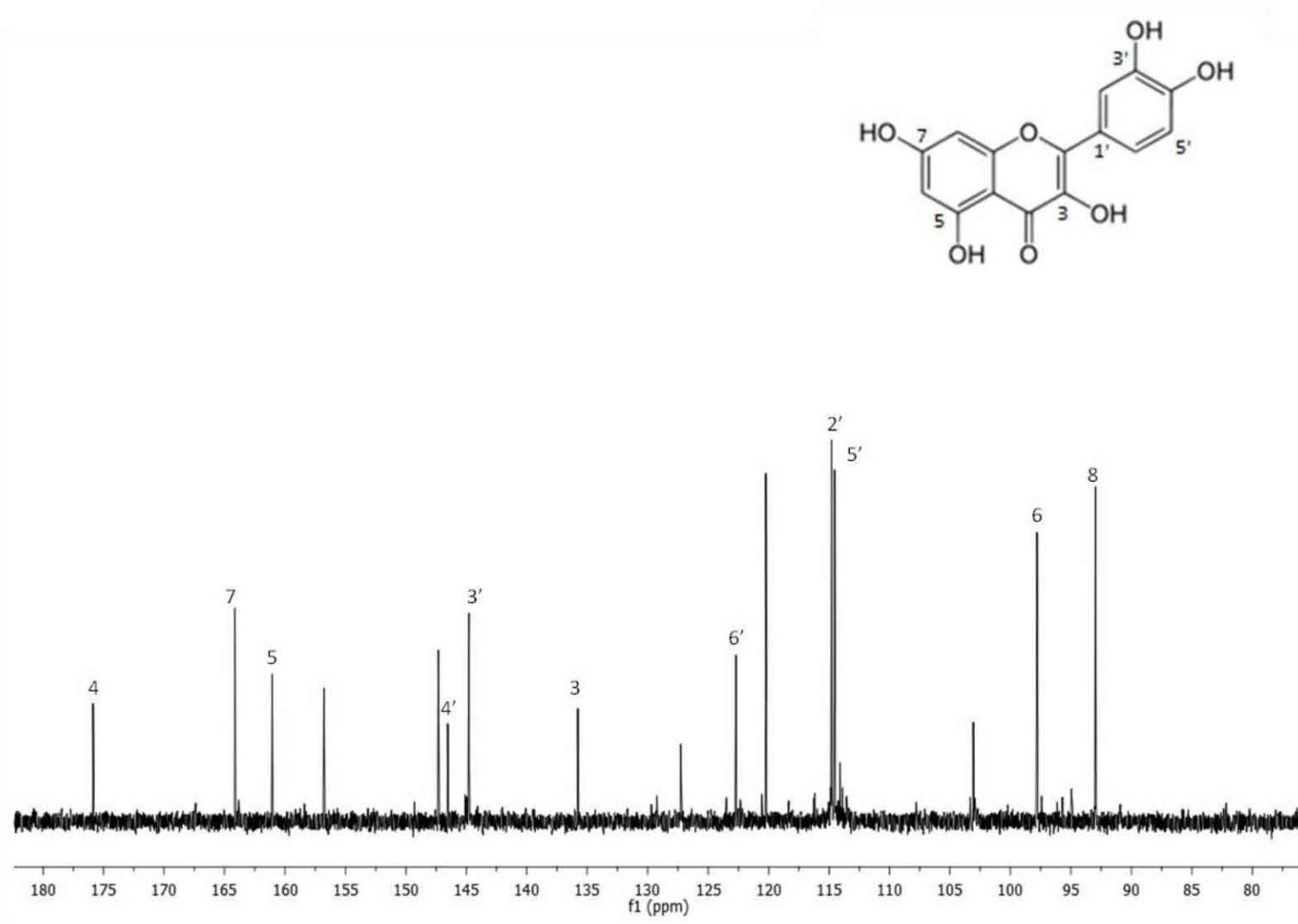
Zu, Y., Li, C., Fu, Y., & Zhao, C. (2006). Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*, 714–719.



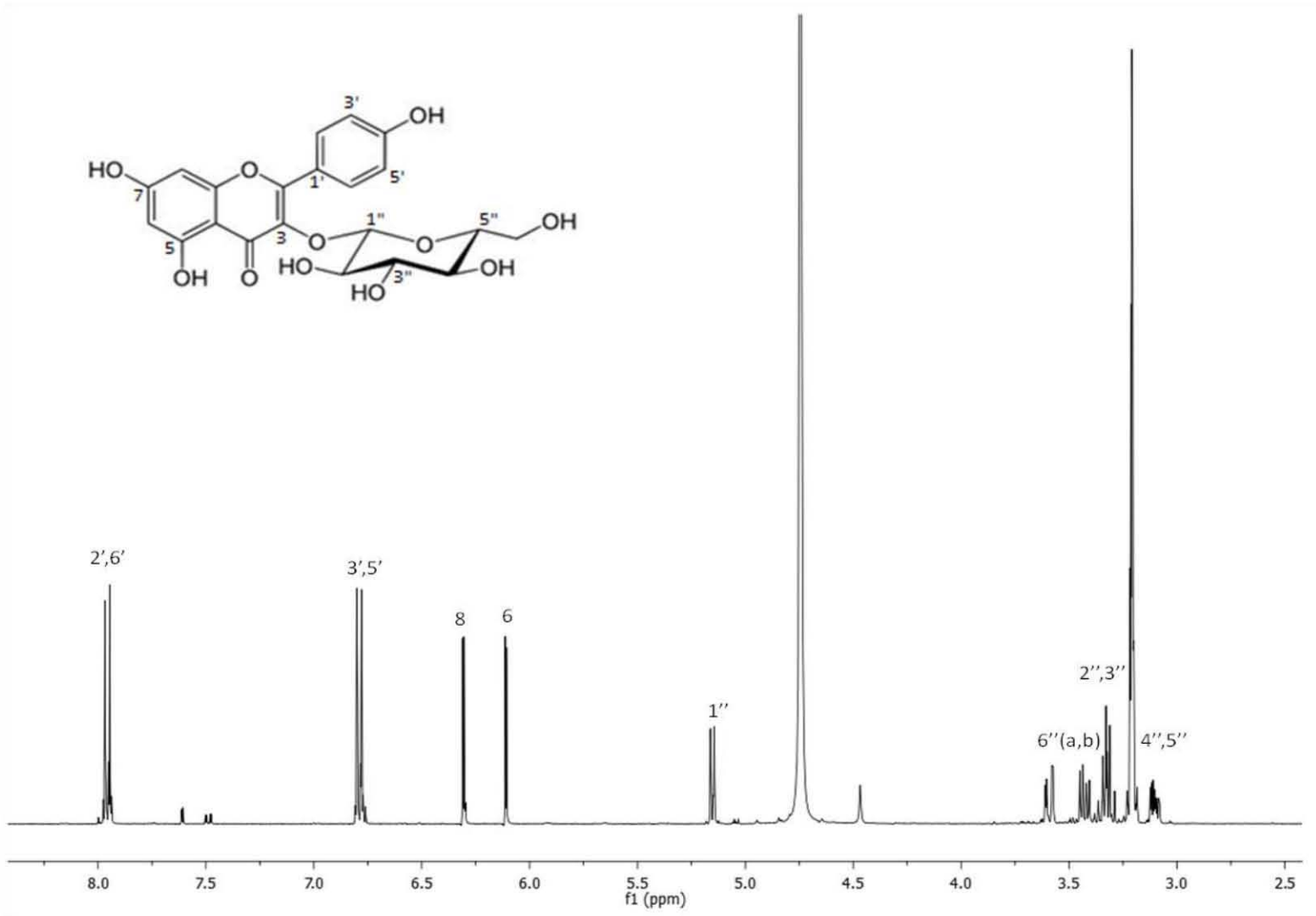
ESPECTRO 1. RMN- ^1H (400 MHz, MeOD) de camperol (**1**)



