



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**FLAVONOIDES MINORITARIOS DE *HYDRANGEA SEEMANNII*: UNA
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO QUÍMICO DE ESTA ESPECIE MEDICINAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

GERARDO RAMÍREZ ARENAZAS



MÉXICO, D.F.

2014



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: Dra. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz
SECRETARIO: Dra. Araceli Pérez Vásquez
1er. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2° SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 124, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. ARACELI PÉREZ VÁSQUEZ

SUSTENTANTE (S):

GERARDO RAMÍREZ ARENAZAS

ÍNDICE

	Página
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Género <i>Hydrangea</i>	1
1.2 <i>Hydrangea seemannii</i> L. Riley	2
1.3 Antecedentes químicos de la especie <i>H. seemannii</i>	4
1.4 Antecedentes farmacológicos	5
1.5 La importancia de los flavonoides para la salud humana	6
2. JUSTIFICACIÓN	8
3. OBJETIVO GENERAL	9
3.1 Objetivos particulares	9
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	10
4.1 Material vegetal	10
4.2 Procedimientos generales	10
4.2.1 Análisis cromatográficos	10
4.2.2 Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas	10
4.3 Preparación de la infusión y estudio químico	11
4.3.1 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción orgánica	11
4.3.2 Fraccionamiento terciario de la fracción F9	13
4.3.3 Aislamiento de la juglalina (11) y del hiperósido (12)	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1 Elucidación estructural de la juglalina (11)	17
5.2 Elucidación estructural del hiperósido (12)	22
5.3 Identificación por CCD de los flavonoides aislados de <i>H. seemannii</i>	27
6. CONCLUSIONES	28
7. REFERENCIAS	29
8. ANEXOS	33

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribución mundial del género <i>Hydrangea</i>	1
2. Distribución geográfica en México de la especie <i>Hydrangea seemannii</i>	2
3. Hojas y flores de <i>H. seemannii</i>	3
4. Compuestos aislados de <i>H. seemannii</i>	4
5. Subfamilias de flavonoides	6
6. Procesos de extracción y fraccionamiento de las partes aéreas de <i>H. seemannii</i>	12
7. Aislamiento de la juglalina (11) y del hiperósido (12) a partir de la fracción F9-2	15
8. Espectro de RMN- ¹ H (MeOD, 400 MHz) del compuesto 11	17
9. Región en el espectro de RMN- ¹ H del residuo de azúcar y constantes de acoplamiento	18
10. Correlaciones NOESY entre H-1'' y H-3'' para el sacárido de L-arabinopiranososa	18
11. Espectro COSY del compuesto 11	19
12. Espectro NOESY del compuesto 11	19
13. Espectro RMN- ¹³ C (MeOD, 100 MHz) del compuesto 11	20
14. Espectro HMBC del compuesto 11	21
15. Espectro RMN- ¹ H (MeOD, 400 MHz) del compuesto 12	23
16. Región en el espectro de RMN- ¹ H del residuo de azúcar y constantes de acoplamiento	23
17. Espectro RMN- ¹³ C (MeOD, 100 MHz) del compuesto 12	24
18. Espectro COSY del compuesto 12	24
19. Identificación por CCD de los flavonoides aislados de <i>H. seemannii</i>	27
20. Espectro en el infrarrojo de la juglalina (11)	34
21. Espectro en el infrarrojo del hiperósido (12)	35
22. Espectro COSY del hiperósido (12)	36
23. Espectro HMBC del hiperósido (12)	37

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Fraccionamiento de la fracción de AcOEt obtenida a partir del extracto acuoso de <i>H. seemanii</i>	12
2. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción F9	13
3. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción F9-2	14
4. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción F9-2-2	14
5. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción F9-2-2-7	15
6. Compuestos aislados de la fracción activa de AcOEt	16
7. Datos espectroscópicos de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) y ^{13}C (100 MHz, MeOD) de los compuestos 11 y 12	26

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ATR	Reflectancia Total Atenuada
CCD	Cromatografía en capa delgada
MeOD	Metanol deuterado
CH₂Cl₂	Diclorometano
CI₅₀	Concentración inhibitoria del 50%
COSY	Correlación Homonuclear
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
δ	Desplazamiento químico
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
Hz	Hertz
IR	Espectroscopia en el infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
MHz	MegaHertz
mL	Mililitro
mg	Miligramo
MS-FAB	Espectrometría de masas por la técnica de bombardeo rápido de átomos
m/z	Relación masa-carga
MeOH	Metanol
ppm	Partes por millón
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TMS	Tetrametilsilano

1. ANTECEDENTES

1.1 Género *Hydrangea*

El género *Hydrangea* mejor conocido como hortensia, pertenece a la familia *Hydrangeaceae*. Las especies pertenecientes a este género tienen un gran valor ornamental debido a que sus flores son muy vistosas y hermosas, lo que ha promovido su cultivo y propagación en jardines e invernaderos (McClintock, 1957; Cerbah *et al.*, 2001). Este género cuenta con alrededor de 73 especies que se distribuyen principalmente en las regiones templadas y subtropicales de Asia oriental y el este de Norte América así como en Centro y Sudamérica (Figura 1) (McClintock, 1957). *Hydrangea* tiene una presencia muy importante en la República Popular China en donde se encuentran alrededor de 43 especies y 10 variedades. El género no solo se utiliza con fines decorativos, ya que algunas especies poseen propiedades medicinales como es el caso de *H. paniculata* y *H. macrophylla*, que se usan en la medicina tradicional China. La primera de ellas reduce la fiebre, alivia el dolor de garganta, y ambas tratan la malaria. La segunda se usa en afecciones del corazón (taquicardia, espanto) y disforia (Shi *et al.*, 2012; 2014; Liang *et al.*, 2013; Wynn y Fougère, 2007; Moran *et al.*, 2013).

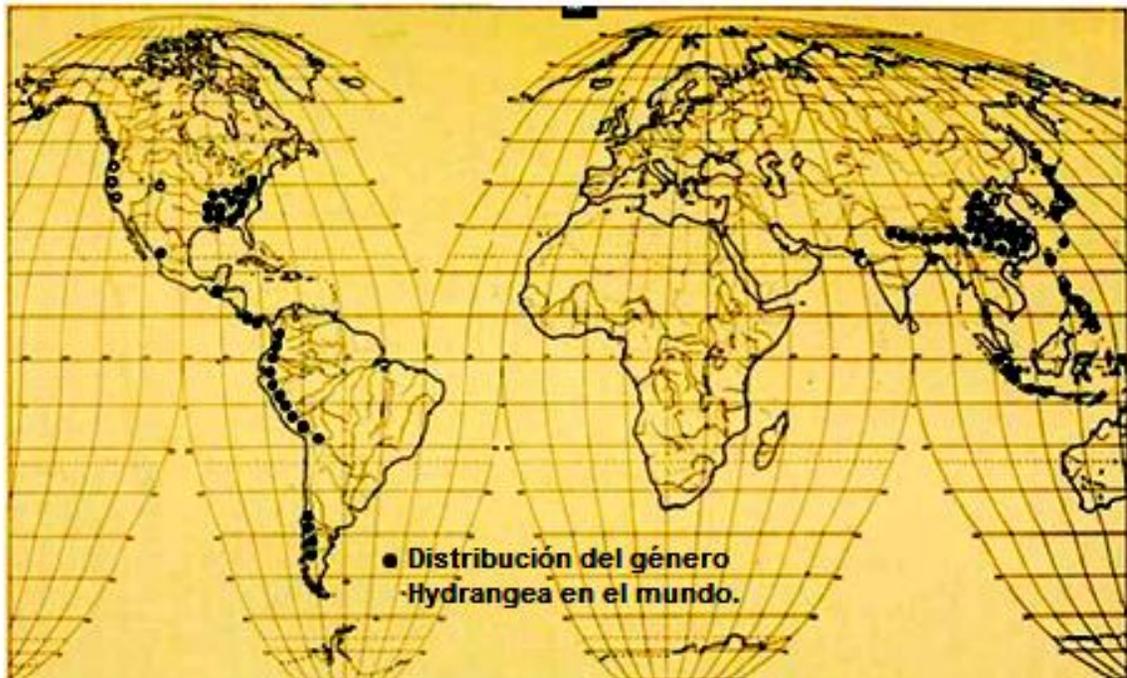


Figura 1. Distribución mundial del género *Hydrangea*. (Tomada de McClintock, 1957).

1.2 *Hydrangea seemannii* L. Ryley

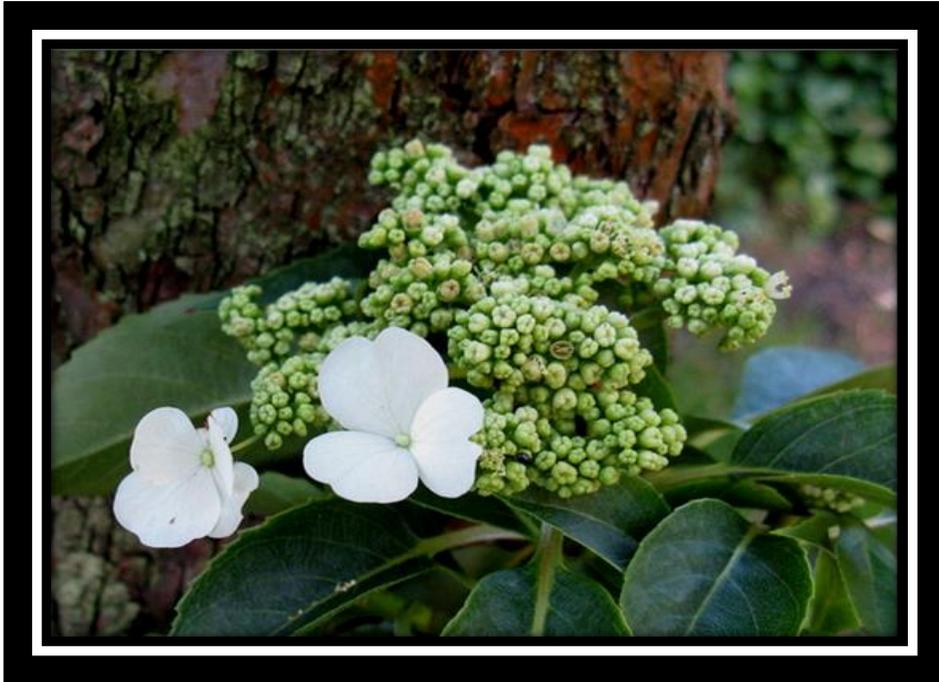
H. seemannii es una especie que se encuentra restringida a la República Mexicana, localizándose en los estados que abarcan la región de la Sierra Madre Occidental. Se distribuye principalmente en la zona denominada “Rancho de Guadalupe”, entre Mazatlán y Durango, así como en los estados de Chihuahua y Nayarit (Figura 2). Es común verla crecer en las escaladas de las barrancas y en los enraizamientos de árboles viejos (McClintock, 1957; Tropicos, 2014; SF, 2014).



Figura 2. Distribución geográfica en México de la especie *Hydrangea seemannii*.

Se caracteriza por ser una enredadera de hojas perennes grandes dentadas coriáceas, verde brillante oscuro. Florece a mediados y finales del verano dando flores grandes y perfumadas, blancas crema (SF, 2014). Las flores incluyen dos tipos: aquellas que son estériles y tienen pedúnculo largo (Figura 3b) y las flores verdes, que son fértiles y sin pétalos (Figura 3a). Por lo que respecta a sus usos medicinales, de acuerdo con versiones del Dr. Robert Bye del instituto de biología UNAM (IB-UNAM), la especie es utilizada para el tratamiento de la diabetes en el estado de Chihuahua.

a)



b)



Figura 3. a) Hojas y b) flores de *H. seemanii*.

1.3 Antecedentes químicos de *H. seemannii*

El primer y reciente estudio químico realizado por Aguilar (2013) con la infusión obtenida de las partes aéreas secas de *H. seemannii* permitió el aislamiento y la caracterización de 10 compuestos de tipo fenólico, identificados como la quercetina (1), tres derivados glicosilados de la quercetina (2-4) el camperol (5), dos derivados glicosilados del camperol (6 y 7) y los tres restantes corresponden al ácido clorogénico (8) y dos derivados del ácido cafeoilquínico (9 y 10) (Aguilar, 2013) (Figura 4). También en este mismo estudio se estableció el perfil cromatográfico por UPLC de la infusión en el que se detectó la presencia de los flavonoides (1-7) previamente aislados y de los derivados del ácido cafeoilquínico (9 y 10) como los componentes mayoritarios presentes en la infusión, permitiendo establecer la importancia de este grupo de compuestos en la infusión.