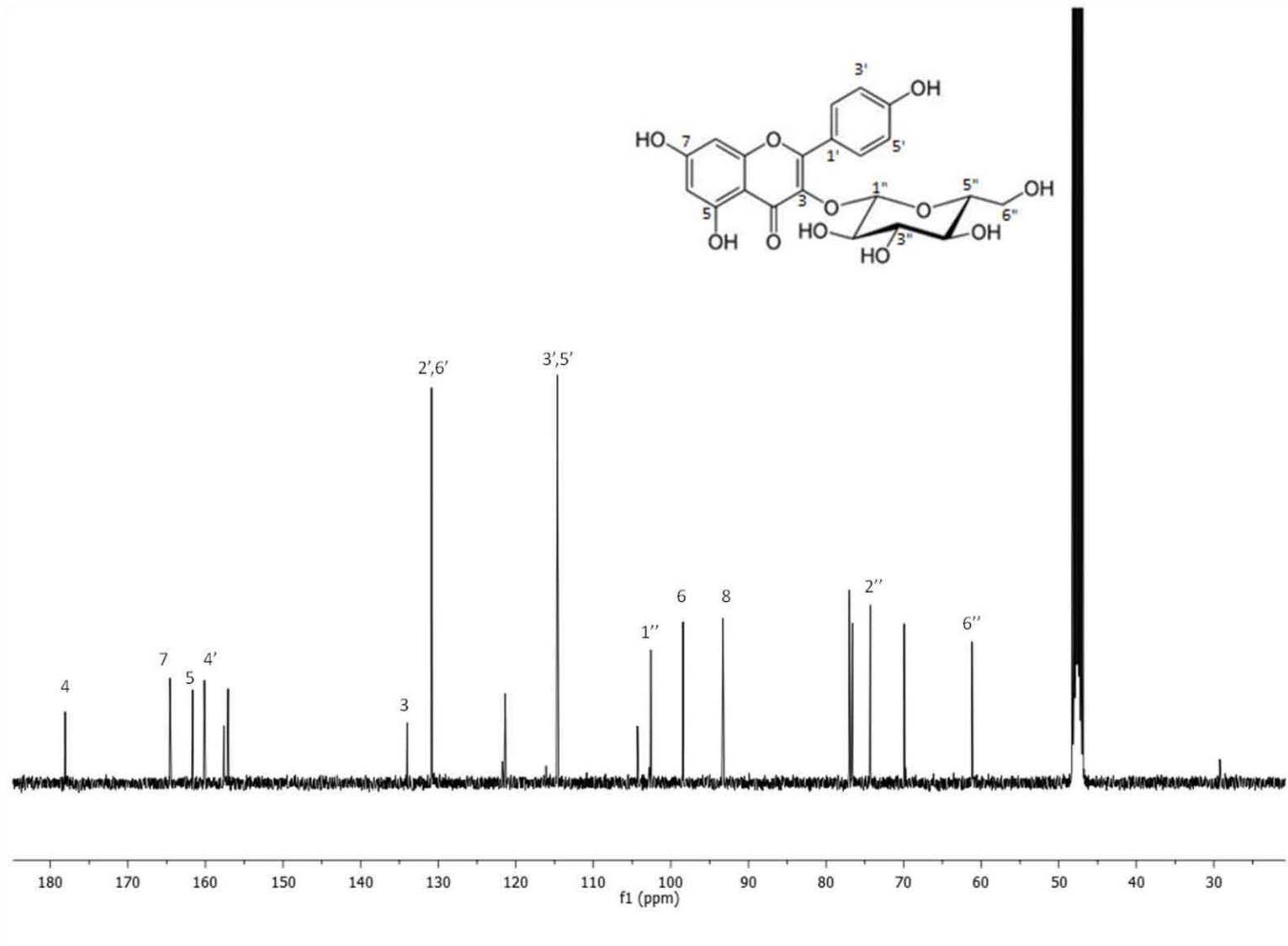
ESPECTRO 2. RMN- ^{13}C (100 MHz, MeOD) de camperol (**1**)
ESPECTRO 3. RMN- ^1H (400 MHz, MeOD) de quercetina (**2**)



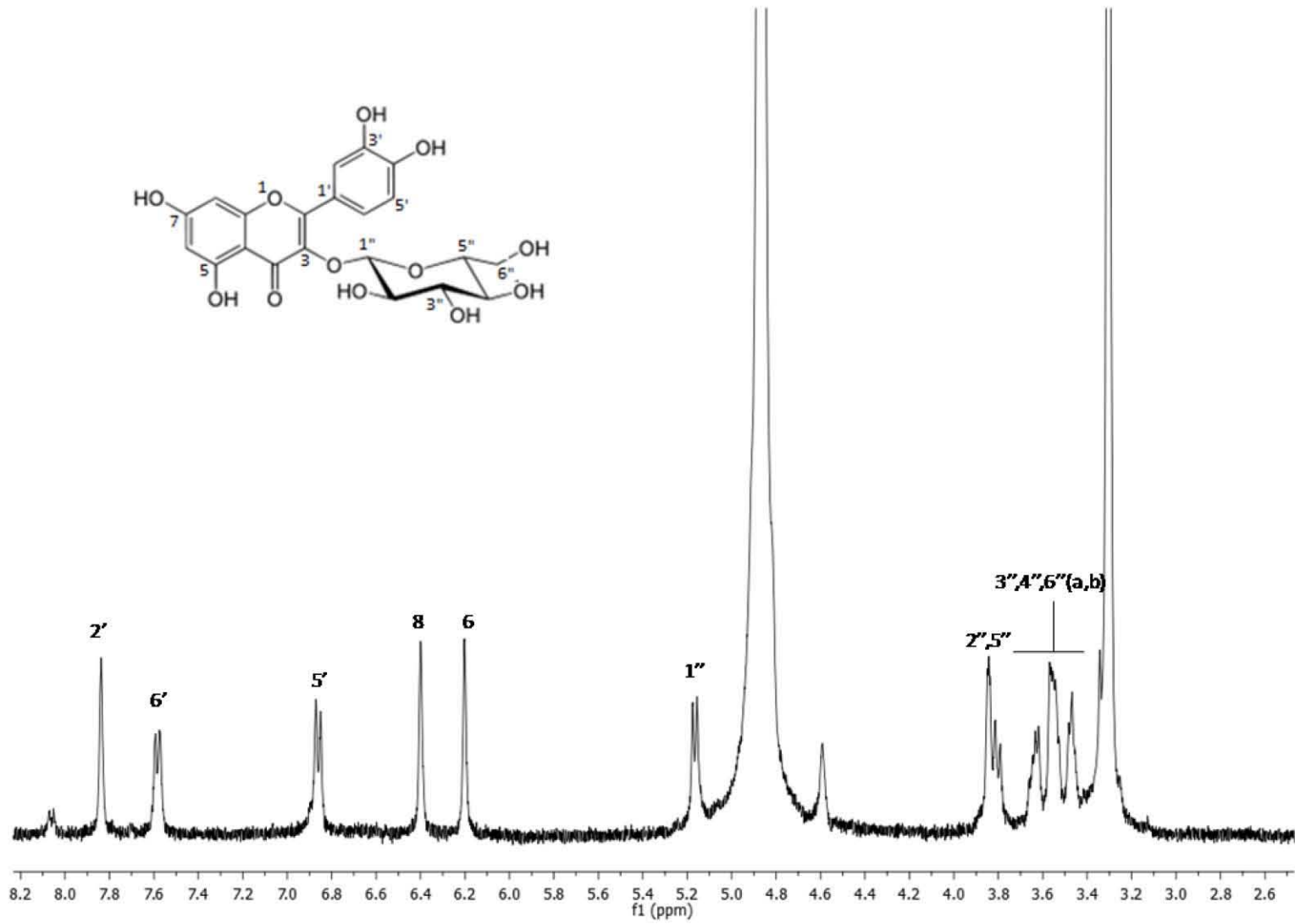
ESPECTRO 4. RMN- ^{13}C (100 MHz, MeOD) de quercetina (2)