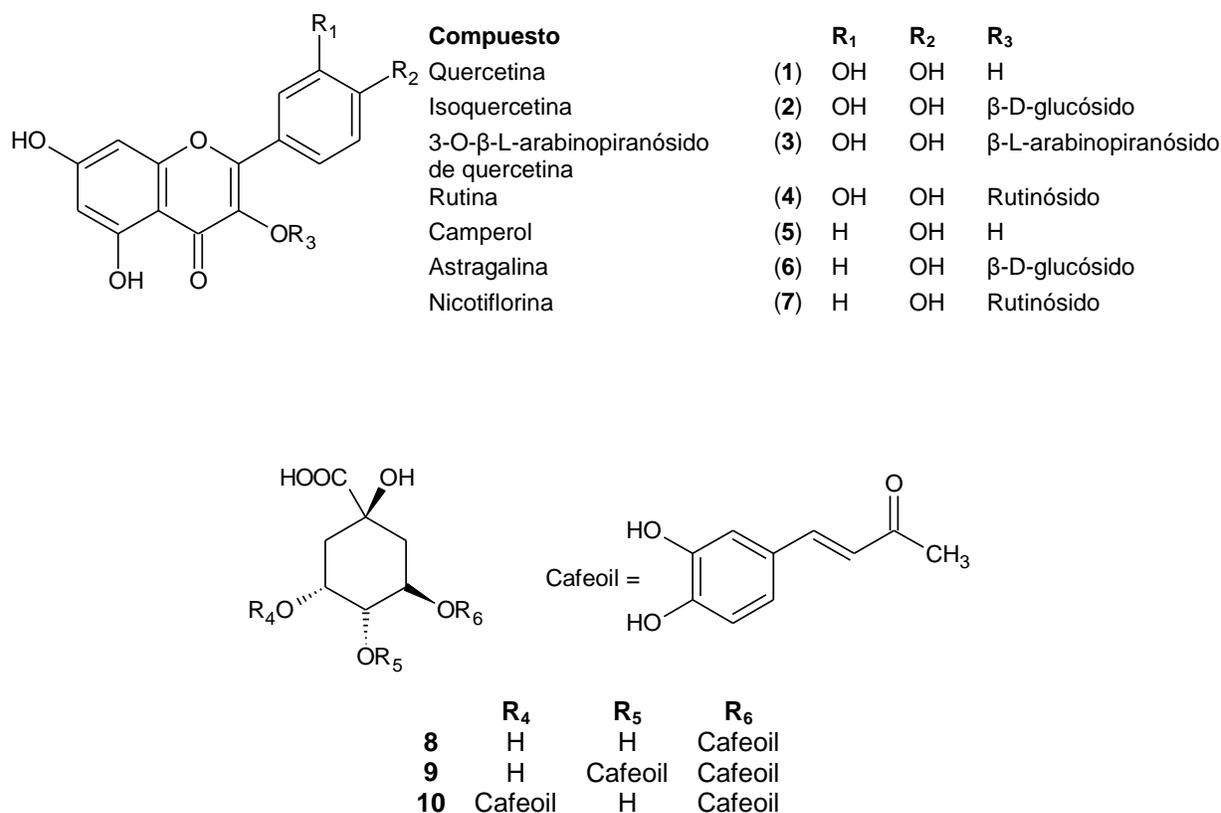


Figura 4. Compuestos aislados de *H. seemannii*.

1.4 Antecedentes Farmacológicos

Los estudios farmacológicos realizados por Brindis en el 2011 y por Aguilar en el 2013 sobre *H. seemannii* estuvieron encaminados a establecer la inocuidad y validar su potencial como antidiabético. En cuanto a su inocuidad se demostró, mediante la aplicación del método de Lorke, que el extracto íntegro (CH₂Cl₂-MeOH 1:1) y la infusión de la planta no fueron tóxicos (Presentando una toxicidad aguda mayor a 5 g/kg de peso) confirmando la seguridad de estos extractos.

Por lo que respecta a su actividad antidiabética, se realizaron estudios conducentes a establecer el efecto antihiper glucémico de la planta mediante los ensayos de tolerancia a la glucosa y a la sacarosa, utilizando el extracto orgánico y la infusión en animales sanos y diabéticos. Primeramente, en los experimentos de tolerancia a la glucosa en animales diabéticos, el extracto orgánico inhibió de manera significativa la aparición del pico posprandial a las dosis de 100 y 500 mg/kg y la infusión a las dosis de 31.6 y 56.2 mg/kg, por lo que presentaron una actividad antihiper glucémica importante. Por otra parte, en los estudios de tolerancia a la sacarosa el extracto orgánico en animales diabéticos demostró una disminución significativa de los niveles de glucosa en sangre a las dosis de 31.2 y 100 mg/kg y la infusión a todas las dosis ensayadas. El efecto de este último preparado a la dosis evaluada de 316 mg/kg fue similar al del control positivo (acarbose). Estos resultados permitieron establecer la actividad antihiper glucémica de la especie.

Enseguida, con la finalidad de demostrar si el efecto antihiper glucémico era debido a la inhibición de las enzimas α -glucosidasas, se efectuaron ensayos enzimáticos de la fracción orgánica primaria obtenida por reparto con AcOEt y de la fracción acuosa de la infusión. Se observó, que solo la fracción orgánica inhibió la actividad de las α -glucosidasas de levadura. La presencia de los flavonoides en la fracción de AcOEt, así como de los derivados del ácido cafeico previamente descritos (*vide supra*) y aislados de esta fracción permiten corroborar esta actividad, ya que todos ellos tienen propiedades reportadas como inhibidores de las α -glucosidasas (Aguilar, 2013).

1.5 La importancia de los flavonoides para la salud humana

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de biogénesis mixta, sintetizados a partir de las rutas del ácido siquímico y acetato malonato. Contienen un esqueleto hidrocarbonado tricíclico denotado como **A**, **B**, **C** y se representan con la fórmula $C_6-C_3-C_6$. Tienen en común el núcleo de flavano (Figura 5) el cual puede tener diversos sustituyentes. Es el grupo de metabolitos secundarios más numeroso en la familia de los polifenoles y se encuentran en todo el reino vegetal estando presentes especialmente en la epidermis de las hojas y la piel de los frutos (Crozier *et al.*, 2009; Verri *et al.*, 2012). Están clasificados en seis sub-grupos que son principalmente los flavonoles, las flavonas, los flavan-3-oles, las antocianidinas, las flavanonas, y las isoflavonas. Los seis sub-grupos restantes tienen una distribución menor y son los dihidroflavonoles, los flavan-2,4-dioles, las cumarinas, las chalconas, las dihidrochalconas y las auronas. (Corradini *et al.*, 2011; Tanwar y Modgil, 2012). La mayoría de los flavonoides existen en la naturaleza como derivados glicosilados (Crozier *et al.*, 2009; Verri *et al.*, 2012).

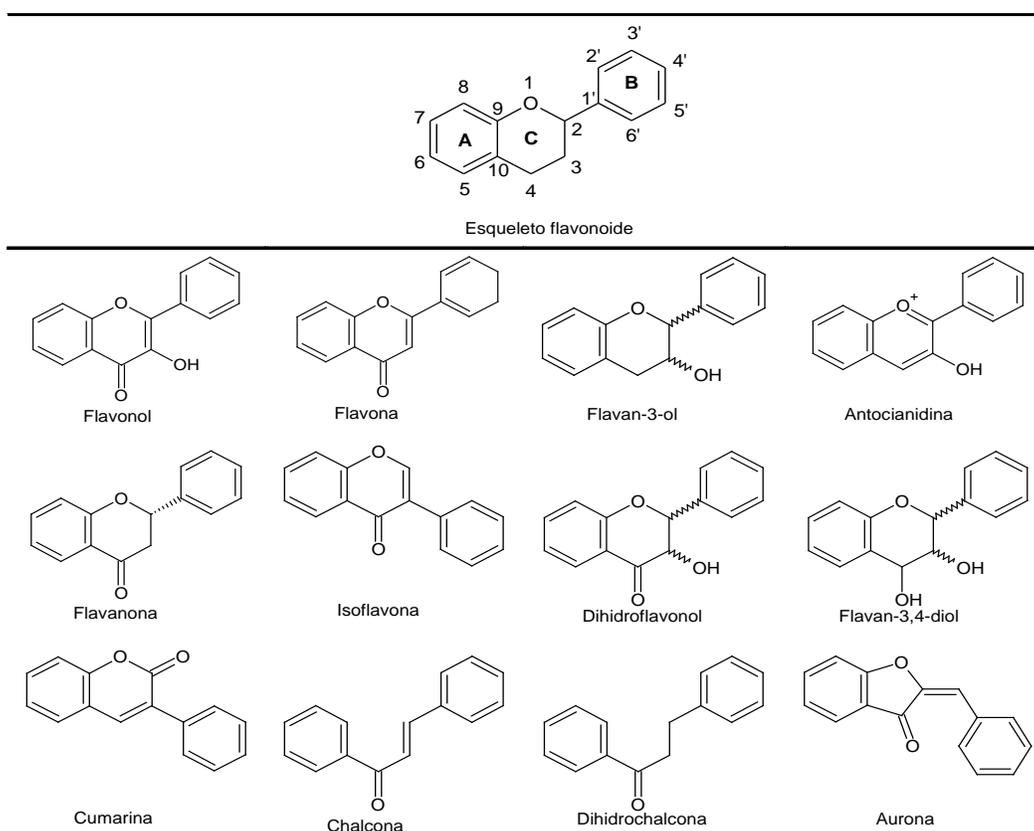


Figura 5. Subfamilias de flavonoides (Clifford, 2009).

Las funciones biológicas que desempeñan dentro de la naturaleza son variadas y muy importantes, ya que protegen a las plantas contra fitopatógenos actuando principalmente como fitoalexinas (Corradini *et al.*, 2011). Son importantes moléculas de señalización en múltiples eventos fisiológicos como son: el transporte de auxinas en la planta y la fertilidad de la misma, esto debido a que la coloración que proporcionan a las flores funciona como una señal visual que atrae a los polinizadores; también protegen a las células de las hojas de la fotooxidación (Tanwar y Modgil, 2012) e incrementan el reciclaje de nutrientes, distribuyéndolos a otros tejidos de la planta durante la senescencia.

La importancia de los flavonoides para los humanos se remonta a la década de 1920, cuando fueron descritos por primera vez como compuestos promotores de la salud. En ese periodo también las vitaminas se estaban descubriendo y en 1936 los flavonoides se denominaron como la vitamina P (Weseler y Bast, 2012).

Para la década de los 80's, el conocimiento sobre los radicales libres como especies perjudiciales para toda clase de biomoléculas (ácidos grasos, proteínas, carbohidratos, y ácidos ribonucleicos), y estructuras celulares (membranas, enzimas o receptores) permitieron determinar la importancia de los flavonoides como agentes antioxidantes que es la propiedad más descrita y documentada para estos compuestos (Corradini *et al.*, 2011; Unnikrishnan *et al.*, 2014; Tanwar y Modgil, 2012; Verri *et al.*, 2012; Weseler y Bast, 2012).

Actualmente, a los flavonoides también se les atribuyen propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales y anticancerígenas por mencionar a las más importantes (Chen y Chen, 2013).

2. JUSTIFICACIÓN

Hydrangea seemannii es una enredadera que habita exclusivamente en algunos estados del norte de nuestra país y que de acuerdo a versiones del Dr. Robert Bye y la M. en C. Eldemira Linares, investigadores del IB-UNAM, es utilizada en el estado de Chihuahua como infusión para el tratamiento de la diabetes. Los estudios farmacológicos realizados hasta la fecha han permitido demostrar su potencial hipoglucemiante y antihiper glucémico, lo que valida el uso de esta especie en las prácticas médicas tradicionales de nuestro país. Por otra parte, los estudios químicos realizados sobre los extractos (acuoso y orgánico) y fracciones activas, han permitido aislar y caracterizar a varios flavonoides y derivados del ácido cafeoilquínico. Con este primer y único estudio químico realizado con la planta, además de un perfil cromatográfico generado por UPLC de la fracción activa de AcOEt, se pudo determinar el elevado contenido de metabolitos de tipo flavonoide. Todos estos metabolitos reportados a la fecha para la planta presentan propiedades hipoglucemiantes y antihiper glucémicas importantes (Aguilar, 2013), por lo que representan, junto con los derivados del ácido cafeoilquínico, los principios activos y/o posibles marcadores de la especie.

La presencia de estos compuestos en plantas medicinales y/o alimentos, como se describió en los antecedentes, es importante debido al efecto multimodal que ejercen sobre diferentes patologías. Por lo anterior es de importancia realizar su búsqueda, así como aislarlos y caracterizarlos a partir de diferentes especies vegetales.

3. OBJETIVO GENERAL

Realizar la reinvestigación química de las partes aéreas de la especie medicinal *H. seemanii*, y aislar los flavonoides adicionales con la finalidad de contribuir al conocimiento de la composición química de la planta

3.1 Objetivos particulares

- ✓ Preparar la infusión y obtener por partición la fracción activa de AcOEt en cantidades suficientes para poder fraccionarse.

- ✓ Realizar el fraccionamiento de la fracción de AcOEt mediante el uso de métodos cromatográficos convencionales con la finalidad de aislar al menos dos flavonoides adicionales.

- ✓ Elucidar las estructuras químicas de los compuestos aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Material vegetal

Las partes aéreas de la especie vegetal *H. seemannii* procedentes de la comunidad de San Rafael, Chihuahua, fueron recolectadas y proporcionadas por el Dr. Robert Bye, investigador en el Instituto de Biología de la UNAM (IB-UNAM).

Un ejemplar de referencia se depositó en el Herbario Nacional (MEXU, número de voucher Bye & Linares 35130). El material vegetal fue sometido a un proceso de desecación a temperatura ambiente por ocho días y posteriormente fragmentado (tamaño de malla: 2 micras) en un molino de cuchillas Willey modelo 4.

4.2. Procedimientos generales

4.2.1 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa delgada (CCD) se realizaron utilizando placas de aluminio de diferentes dimensiones, recubiertas con una capa de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (60 F₂₅₄ Merck). Los sistemas de elución utilizados fueron diversas mezclas entre AcOEt, MeOH y H₂O (85:12:3; 80:15:5) .

La visualización de las placas se realizó mediante luz UV (λ de onda corta, 254 nm y λ de onda larga, 365 nm). Posteriormente, se revelaron mediante el uso de los agentes cromógenos sulfato cérico amoniacal en H₂SO₄ y tricloruro de aluminio al 1% en etanol.

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó en columnas de vidrio de diferentes capacidades, empacadas con Sephadex LH-20 (Pharmacia) utilizando mezclas de acetona y/o metanol como fase móvil en diferentes proporciones.

4.2.2 Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C), así como los espectros de RMN bidimensionales homonucleares COSY (Correlated Spectroscopy), NOESY (Nuclear Overhauser

Effect Spectroscopy) y heteronucleares HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) y HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), se registraron en un aparato Varian Unity INOVA, operados a una radiofrecuencia de 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C . Los espectros se realizaron en metanol deuterado (MeOD); los desplazamientos químicos (δ) se expresan en unidades de ppm y son referidos al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno. Los espectros en el infrarrojo se obtuvieron mediante el método FTIR por reflectancia ATR en un espectrómetro Perkin Elmer 599. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas JEOL SX 10 utilizando como método de ionización bombardeo rápido de átomos (MS-FAB) en modo positivo y como matriz alcohol nitrobencílico (ANB).

4.3 Preparación de la infusión y estudio químico.

La infusión de las partes aéreas secas y molidas de la especie vegetal *H. seemannii* se obtuvo a partir de 4 gramos de material vegetal y 100 mL de agua destilada caliente (aprox. 70 °C). Posteriormente se filtró, y el filtrado se sometió a un proceso de reparto con acetato de etilo (AcOEt, 3 x 100 mL). Las fracciones orgánicas resultantes se combinaron y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron al vacío. Este proceso se repitió hasta la obtención de 10.3001 g (25.8 %) de la fracción primaria de AcOEt.

4.3.1 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción orgánica

La fracción de AcOEt (10.3001 g) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta sobre Sephadex LH-20 utilizando metanol como eluyente. Este proceso generó 155 fracciones de 5 mL cada una, las cuales fueron analizadas mediante CCD y combinadas de acuerdo a su similitud cromatográfica, dando como resultado doce conjuntos de fracciones (**F1** a **F12**) (Tabla 1). En la figura 6 se resume el proceso de extracción y fraccionamiento de las partes aéreas de *H. seemannii*.

Tabla 1. Fraccionamiento de la fracción de AcOEt obtenida a partir del extracto acuoso 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	0.5876
126-132	F10	0.1441
133-145	F11	0.1228
146-155	F12	0.0296

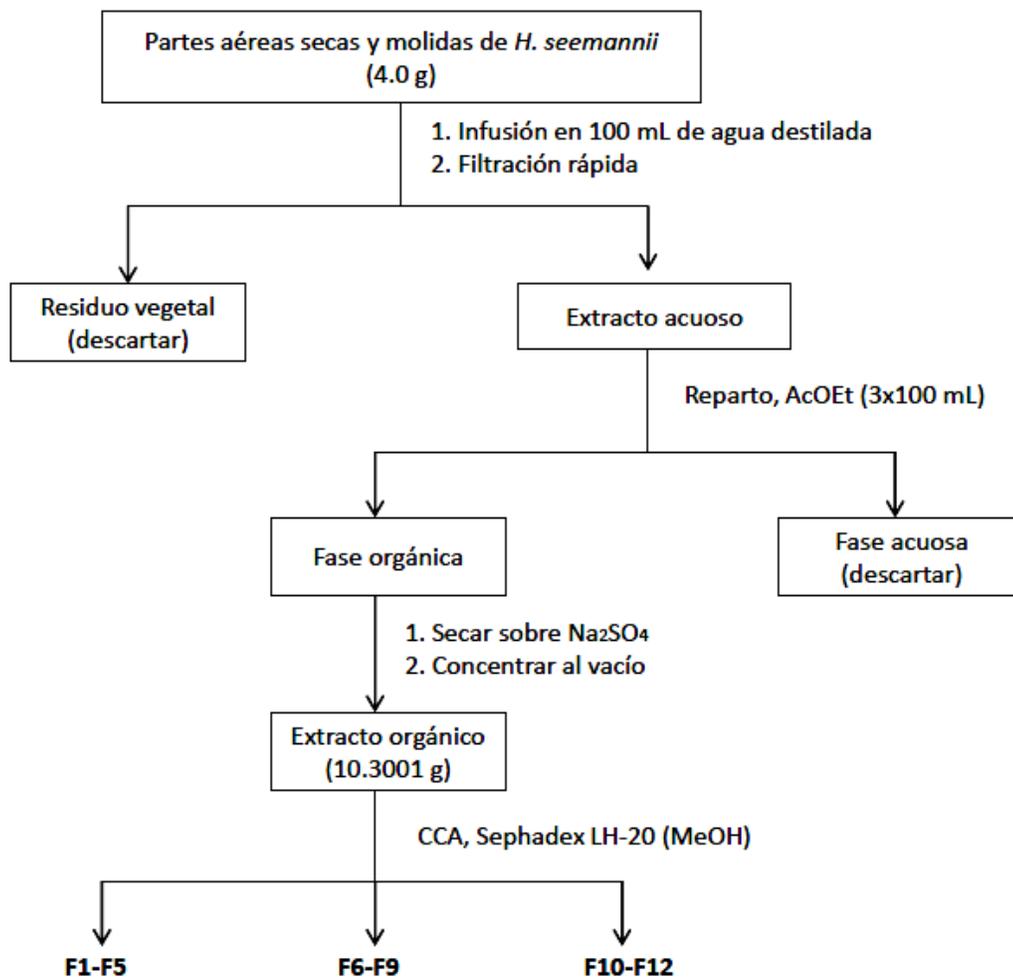


Figura 6. Proceso de extracción y fraccionamiento de las partes aéreas de *H. seemannii*.

4.3.2 Fraccionamiento terciario de la fracción F9

La fracción **F9** (Tabla 1; 0.5876 g) se sometió a un fraccionamiento terciario mediante CCA sobre Sephadex LH-20 (MeOH-H₂O, 85:15) para obtener 75 fracciones de cinco mL cada una. Estas fracciones se reunieron por su similitud cromatográfica mediante análisis por CCD, obteniéndose 8 conjuntos de fracciones (Tabla 2).

Tabla 2. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción **F9**.

Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
1-10	F9-1	0.1014
11-22	F9-2	0.2568
23-25	F9-3	0.0345
26-28	F9-4	0.0456
29-30	F9-5	0.0267
31-33	F9-6	0.0234
34-50	F9-7	0.0190
51-75	F9-8	0.0187

4.3.3 Aislamiento de la juglalina (11) y del hiperósido (12)

La fracción F9-2 (Tabla 2; 256.8 mg) se sometió a una recromatografía en columna abierta (CCA) sobre Sephadex LH-20, utilizando como eluyente una mezcla de MeOH-H₂O (85:15), obteniéndose 80 fracciones de tres mL cada una.

Estas se analizaron por medio de CCD y se reunieron según su similitud cromatográfica (Tabla 3). Al final de este proceso se obtuvieron seis fracciones cuaternarias (**F9-2-1** a **F9-2-6**). Enseguida la fracción **F9-2-2** (Tabla 3; 90.8 mg) se sometió a otro fraccionamiento mediante CCA sobre Sephadex LH-20, utilizando MeOH como eluyente. De este proceso se obtuvieron 70 fracciones de 3 mL cada una.

Cada fracción se analizó cuidadosamente mediante CCD y se reunieron por su similitud (Tabla 4), para obtener finalmente diez conjuntos de fracciones (**F9-2-2-1** a **F9-2-2-10**). De la fracción **F9-2-2-3** precipitaron de manera espontánea 15.0 mg del Hiperósido (**12**). La fracción **F9-2-2-7** (Tabla 4; 27.1 mg) se reconstituyó en (CH₃)₂CO-MeOH y se sometió a una CCA sobre Sephadex LH-20 utilizando una mezcla de (CH₃)₂CO-MeOH (50:50).

Este proceso cromatográfico permitió la obtención de 50 fracciones, reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica en cinco grupos (**F9-2-2-7-1** a **F9-2-2-7-5**) (Tabla 5).

En la fracción **F9-2-2-7-1** precipitaron de manera espontánea 10.0 mg de la Juglalina (**11**). En la figura 7 se resume el proceso de aislamiento de los compuestos **11** y **12** a partir de la fracción **F9-2**.

Tabla 3. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción **F9-2**.

Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
1-4	F9-2-1	20.1
5-23	F9-2-2	90.8
24-30	F9-2-3	10.0
31-41	F9-2-4	35.4
42-53	F9-2-5	36.8
54-80	F9-2-6	24.5

Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción **F9-2-2**.

Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
1-25	F9-2-2-1	6.5
26-33	F9-2-2-2	6.8
34-36	F9-2-2-3	15.0
37-39	F9-2-2-4	1.5
40-41	F9-2-2-5	2.0
42-45	F9-2-2-6	4.0
46-56	F9-2-2-7	27.1
57-59	F9-2-2-8	5.0
60-61	F9-2-2-9	7.6
62-67	F9-2-2-10	2.5

Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción F9-2-2-7

Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
1-25	F9-2-2-7-1	10.0
26-33	F9-2-2-7-2	4.3
34-36	F9-2-2-7-3	3.4
37-39	F9-2-2-7-4	3.6
40-41	F9-2-2-7-5	4.5

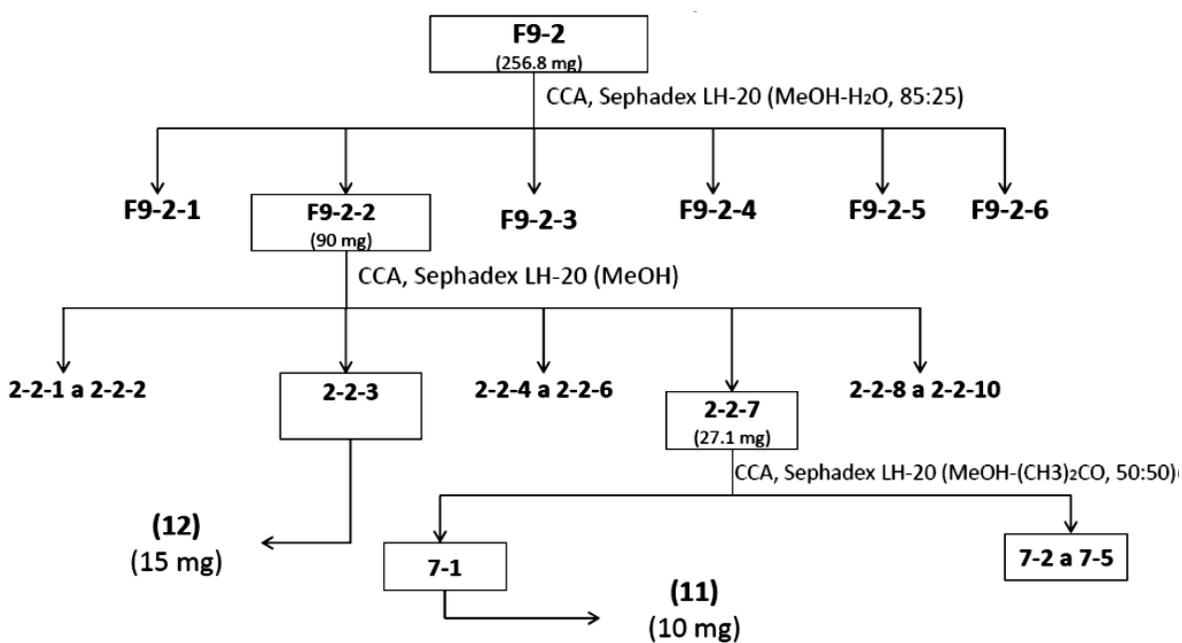


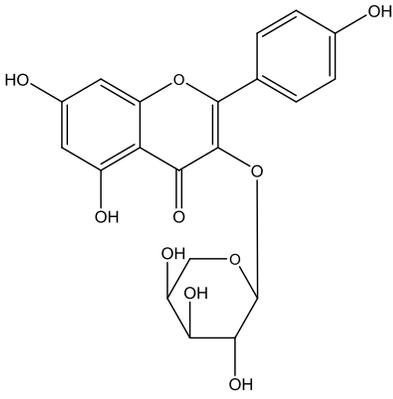
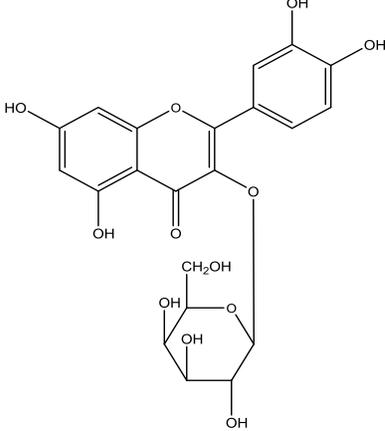
Figura 7. Aislamiento de la juglalina (11) y del hiperósido (12) a partir de la fracción F9-2

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especie vegetal *Hydrangea seemannii* se seleccionó para este proyecto primeramente considerando el criterio etnomédico de preselección de materias primas, ya que la especie se usa para tratar la diabetes y por otra parte, considerando las investigaciones químicas y farmacológicas previamente realizadas por Brindis (2011) y Aguilar (2013), en donde con base a los resultados obtenidos, comprobaron que la infusión de *H. seemannii* y la fracción de AcOEt, obtenida por partición de la infusión, tienen una actividad hipoglucemiante y antihiper glucémica relevante. Además Aguilar (2013) evidenció que es una fuente potencial de principios activos, de tipo flavonoide.