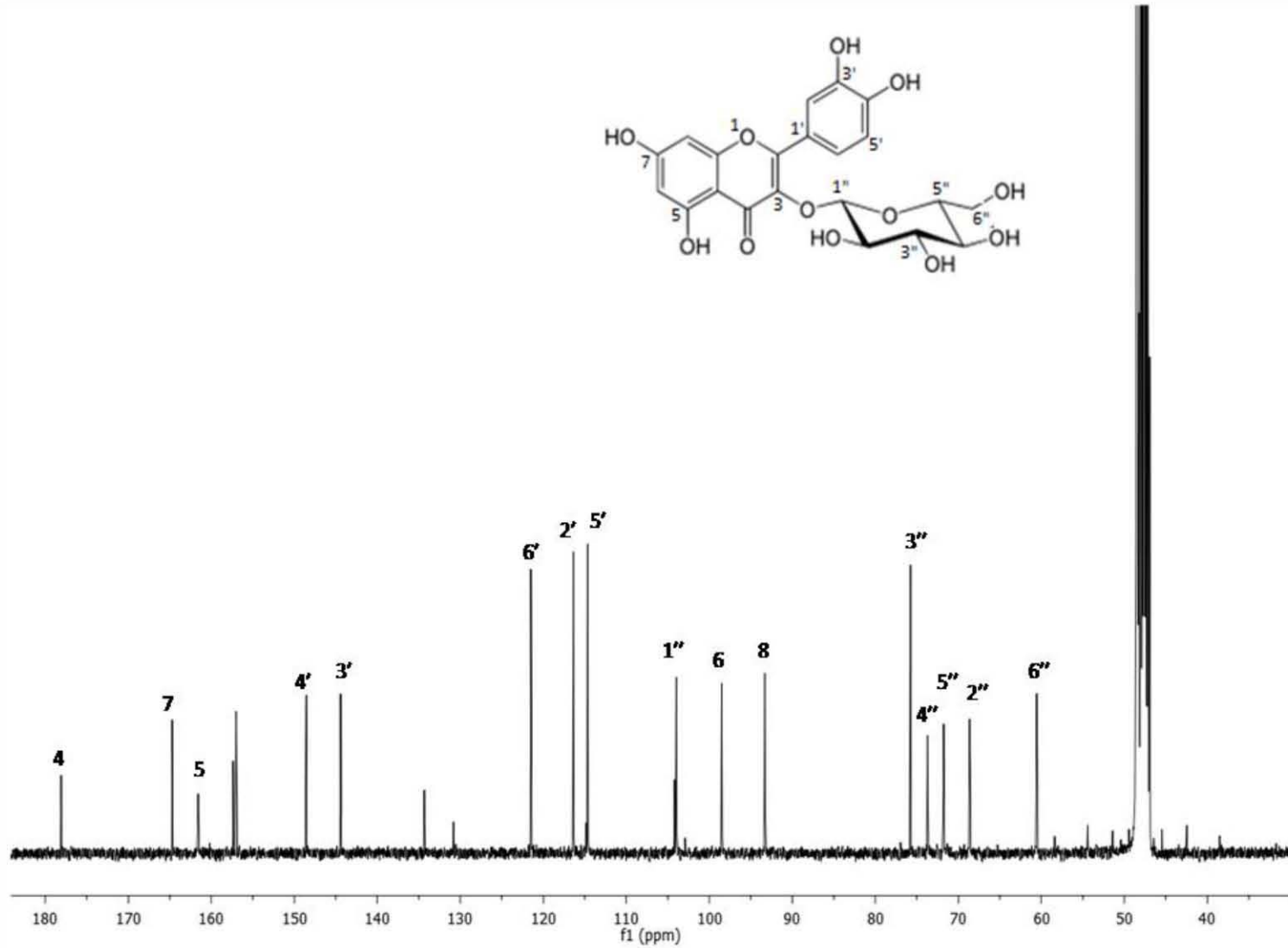
ESPECTRO 5. RMN-¹H (400 MHz, MeOD) de astragalina (**3**)



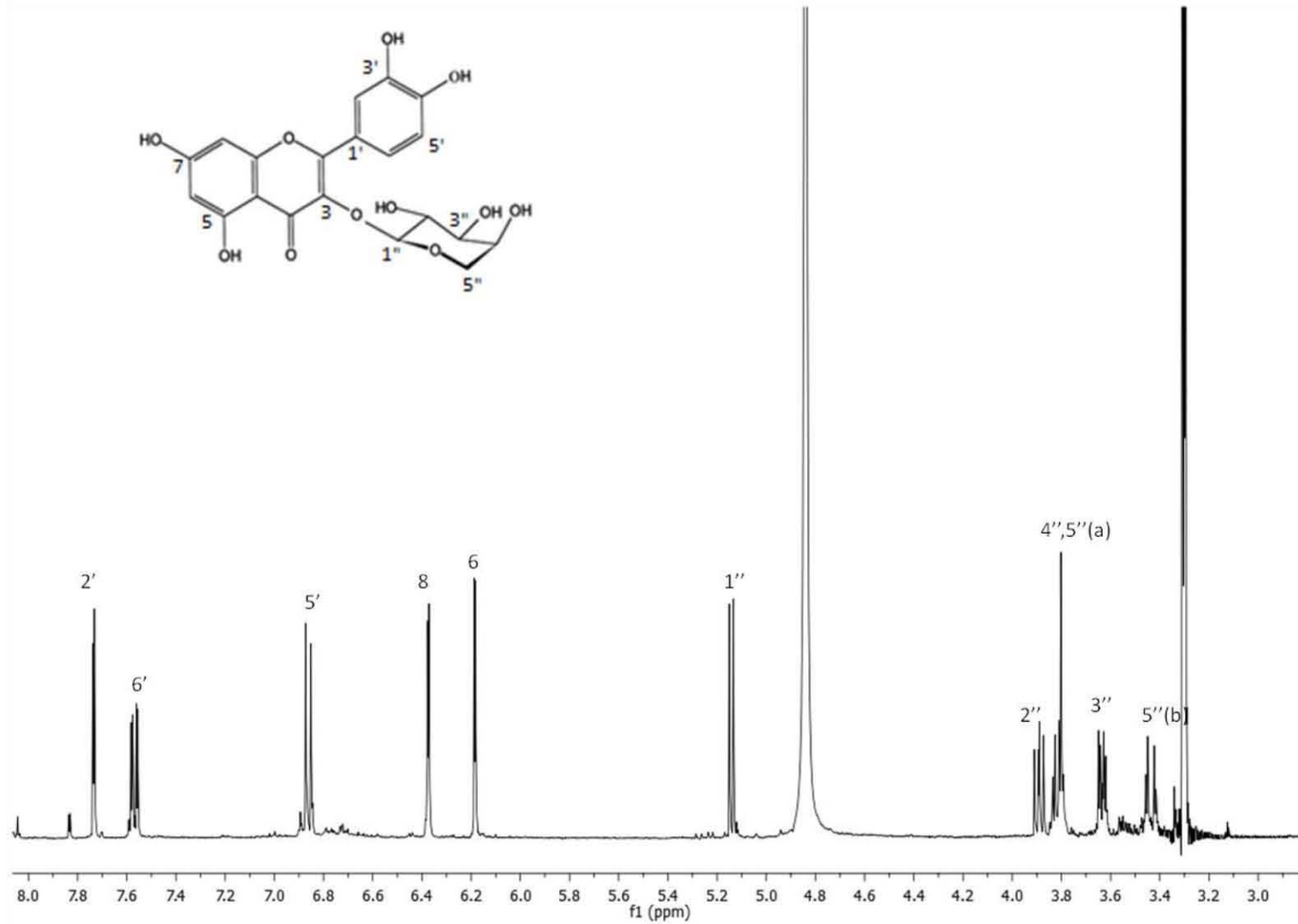
ESPECTRO 6. RMN-¹³C (100 MHz, MeOD) de astragalina (**3**)