En este capítulo se describen los resultados obtenidos del estudio químico realizado con la fracción activa de AcOEt. Este fraccionamiento condujo al aislamiento de dos flavonoides glicosilados (**11** y **12**) (Tabla 6). La determinación de sus estructuras moleculares se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. A continuación se detalla la elucidación realizada para caracterizar a los compuestos aislados, que permitió proponer la estructura molecular de los flavonoides obtenidos.

Tabla 6. Compuestos aislados de la fracción activa de AcOEt.

Compuesto	Rendimiento (% en peso seco)	Compuesto	Rendimiento (% en peso seco)
 <p>Juglalina (11)</p>	0.025 %	 <p>Hiperósido (12)</p>	0.0375 %

5.1. Elucidación estructural de la juglalina (11)

El compuesto **11** se aisló como un sólido amarillo, soluble en metanol. Su fórmula molecular fue establecida como $C_{20}H_{18}O_{10}$, con base en el espectro de masas FAB positivo.

En el espectro en el IR se observan las bandas de absorción características para OH en 3356 cm^{-1} , para carbonilo de una γ -pirona en 1649 cm^{-1} y para grupos fenilos en 1562 cm^{-1} .

Los espectros de RMN permiten determinar que se trata de un flavonoide glicosilado de acuerdo con el siguiente análisis:

El espectro de RMN- ^1H presenta en la región aromática cuatro señales, dos dobletes (sistema AB) para los protones del anillo **A** (H-6, δ 6.17 y H-8, δ 6.35, ambas con $J = 2.0\text{ Hz}$), debido a un acoplamiento *meta* y dos dobletes (sistema AA'BB') para los protones del anillo **B** (H-3'/ H-5' δ 6.92 y H-2'/ H-6', δ 8.07, ambas con $J = 8.8\text{ Hz}$) debido a un acoplamiento de tipo *orto*. Todas estas señales son características de la aglicona de camperol (**5**) (Figura 8). Por otra parte, la región media del espectro muestra una señal para un protón anomérico en δ 5.19 (H-1'', d, $J = 6.4\text{ Hz}$) y en la región entre δ 3.93 y δ 3.40 las señales integran para cinco protones, que corresponden a tres metinos del residuo de azúcar (H-2'', H-3'' y H-4'') y un metileno (H-5a'' y H-5b'') (Figura 9).

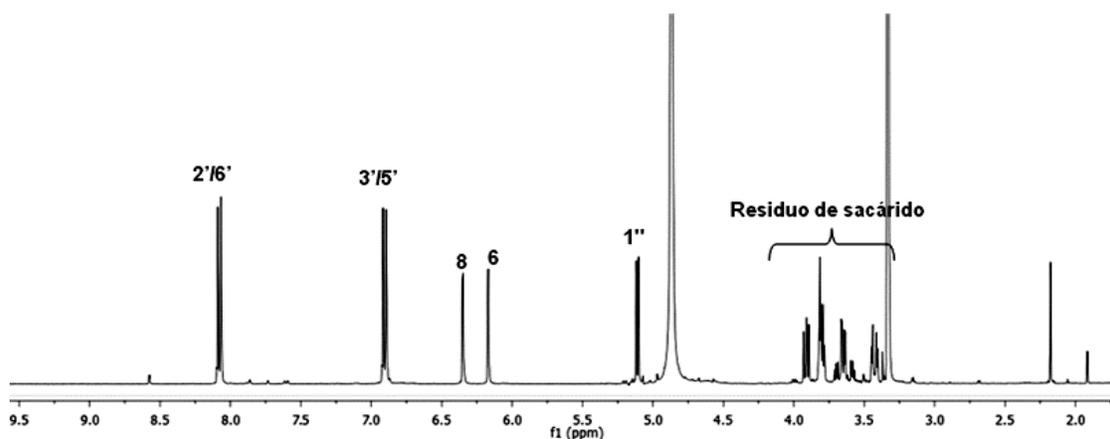


Figura 8. Espectro de RMN- ^1H (MeOD, 400 MHz) del compuesto **11**.

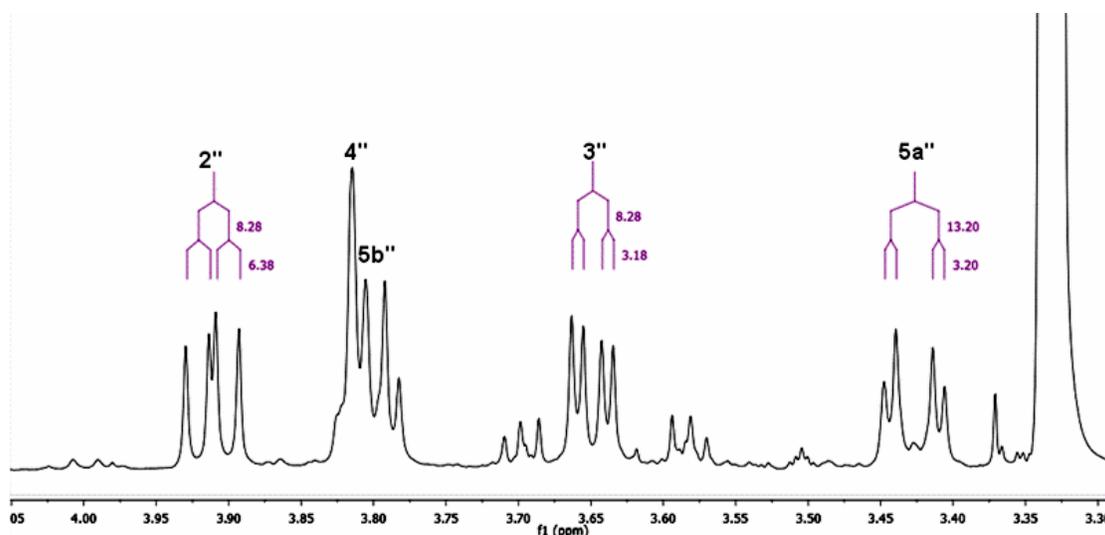


Figura 9. Región en el espectro de RMN-¹H del residuo de azúcar y constantes de acoplamiento.

Este conjunto de cinco señales, junto con H-1'' correlacionan en el espectro COSY generando los cuadros de conectividad que permiten determinar al protón vecinal correspondiente a lo largo de todo el residuo de sacárido (Figura 11). La constante de acoplamiento entre el protón anomérico H-1'' y H-2'' ($J= 6.4$ Hz) así como entre H-2'' y H-3'' ($J= 8.2$ Hz) indican que estos protones están en posición *axial-axial*, y las constantes pequeñas entre los protones H-3'', H-4'' y H-4'', H-5a'' (ambas de $J =3.2$ Hz) indican que H-4'' está en posición *ecuatorial*; este análisis permite determinar la configuración α de una arabinopiranososa (Figura 10). Esta configuración se confirma al observarse las correlaciones espaciales en el espectro NOESY entre el protón anomérico H-1'' y H-3'' (Figuras 10 y 12).



Figura 10. Correlaciones NOESY entre H-1'' y H-3'' para el sacárido de L-arabinopiranososa.

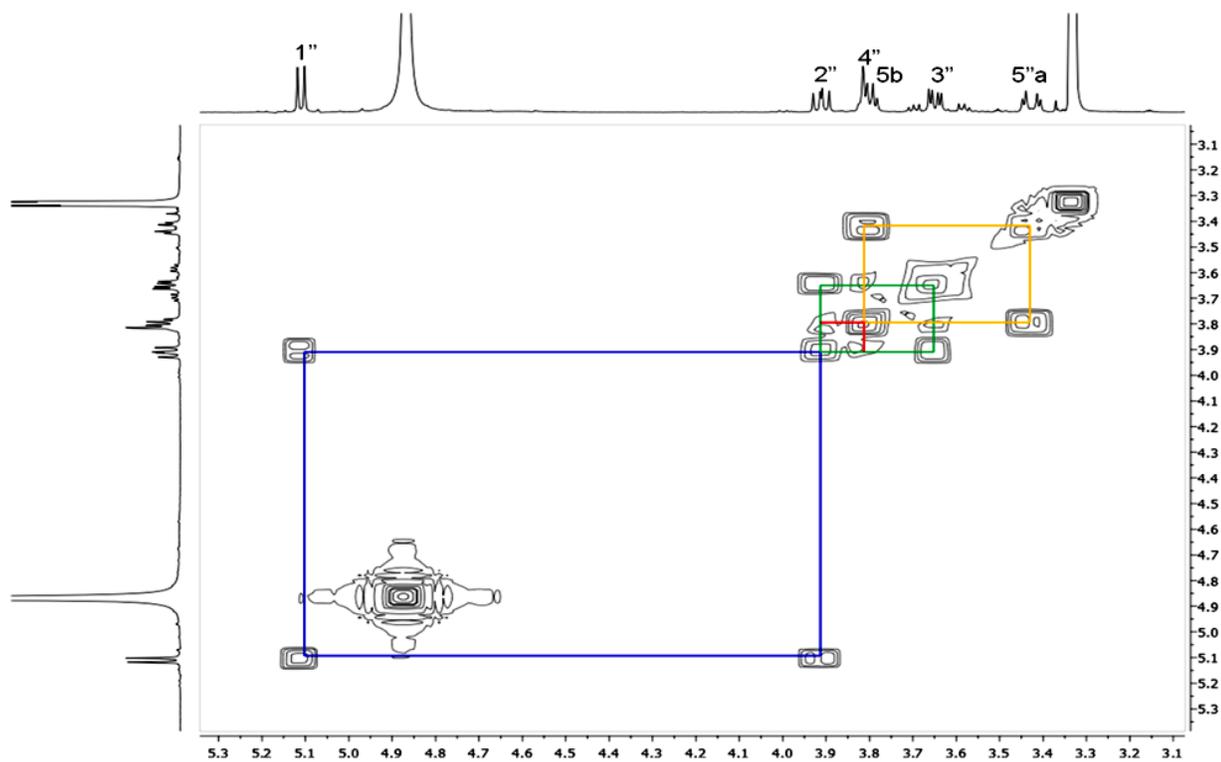


Figura 11. Espectro COSY del compuesto 11.

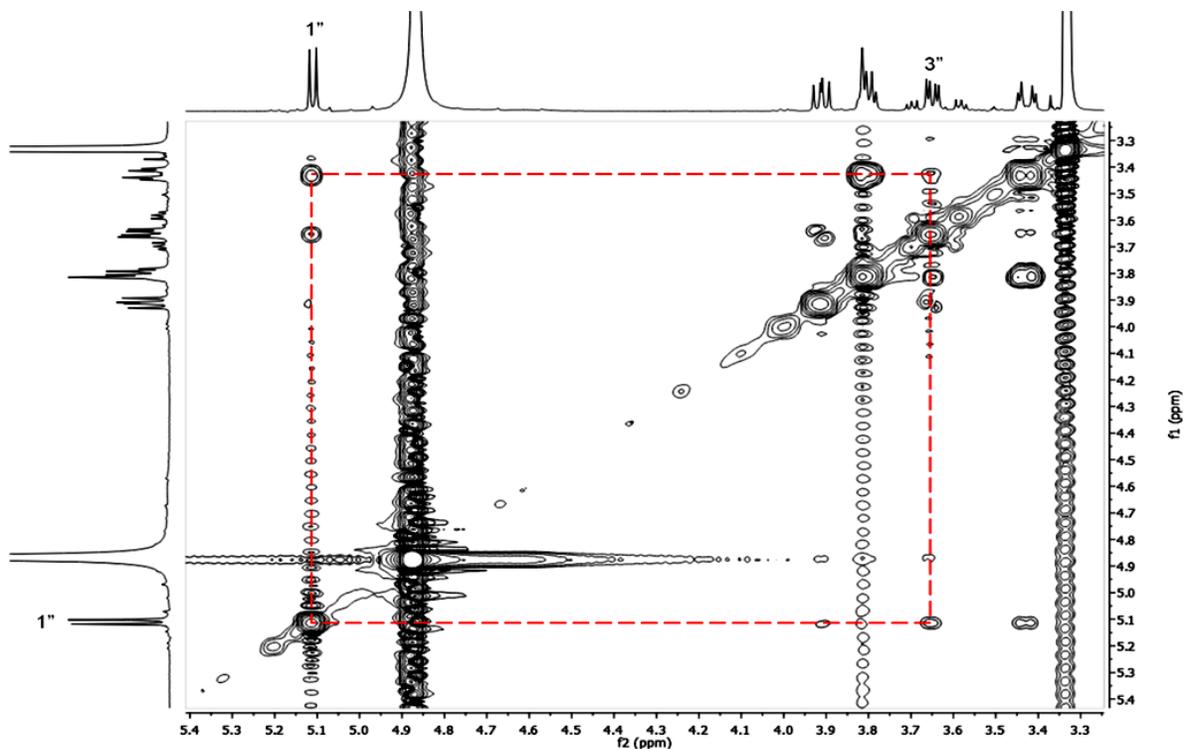


Figura 12. Espectro NOESY del compuesto 11.

El espectro de RMN-¹³C presenta señales para 18 átomos carbonos (Figura 13), lo cual indica la presencia de dos señales equivalentes que corresponden a los carbonos 2' y 6' (δ 132.2) así como 3' y 5' (δ 116.3) del anillo **B**. En la región entre δ 169.3 y δ 158.4 se observa la presencia de cinco carbonos cuaternarios base de oxígeno, de los cuales cuatro corresponden a los carbonos aromáticos del núcleo de la flavona (C-5, C-7, C-9 y C-4') y uno al carbono C-2 que pertenece al sistema alfa,beta-insaturado del anillo **C**. Las cinco señales observadas entre δ 80- δ 60 corresponden al residuo de azúcar.

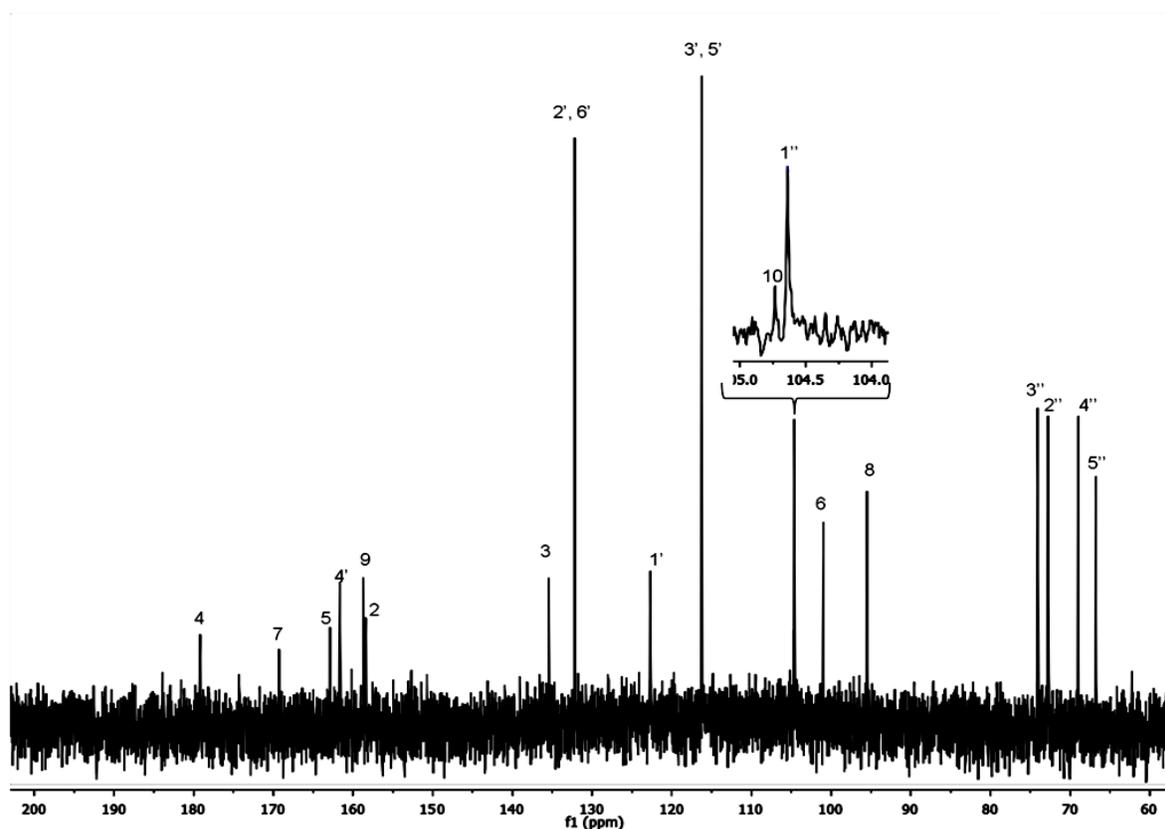


Figura 13. Espectro RMN-¹³C (MeOD, 400 MHz) del compuesto 11.

Finalmente, la ubicación de la arabinopiranososa en la aglicona de camperol (**5**) se pudo determinar mediante el experimento HMBC, en donde se observa la correlación entre H-1'' y el carbono C-3. Otra correlación importante en el espectro de HMBC es la que presentan H-1'' y el C-5'', confirmando la presencia del anillo de pirano de la arabinopiranososa (Figura 14).

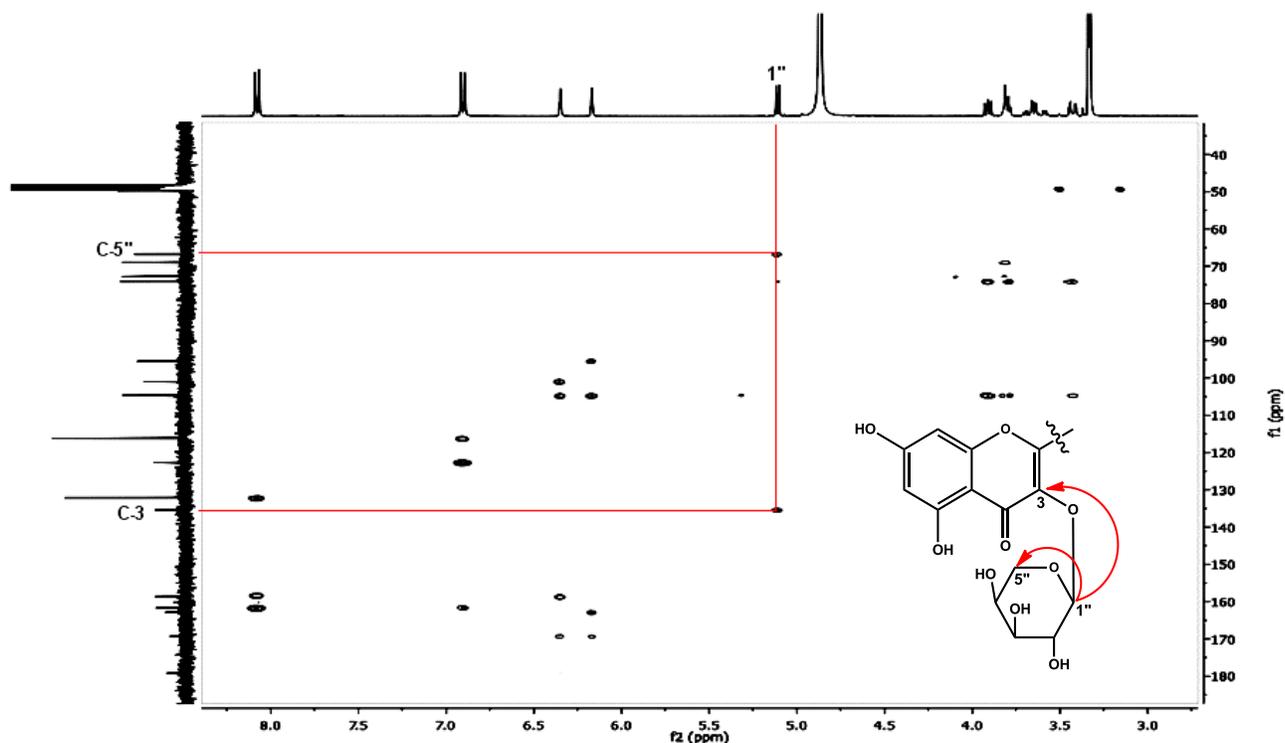
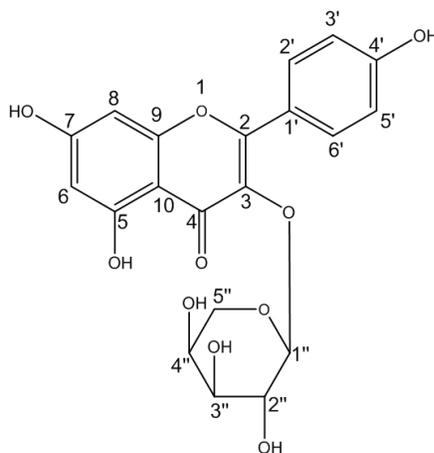


Figura 14. Espectro HMBC del compuesto 11.



11

De acuerdo con este análisis y mediante la comparación de los datos espectroscópicos se determinó que la estructura del compuesto aislado corresponde al **3-O- α -L-arabinopiranosido de camperol** el cual se conoce comúnmente como la juglalina (11) (Wang *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2011).

La presencia de este compuesto no ha sido reportada hasta la fecha para la especie *H. seemanii* ni para el género *Hydrangea*.

Por lo que respecta a su actividad farmacológica, se ha reportado que **11** presenta una actividad antioxidante moderada (Wang *et al.*, 2007; Pietta, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1996; 1997). Lin y colaboradores (2011) reportaron que este metabolito mostró una actividad inhibitoria moderada en comparación con la acarbosa, cuando se evaluó contra la enzima α -glucosidasa tipo IV extraída de la bacteria *Bacillus stearothermophilus*.

5.2 Elucidación estructural del hiperósido (12)

El compuesto **12** se aisló como un sólido amarillo, soluble en metanol. Su fórmula molecular fue determinada como $C_{21}H_{20}O_{12}$, con base en el espectro de masas FAB positivo.

En el espectro de IR se observan las bandas de absorción características para OH en 3278 cm^{-1} , para carbonilo de una γ -pirona en 1650 cm^{-1} y para grupos fenilos en 1553 cm^{-1} .

Los espectros de RMN resultaron muy similares a los registrados para el compuesto **11**. En el espectro de RMN- ^1H , en la región de los aromáticos, se detecta un sistema de tipo ABX que integra para tres hidrógenos y que corresponde a los protones H-2' en δ 7.85 (d, $J = 2.1\text{ Hz}$), H-6' en δ 7.58 (dd, $J = 2.1, 8.5\text{ Hz}$) y H-5' en δ 6.86 (d, $J = 8.5\text{ Hz}$) del anillo **B**. Se observa también un sistema de tipo AB que corresponden a los hidrógenos del anillo **A** en δ 6.40 (d, $J = 2.1\text{ Hz}$) y δ 6.18 (d, $J = 2.1\text{ Hz}$). Este patrón de sustitución corresponde a la quercetina (Figura 15). El hidrógeno anomérico aparece en δ 5.18 y presenta una constante de acoplamiento grande ($J = 7.8\text{ Hz}$) indicando que este protón se encuentran en posición *axial-axial* con respecto a 2" lo que permite establecer una configuración β . La identidad del sacárido se pudo determinar primeramente a partir de las correlaciones observadas en el espectro COSY (figura 18) y por otra parte con respecto a las constantes de acoplamiento calculadas principalmente para el H-4" (figura 16). Este protón presenta una constante de acoplamiento chica (J c.a. 3 Hz) lo que indica que se encuentra en una posición *ecuatorial-axial* con

respecto a los hidrógenos vecinales, permitiendo determinar que el sacárido se trata de la β -D-galactosa.

El espectro de RMN ^{13}C (Figura 17) presenta señales para 21 carbonos y se observan los valores de desplazamiento característico para la galactosa y la aglicona de la quercetina (1).

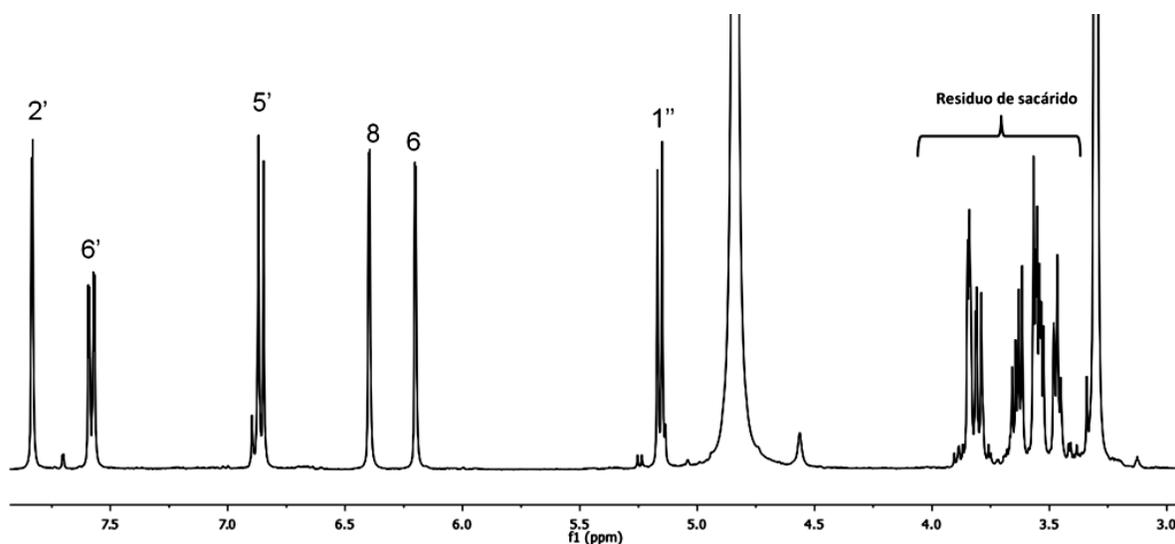


Figura 15. Espectro de RMN- ^1H (MeOD, 400 MHz) del compuesto 12.