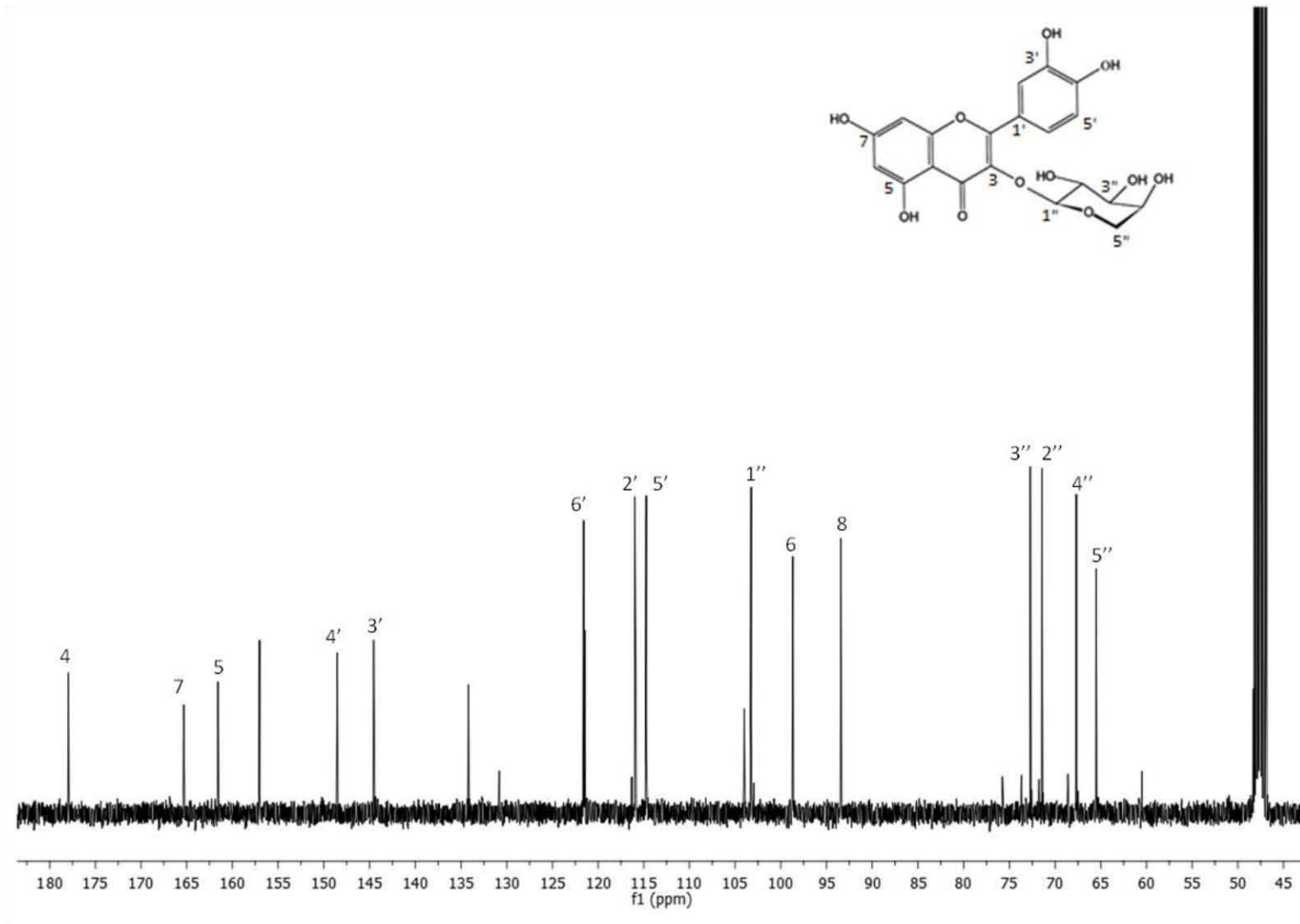
ESPECTRO 7. RMN-¹H (400 MHz, MeOD) de isoquercetina (4)



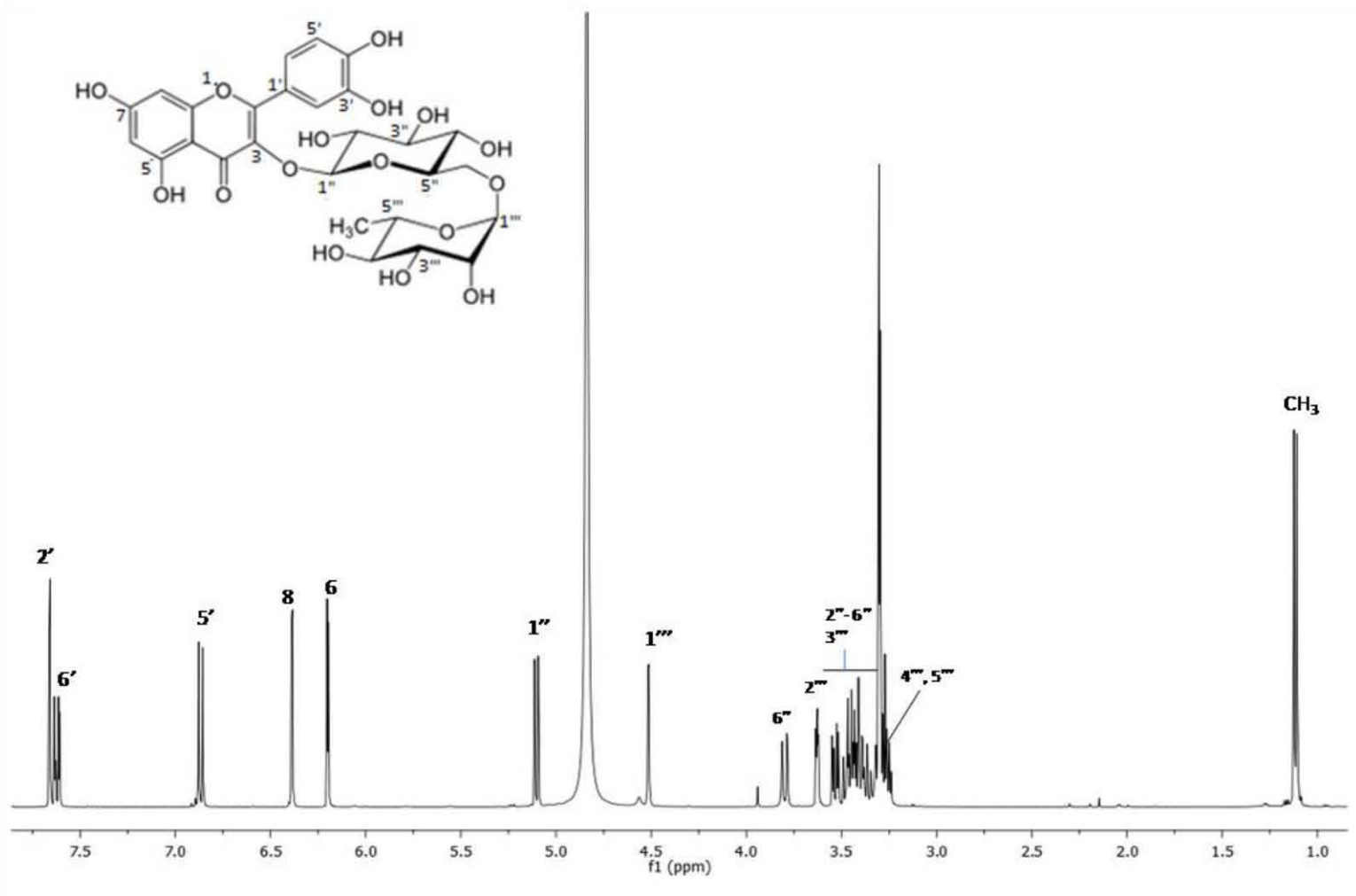
ESPECTRO 8. RMN- ^{13}C (100 MHz, MeOD) de isoquercetina (4)