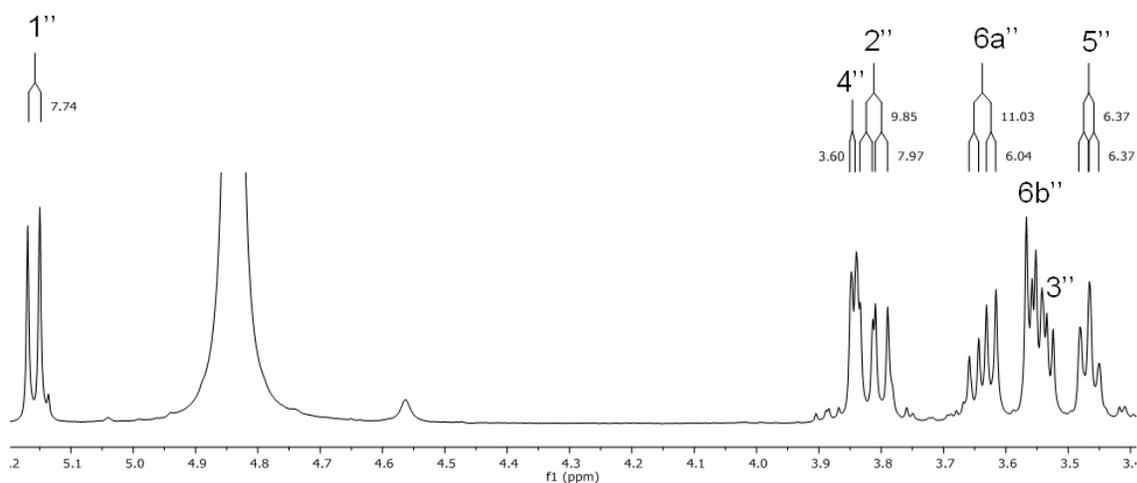


Figura 16. Región en el espectro de RMN- ^1H del residuo de azúcar y constantes de acoplamiento.

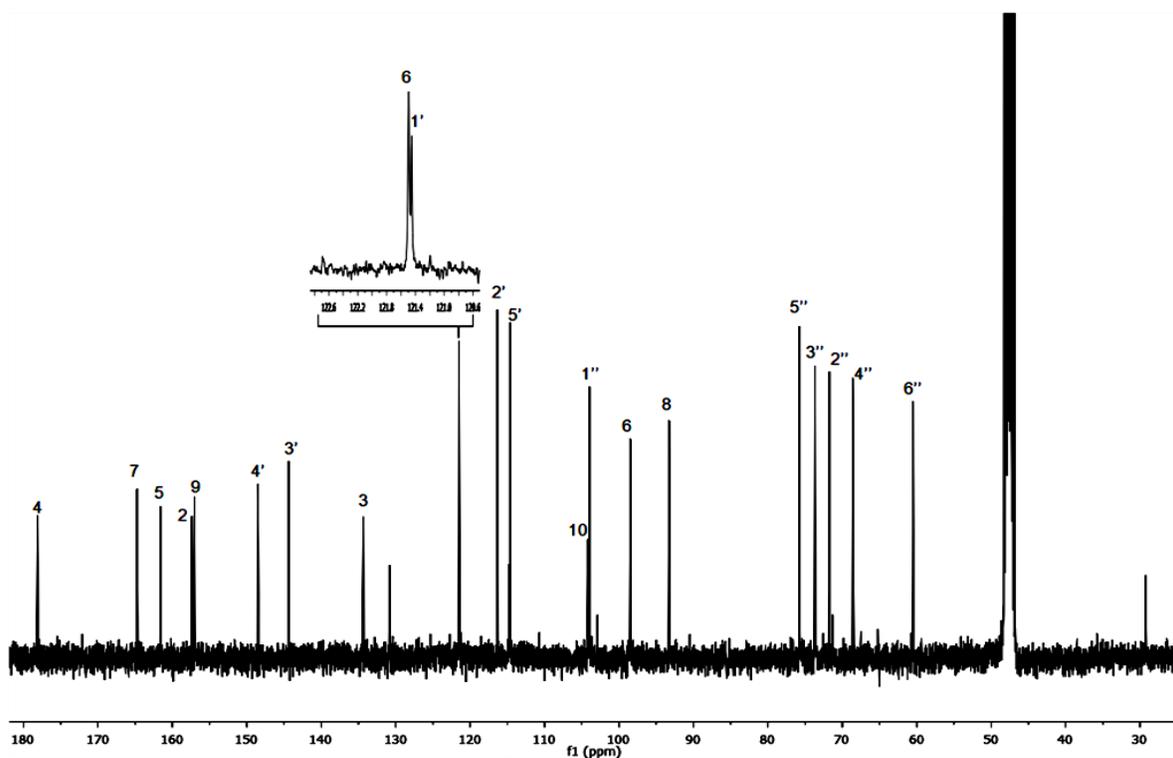


Figura 17. Espectro RMN- ^{13}C (MeOD, 400 MHz) del compuesto 12.

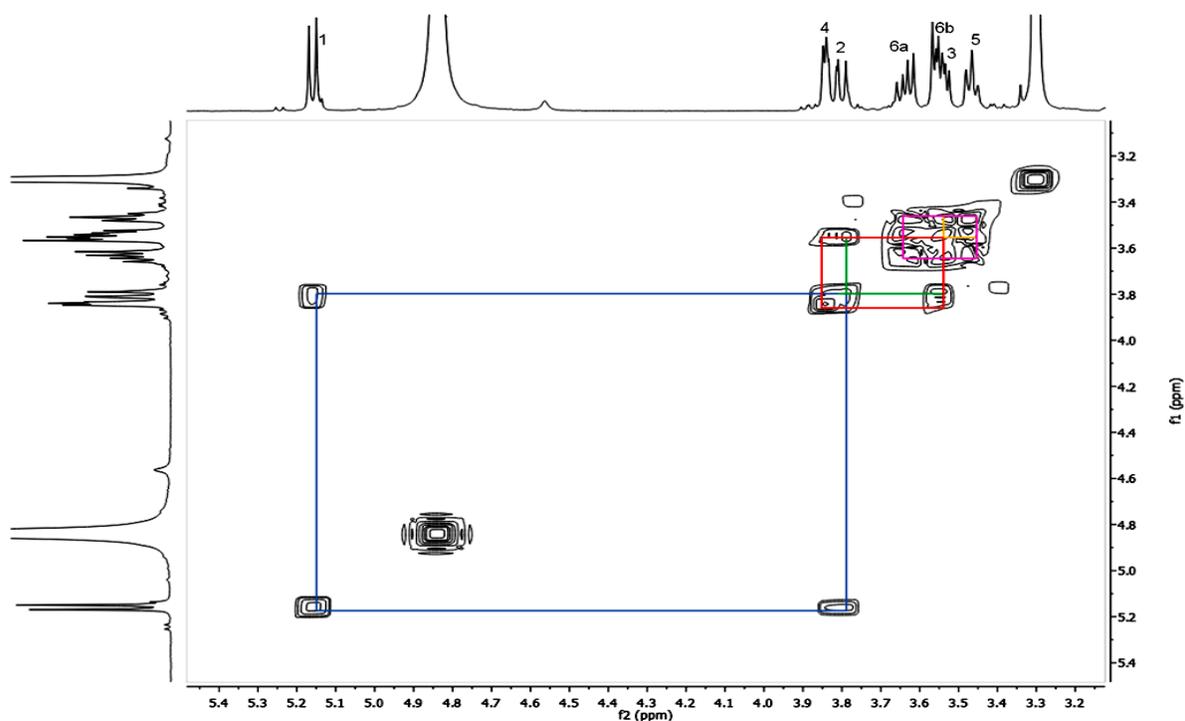
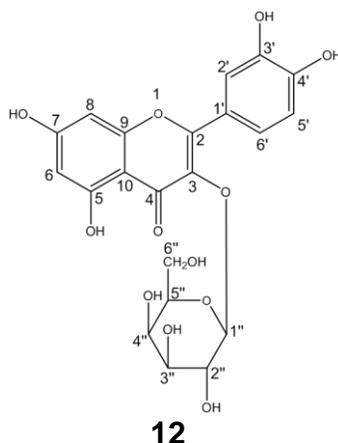


Figura 18. Espectro COSY del compuesto 12.



De acuerdo a este análisis y por comparación de sus datos espectroscópicos se determinó que la estructura del compuesto **12** corresponde al **3-O-β-D-galactósido de quercetina** el cual se conoce comúnmente como hiperósido (**12**).

La presencia de este compuesto se ha reportado para otras especies del genero *Hydrangea*, sin embargo, para *H. seemannii* es el primer reporte que se hace hasta la fecha.

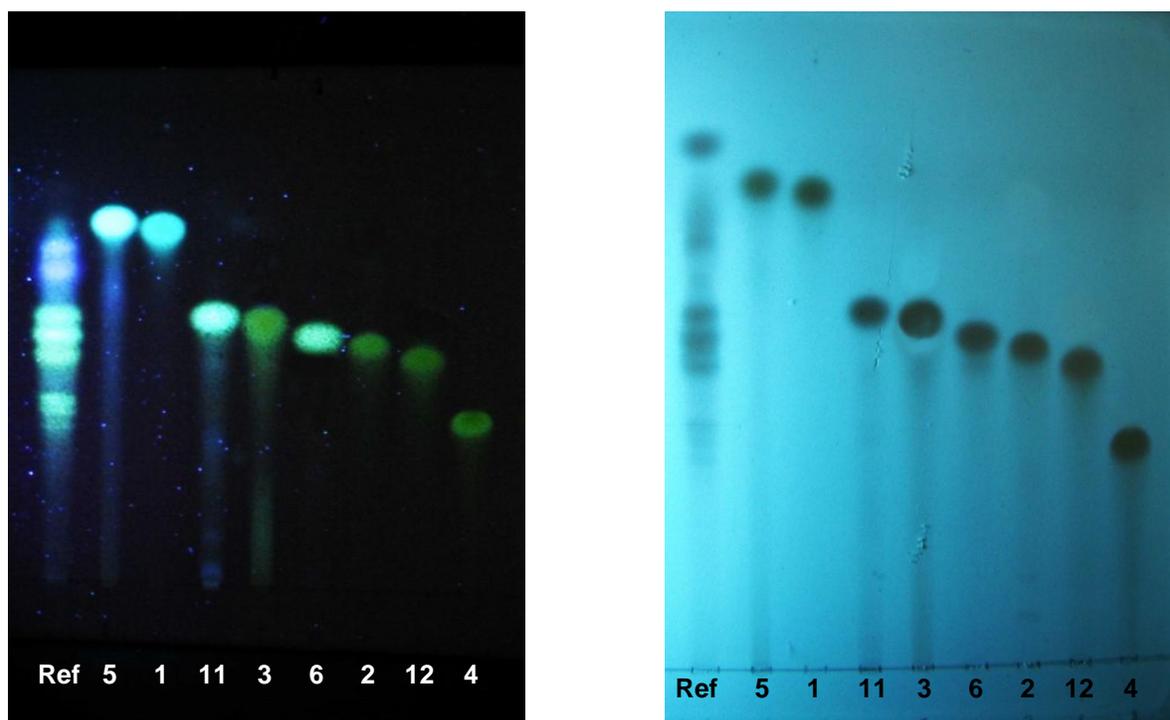
Este metabolito presenta una actividad inhibitoria de la dipeptidil peptidasa IV la cual es una enzima que se distribuye en varios tejidos y se encarga de metabolizar al péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) y al polipéptido inhibitor gástrico (GIP) disminuyendo los niveles de glucosa posprandial, lo cual se presenta como otra excelente alternativa para el tratamiento de la diabetes (Eidenberger *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2013). También se sabe que el compuesto **12**, tiene un efecto inhibitorio sobre la enzima PTPB1 (proteína tirosina fosfatasa 1B), la cual se encuentra asociada también con la DM2. (Zhai *et al.*, 2013). Adicional a la actividad antidiabética, también se ha reportado que **12** presenta una actividad antidepresiva (Jakobs *et al.*, 2013) y antialérgica importante (Han *et al.*, 2013).

Tabla 7. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de los compuestos **11** y **12**.

	11		12	
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
2	158.4		158.8	
3	135.4		135.7	
4	179.2		179.5	
5	162.9		163.0	
6	100.9	6.17 (d, 2.0)	99.9	6.20 (d, 2.0)
7	169.3		166.2	
8	95.5	6.35 (d, 2.0)	94.7	6.40 (d, 2.1)
9	158.7		158.5	
10	104.7		105.6	
1'	122.6		122.9	
2'	132.2	8.07 (d, 8.8)	117.8	7.83 (d, 2.21)
3'	116.3	6.90 (d, 8.9)	145.8	
4'	161.7		149.9	
5'	116.3	6.90 (d, 8.9)	116.1	6.86 (d, 8.5)
6'	132.2	8.07 (d, 8.8)	122.9	7.58 (dd, 8.4, 2.2)
1''	104.6	5.11 (d, 6.4)	105.4	5.16 (d, 7.7)
2''	72.8	3.9 (dd, 6.4, 8.9)	73.2	3.81 (dd, 7.9, 9.8)
3''	74.1	3.65 (dd, 3.2, 8.3)	75.1	3.54-3.52 (m)
4''	68.9	3.81-3.80 (m)	70.0	3.84 (d, 3.6)
5''	66.7	a: 3.45 (dd, 3.2, 13.2) b: 3.81-3.78 (m)	77.2	3.47 (dd, 6.4, 6.4)
6''			61.9	a: 3.63 (dd, 6.0, 11.0) b: 3.57-3.55 (m)

5.3 Identificación por CCD de los flavonoides aislados de *H. seemannii*

De manera adicional se obtuvo un cromatograma en capa delgada (CCD) de la fracción de AcOEt y compuestos aislados. Se utilizaron cromatoplasas de gel de sílice de HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography, por sus siglas en ingles) y como agente revelador $AlCl_3$ y luz UV (254 nm). Los estándares seleccionados fueron los compuestos **1-6**. Los resultados obtenidos se pueden ver en las figuras 19a y 19b. En la Figura 19a, la cromatoplasca se reveló con $AlCl_3$ y se puede ver la fluorescencia característica generada por la formación de un complejo colorido entre el Al^{III} y los grupos hidroxilos de los flavonoides (Zhishen *et al.*, 1999)



a)

b)

Figura 18. a) Revelada con $AlCl_3$; b) UV (254 nm). Mezcla de elución: AcOEt-MeOH- H_2O (8:1.5:0.5). Concentración 1 mg/mL. Ref: Fracción AcOEt; (5): Camperol; (1): Quercetina; (11): Juglalina; (3): 3-O- β -L-arabinopiranosido de quercetina; (6): Astragalina; (2): Isoquercetina; (12): Hiperósido, (4): Rutina.

6. CONCLUSIONES

Se lograron aislar y caracterizar 2 flavonoides adicionales, que de acuerdo con su elucidación estructural corresponden a la juglalina (**11**), un α -L-arabinopiranosido de camperol (**5**) y el otro al hiperósido (**12**), un β -D-galactopiranosido de quercetina (**1**).

Este es el primer reporte de la presencia de ambos compuestos en la especie *H. seemannii* y en el caso de la juglalina (**11**), es el primer reporte de su aislamiento en el género *Hydrangea*.

La presencia de estos compuestos permiten determinar la importancia de *H. seemannii* como una fuente potencial de obtención de flavonoides de tipo flavonol, los cuales presentan diversas actividades farmacológicas importantes, relacionadas principalmente con el uso medicinal que se le da a la planta.

El aislamiento y la elucidación de estos compuestos contribuyen al conocimiento de la química de la especie.

7. REFERENCIAS

1. Aguilar Cruz R. (2013). Principios hipoglucemiantes de *Hydrangea seemannii* (*Hydrangeaceae*). Tesis de Maestría, UNAM
2. Bentsath, A., Rusznyak, S., Szent-Györgyi, A. (1936). Vitamin nature of flavones. *Nature*, 138, 798.
3. Berletch, J.B., Liu, C., Love, W.K., Andrews, L.G., Katiyar, S.K., Tollefsbol, T.O. (2008). Epigenetic and genetic mechanisms contribute to telomerase inhibition by EGCG. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103, 509–519.
4. Brindis Hernández F. (2011). Evaluación de la eficacia antihiperlipidémica de *Lingusticum posterii* Coult., *Hydrangea seemannii* L. Riley y *Anoda cristata* (L.) Schldl. Tesis de Doctorado, UNAM
5. Busse, W.W., Kopp, D.E., Middleton, E.Jr. (1984). Flavonoid modulation of human neutrophil functions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73, 801–809.
6. Caldwell, M. M., Robberecht, R., Flint, S.D. (1983). Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiological Plant*, 58, 445–450.
7. Cerbah, M., Mortreau E., Brown, S., Siljak-Yakovlev S., Bertrand, H., Lambert, C. (2001). Genome size variation and species relationships in the genus *Hydrangea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 45–51.
8. Crozier, A., Jaganath, I., Clifford, M., (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Products Reports*, 26, 965–1096.
9. Corcoran, M.P., McKay, D.L., Blumberg, J.B. (2012). Flavonoid Basics: Chemistry, Sources, Mechanisms of Action, and Safety. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics*, 31, 176–189.
10. Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Laganà, A. (2011). Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 25, 469–495.
11. Galleano, M., Calabro, V., Prince, P., Litterio, M. Piotrkowski, B., Vazquez-Prieto, M., Miatello, R., Oteiza P., Fraga, C. (2012). Flavonoids and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259, 87–94.
12. Geraets, L., Moonen, H.J., Brauers, K., Wouters, E.F., Bast, A., Hageman, G.J. (2007). Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *Journal of Nutrition*, 137, 2190–2195.

13. Eidenberger, T., Selg, M., Krennhuber, K. (2013). Inhibition of dipeptidil peptidase activity by Flavonol glycosides of guava (*Psidium guajava* L.): A key to the beneficial effects of guava in type II diabetes mellitus. *Fitoterapia*, 89, 74-79.
14. Gerritsen, M.E., Carley, W.W., Ranges, G.E., Shen, C.P., Phan, S.A., Ligon, G.F., Perry, C.A. (1995). Flavonoids inhibit cytokine induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *American Journal of Pathology*, 147, 278–292.
15. Han, N.R., Go, J. H., Kim, H. M., Jeong, H. J. (2013). Hyperoside Regulates the Level of Thymic Stromal Lymphopoietin through Intracellular Calcium Signalling. *Phytotherapy research*, 1, 1099-1105
16. Hellerstein, H.K., Orbison, J.L., Rodbard, S., Wilburne, M., Katz, L.N. (1951). The effect of rutin in experimental malignant hypertension. *American Heart Journal*, 42, 271–283.
17. *Hydrangea seemannii*. (s.f.). Recuperado el 18 de Mayo de 2014, de <http://www.sfbotanicalgarden.org>
18. *Hydrangea seemannii*. (s.f.). Recuperado el 05 de mayo de 2014, de www.tropicos.org
19. Jakobs, D., Hage-Hülsmann, A., Prenner, L., Kolb, C., Weiser, D., Häberlein, H. (2013). Downregulation of β 1-adrenergic receptors in rat C6 glioblastoma cells by hyperforin and hyperoside from St John's wort. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65, 907–915.
20. Kobori, M. (2014). Dietary Quercetin and other Polyphenols: Attenuation of Obesity. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, 163–175.
21. Landolfi, R., Mower, R.L., Steiner, M. (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure–activity relations. *Biochemical Pharmacology*, 33, 1525–1530.
22. Lin, H.C., Tsai, S.F., Lee, S.S. (2011). Flavonoid Glycosides from the Leaves of *Machilus philippinensis*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 58, 555-562.
23. Liang, Q., Li, G.Q., Xu, W.H. (2013). Chemical composition of essential oil from *Hydrangea macrophylla* flower. *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 365.
24. McClintock E. (1957). A monograph of the genus *Hydrangea*. *Proceedings of the California Academy of Sciences, Series 4*, 29, 147–256.
25. Morán, E., Budía, A., Broseta A., Boronat, F. (2013). Fitoterapia en Urología. Evidencia científica actual de su aplicación en urolitiasis, dolor pélvico crónico, disfunción eréctil e infecciones urinarias. *Actas Urológicas Españolas*, 37, 174–180.

26. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042.
27. Rice-Evans, C., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933–956.
28. Rice-Evans, C., Miller, N. J., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152–159.
29. Richardson, G.A., El-Rafey, M.S., Long, M.L. (1947). Flavones and flavone derivatives as antioxidants. *Journal of Dairy Science*, 30, 397.
30. Robak, J., Gryglewski, R.J., (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, 37, 837–841.
31. Salmeán, G., Reyes, G., Sánchez, I. (2012). Obesity and metabolic syndrome: Future therapeutics based on novel molecular pathways. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 24, 204–211.
32. Scarborough, H. (1940). Deficiency of vitamin C and vitamin P in man. *Lancet*, 2, 644.
33. Shi, J., Li, C.J., Yang, J.Z., Yuan, Y. H., Chen, N.H., Zhang, D.M. (2014). Coumarin glycosides and iridoid glucosides with neuroprotective effects from *Hydrangea paniculata*. *Planta Medica*, 78, 1844–1850.
34. Shi, J., Li, C.J., Yang, J.Z., Ma, J., Wang, C., Tang, J., Li, Y., Chen, H., Zhang, D.M. (2014). Hepatoprotective coumarins and secoiridoids from *Hydrangea paniculata*. *Fitoterapia*, 96, 138–145.
35. Somogyi, J.C. (1945). An investigation of substances which inhibit vitamin C degradation. *Internationale Zeitschrift für Vitaminforschung*, 16, 134.
36. Tanwar, B., Modgil, R. (2012). Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. *Spatula DD*, 2, 59–68.
37. Tauber, A.I., Fay, J.R., Marletta, M. A. (1984). Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochemical Pharmacology*, 33, 1367–1369.
38. Tsai, S.H., Liang, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K. (1999). Suppression of TNF α -mediated NF κ B activity by myricetin and other flavonoids through down regulating the activity of IKK in ECV304 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 74, 606–615.
39. Unnikrishnan, M.K., Veerapur, V., Nayak, Y., Mudgal, P., Mathew, G. (2014). Antidiabetic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effect of the Flavonoids, *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, 143-161.

40. Verri, W.A., Vicentini, T.M.C., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Cardoso, D.R., Cunha, T.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Fonseca, M.J.V., Casagrande, R. (2012). Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms. *Bioactive Natural Products*, 36, 297–330.
41. Wang, K.J., Yang, C.R., Zhang, Y.J. (2007). Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*). *Food Chemistry*, 101, 365–371.
42. Weseler, A., Bast, A. (2012). Pleiotropic-Acting Nutrients Require Integrative Investigational Approaches: The Example of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8941–8946.
43. Wynn, S.G., Fougère, B.J. (2007). Veterinary Herbal Medicine: A systems-Based Approach. *Veterinary Herbal Medicine*, 1, 291–409.
44. Zhai, X., Lenon, G., Li, C. G. (2013). Virtual screening of potential active compounds for type 2 diabetes in *Euonymus Alatus*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 40, 41-43.
45. Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

8. ANEXOS

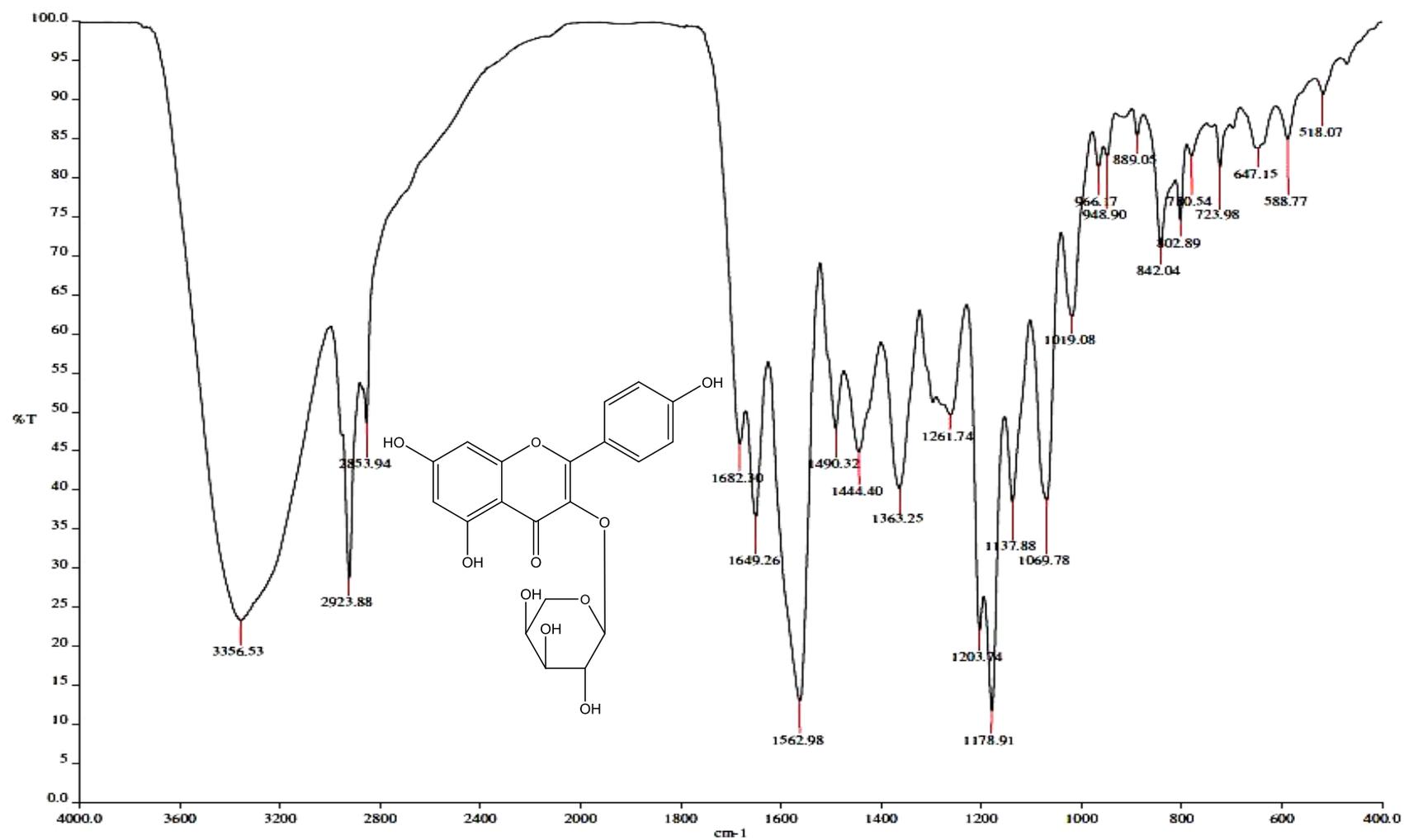


Figura 20. Espectro en el infrarrojo de la juglina (11)