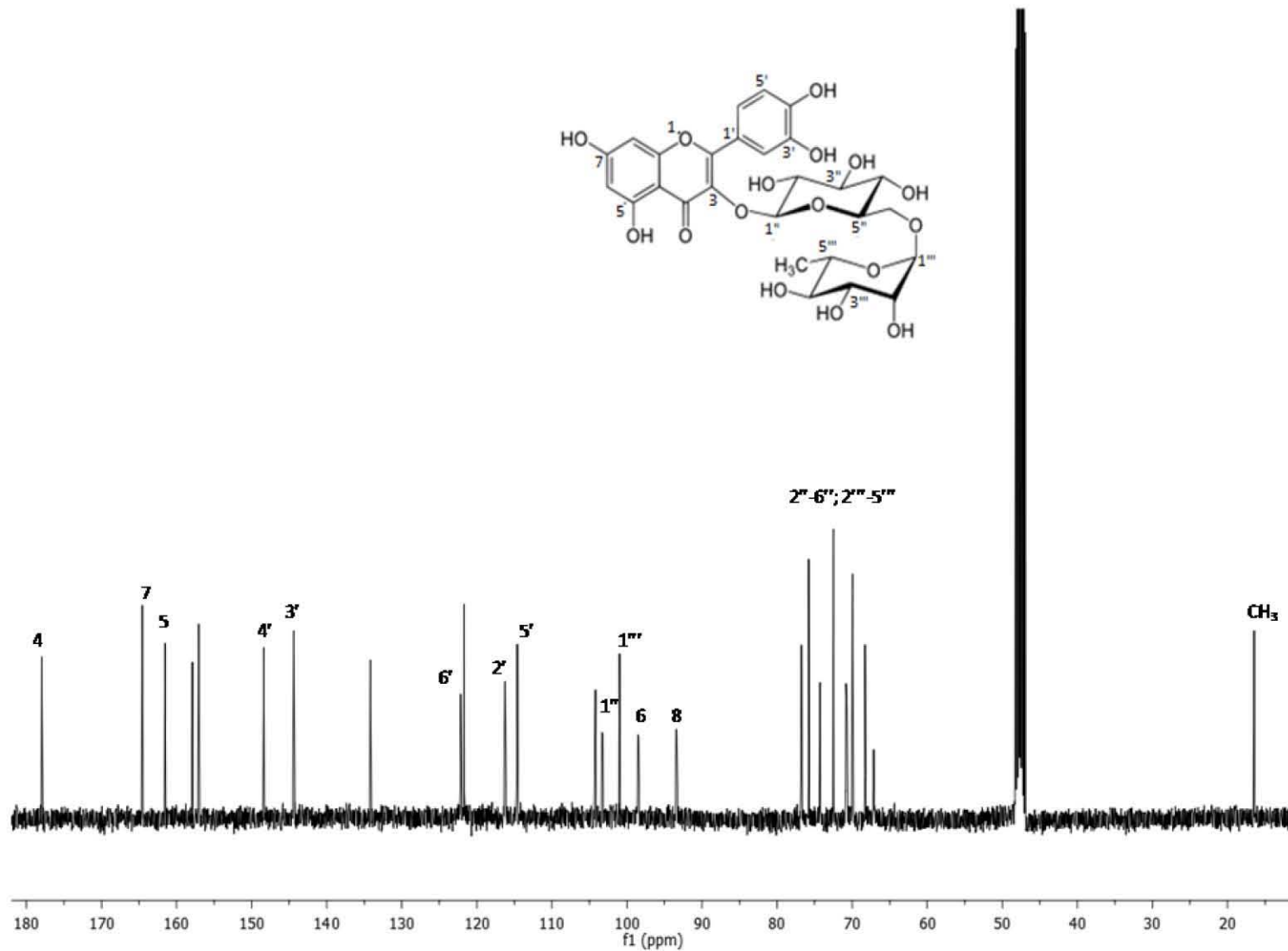
ESPECTRO 9. RMN-¹H (400 MHz, MeOD) de 3-O-β-L-arabinopiranosido de quercetina (5)



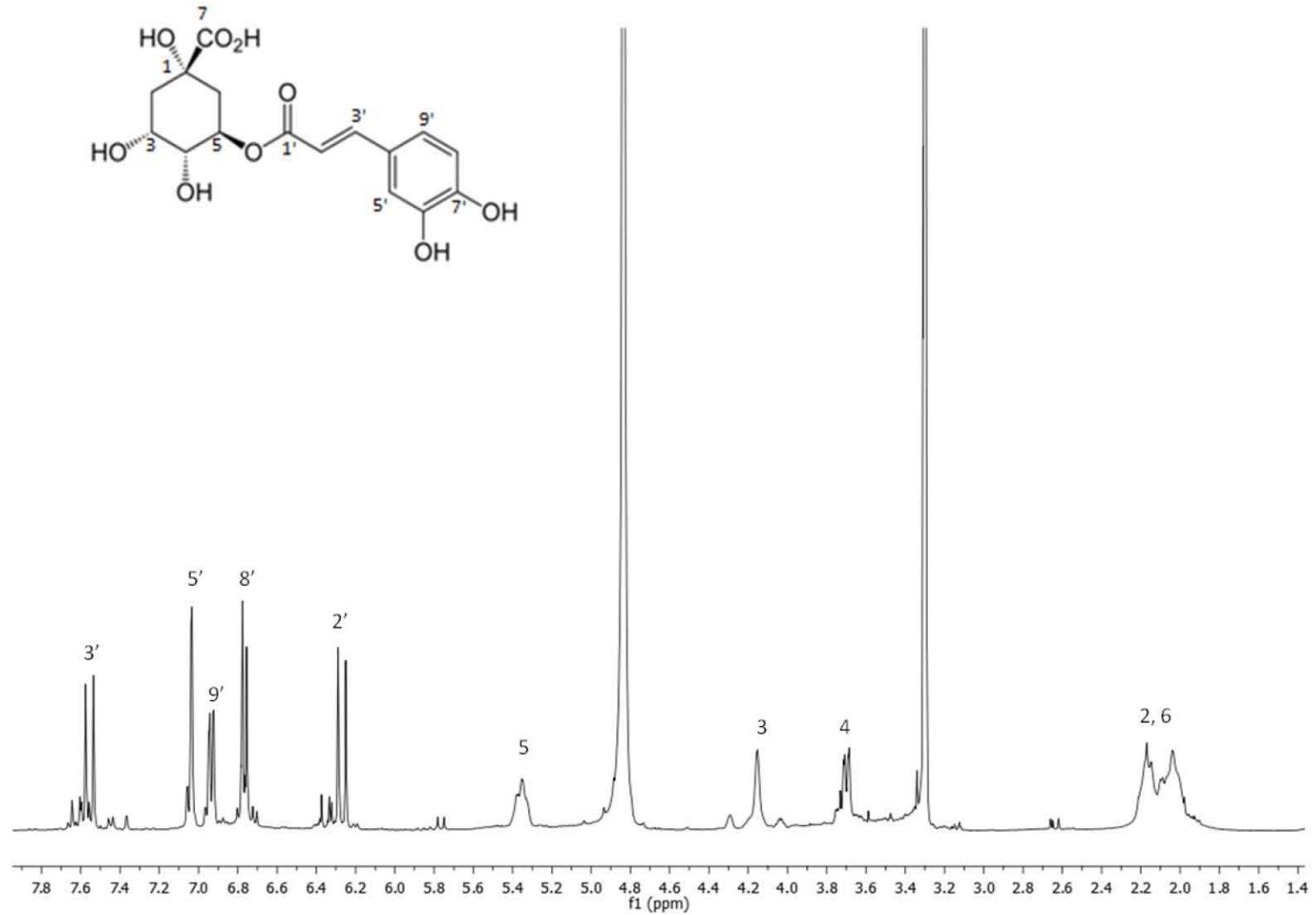
ESPECTRO 10. RMN- ^{13}C (100 MHz, MeOD) de 3-O- β -L-arabinopiranosido de quercetina (5)



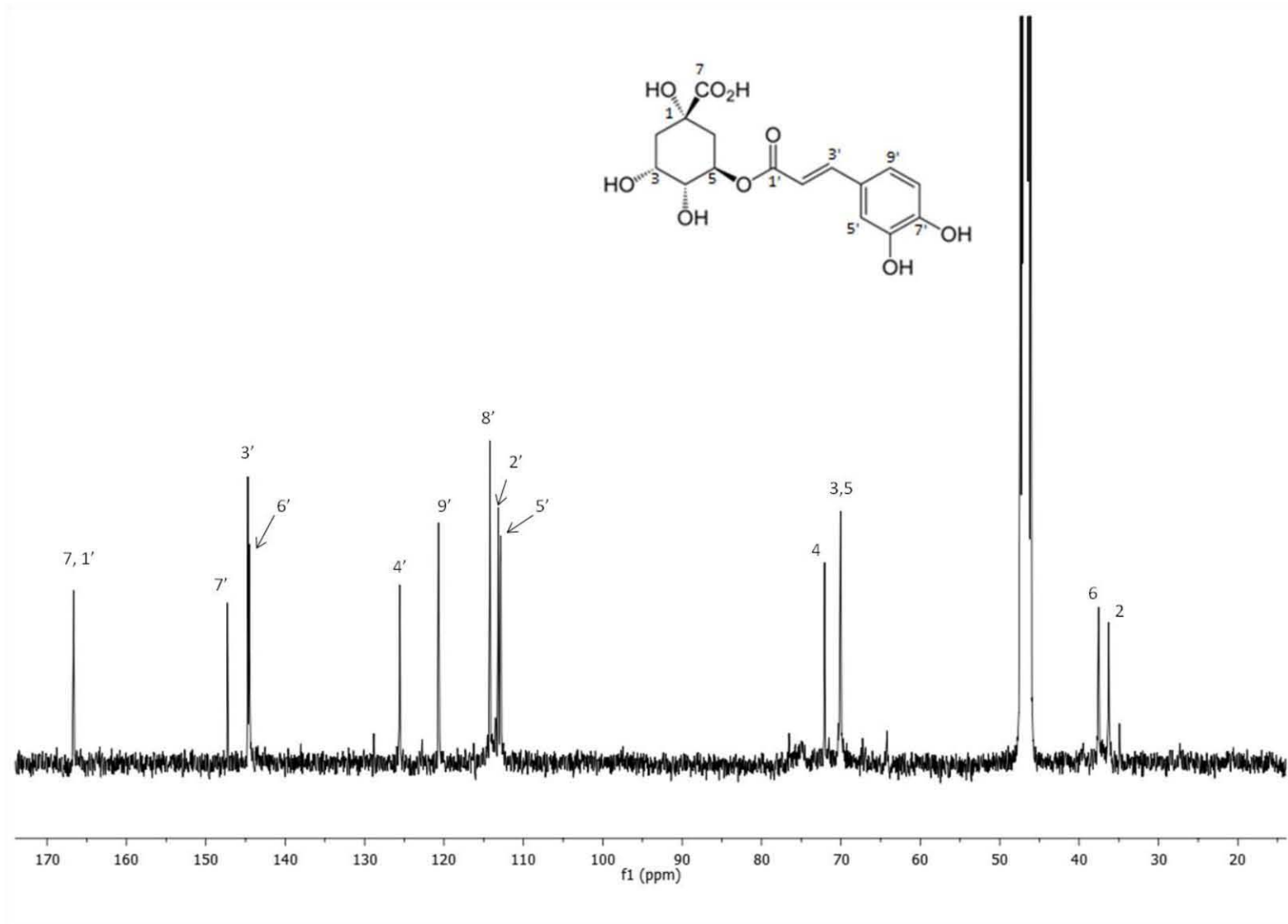
ESPECTRO 11. RMN-¹H (400 MHz, MeOD) de rutina (6)