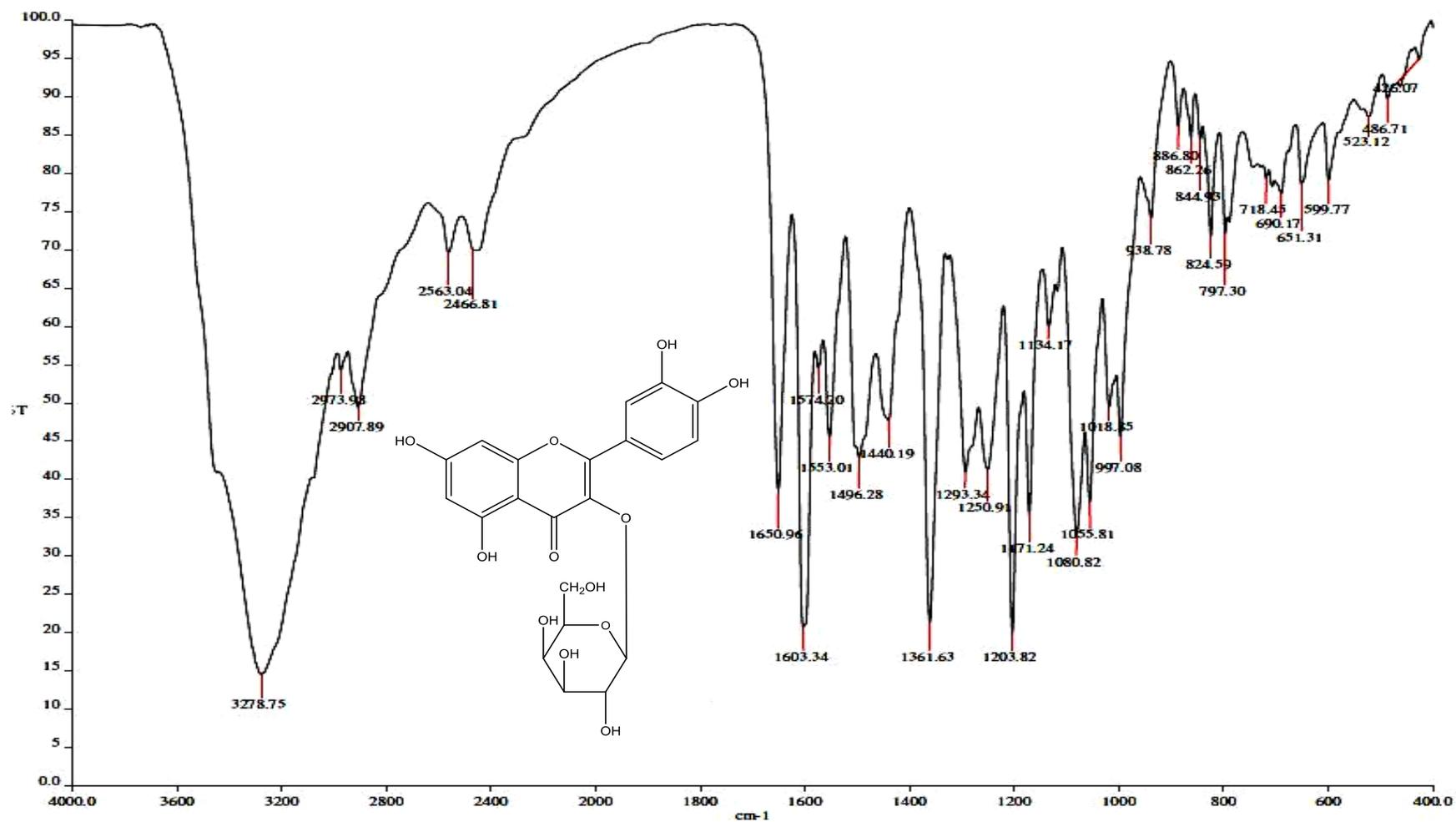


Figura 21. Espectro en el infrarrojo del hiperósido (12)

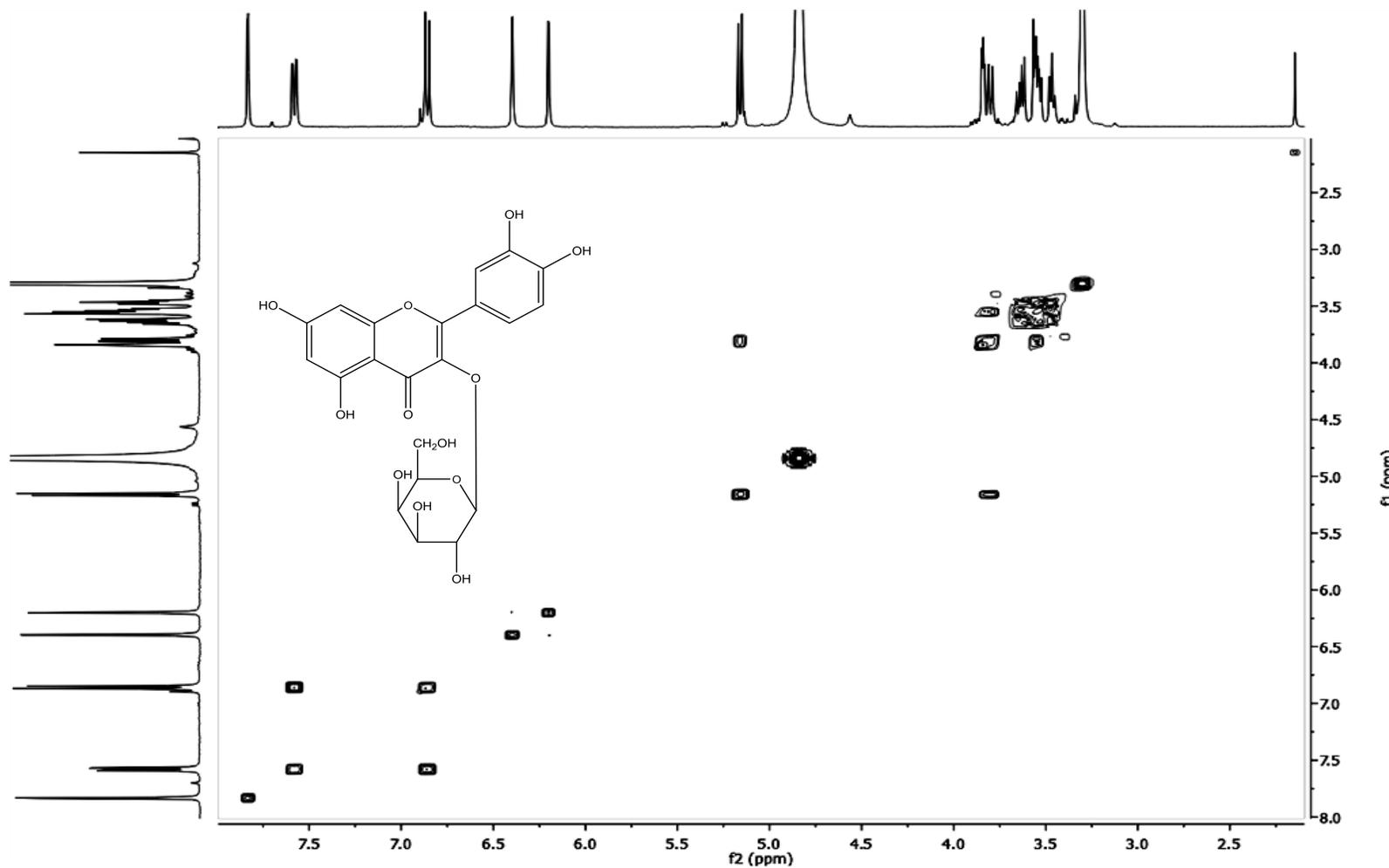


Figura 22. Espectro COSY del hiperósido (12)

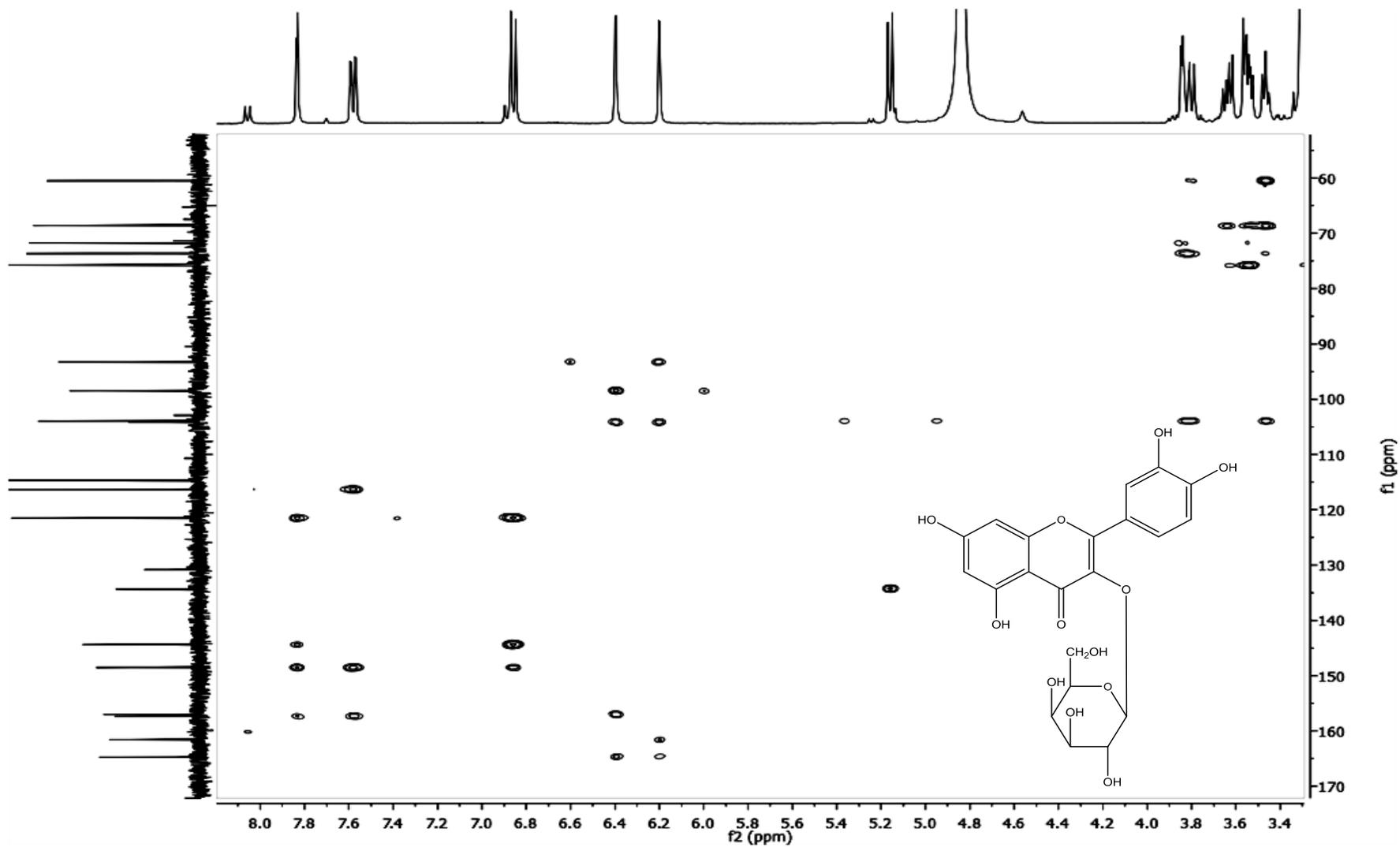


Figura 23. Espectro HMBC del hiperósido (12)