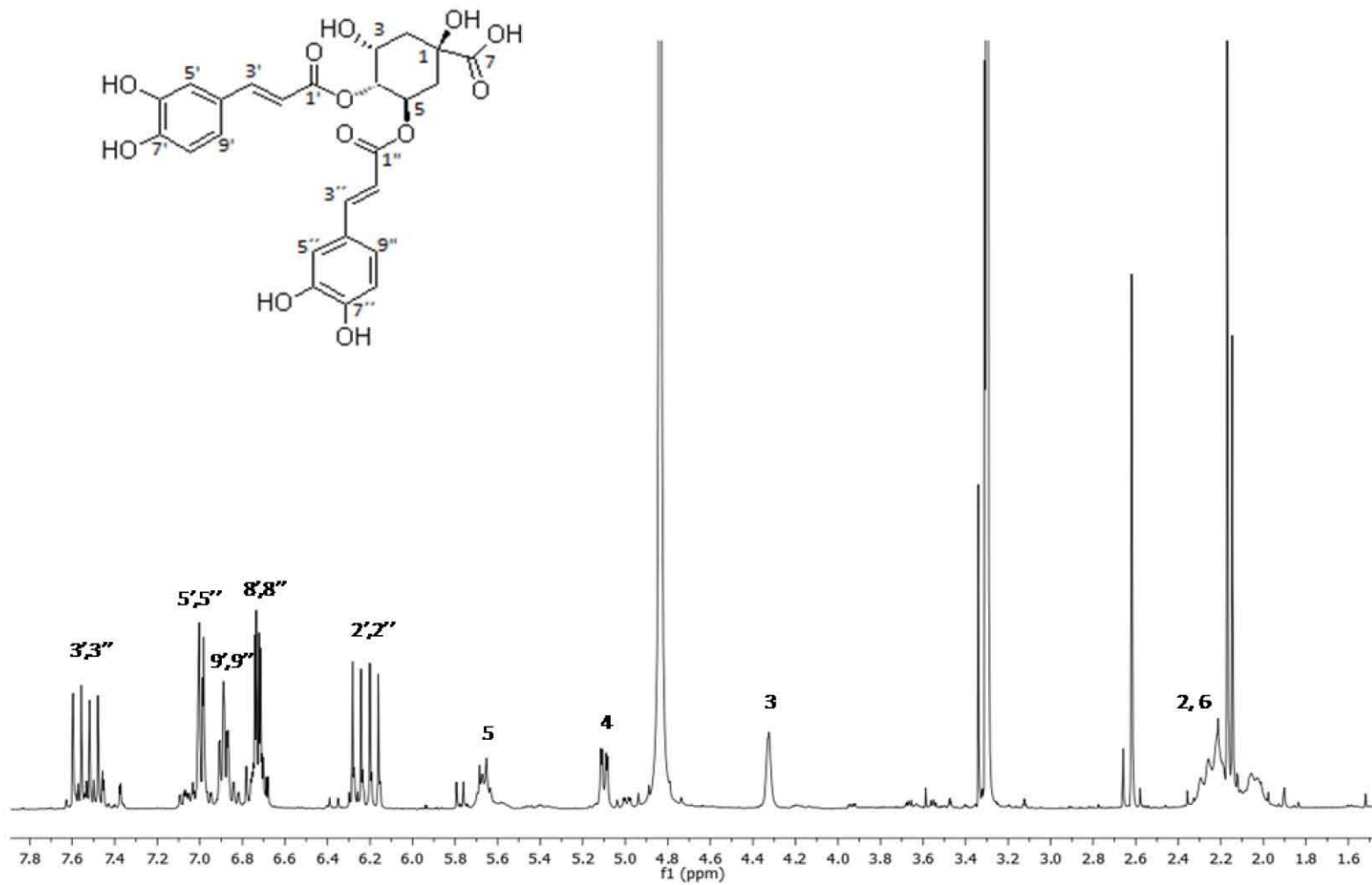
ESPECTRO 12. RMN-¹³C (100 MHz, MeOD) de rutina (6)



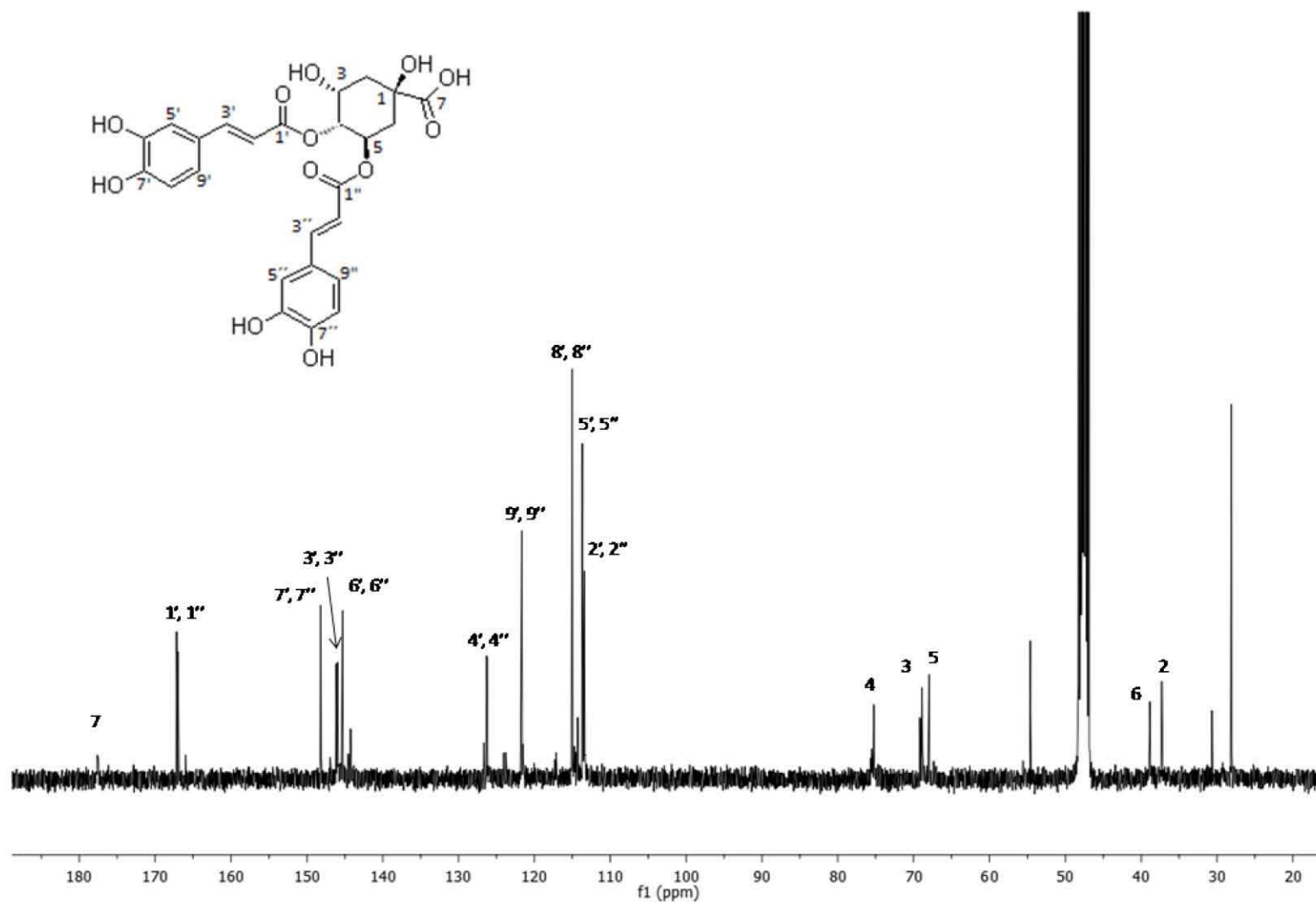
ESPECTRO 13. RMN-¹H (400 MHz, MeOD) de ácido clorogénico (8)



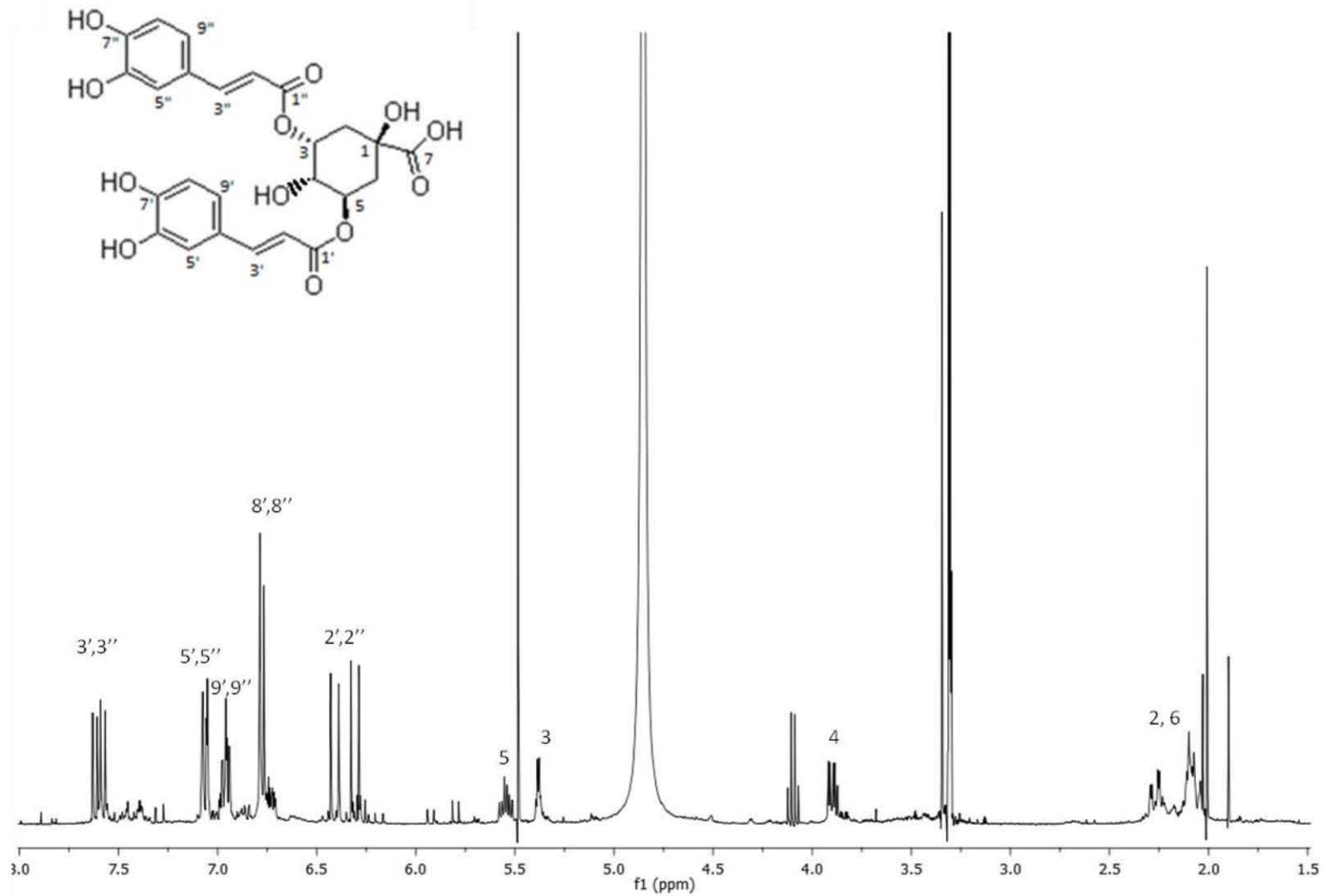
ESPECTRO 14. RMN- ^{13}C (100 MHz, MeOD) de ácido clorogénico (**8**)



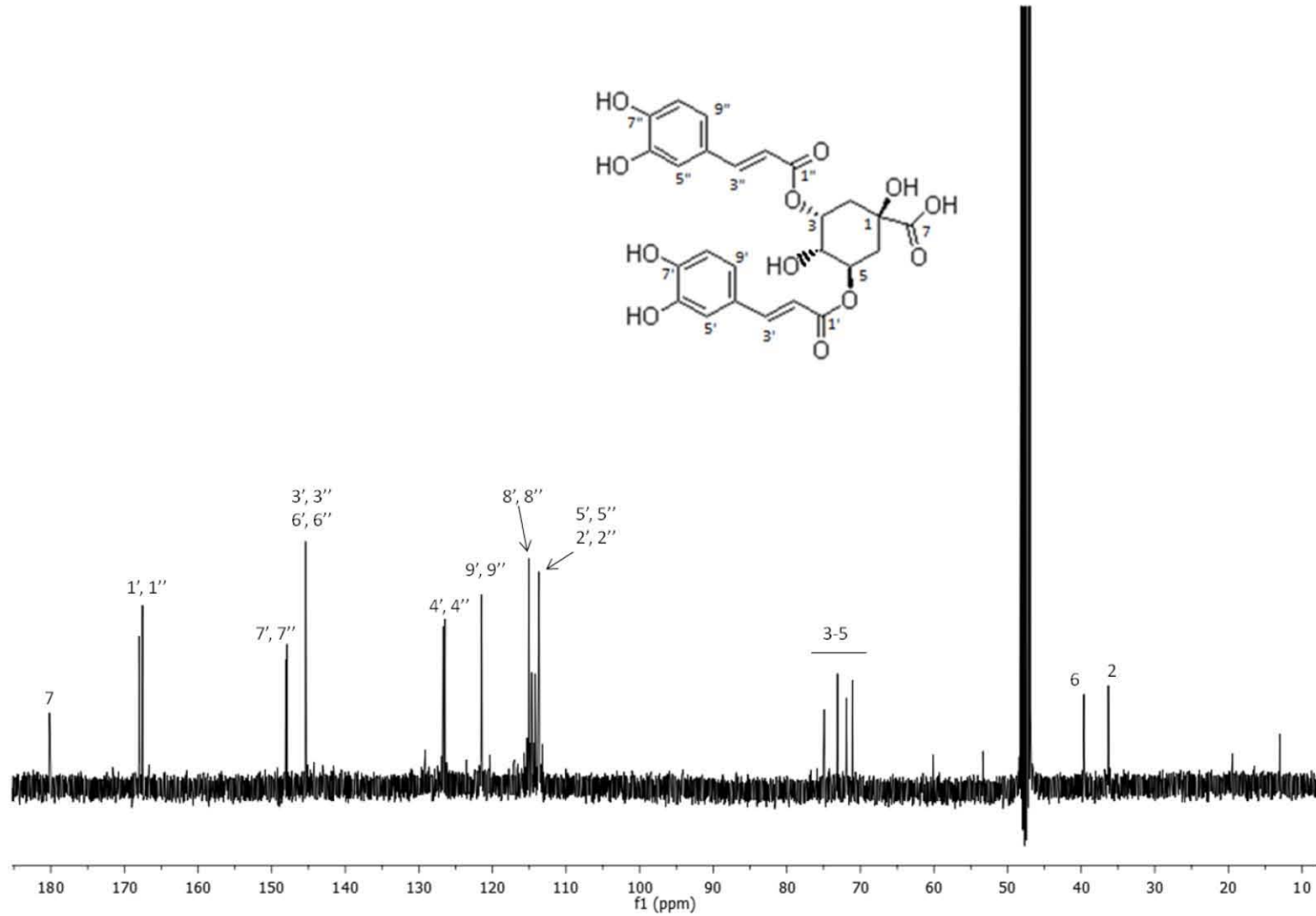
ESPECTRO 15. RMN-¹H (400 MHz, MeOD) de ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico



ESPECTRO 16. RMN- ^{13}C (100 MHz, MeOD) de ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (9)



ESPECTRO 17. RMN-¹H (400 MHz, MeOD) de ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (**10**)



ESPECTRO 18. RMN-¹³C (100 MHz, MeOD) de ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (10)