



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**BÚSQUEDA DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIHIPERGLICÉMICA EN ESPECIES SELECTAS DE LA FAMILIA
FABACEAE EMPLEADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

JOSÉ MANUEL NARVÁEZ MASTACHE



TUTOR: DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS AÑO: 2007

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Claudia Angélica Soto Peredo del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Nacional Autónoma Metropolitana por las facilidades y asesoría en parte de las bioevaluaciones realizadas.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas por su apoyo y asesoría para la realización del presente proyecto.

A la Dra. María Luisa Garduño Ramírez del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por las facilidades y asesoría otorgadas para la evaluación de la actividad hipoglucemiante.

Al M. en C. Ramiro Cruz Durán, técnico académico del Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por la recolección, depósito e identificación del material vegetal.

A la Dra. Beatriz Quiroz García, al M. en C. Antonio Nieto Camacho, a la M en C María Teresa Ramírez Apan y al I.Q. Luis Velasco Ibarra, personal técnico académico del Instituto de Química de la UNAM, por la asistencia otorgada.

Al CONACYT por la beca crédito otorgada (No. 181608), y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, por los apoyos otorgados.

A MIS HIJOS MANUEL Y SAMUEL

A MI ESPOSA DULCE

A MIS PADRES

ÍNDICE

	Página
Lista de tablas	iv
Lista de figuras	v
Lista de espectros	vii
Abreviaturas y símbolos	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Generalidades de Diabetes	3
2.1.1. Diabetes y estrés oxidativo	4
2.2. Tratamiento de la Diabetes	7
2.2.1. Hipoglicemiantes orales	7
2.2.2. Medicina tradicional	8
2.3. Diabetes y familia Fabaceae	14
2.4. Generalidades del género <i>Eysenhardtia</i>	17
2.5. Generalidades del género <i>Senna</i>	18
2.5.1. <i>Senna occidentalis</i> Linn.	19
2.5.2. <i>Senna obtusifolia</i> Irwin et Barneby.	21
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos específicos	24
5. PARTE EXPERIMENTAL	25
5.1. Metodología General	25
5.2. Preparación de los extractos crudos	26
5.3. Evaluaciones Biológicas	27
5.3.1. Animales de estudio	27
5.3.2. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos de <i>E. platycarpa</i> en ratas normales	27
5.3.3. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos de <i>E. platycarpa</i> en ratas diabetizadas con estreptozotocina.	28
5.3.3.1. Análisis estadístico	28
5.3.4. Evaluación de la actividad antioxidante en homogenado pancreático. Determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB)	28
5.3.5. Cuantificación del glutatión reducido (GSH) en homogenado pancreático	29
5.3.6. Evaluación de la actividad reductora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DFPH)	30

5.3.7. Evaluación del efecto del efecto de la actividad antioxidante en ratas tratadas con estreptozotocina (STZ)	30
5.3.7.1. Cuantificación de glucosa en sangre	31
5.3.7.2. Cuantificación de proteínas en el homogenado pancreático	31
5.3.7.3. Cuantificación de los productos de peroxidación de lípidos (SRATB)	31
5.3.7.4. Evaluación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	31
5.3.7.5. Evaluación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GSHPx)	32
5.3.7.6. Evaluación de la actividad de la catalasa (Cat)	33
5.4. Estudio químico	34
5.4.1. Métodos Generales	34
5.4.2. Estudio químico de <i>E. platycarpa</i>	34
5.4.2.1. Estudio químico del extracto metanólico de las ramas	34
5.4.2.2. Estudio químico del extracto metanólico de las hojas	39
5.4.3. Síntesis por relevo de 3 β - <i>O</i> -acetil-11 α ,12 α -epoxioleanan-28,13 β -ólida (90)	41
5.4.3.1. Obtención de ácido 3 β - <i>O</i> -acetiloleanólico (88)	41
5.4.3.2. Obtención de 3 β - <i>O</i> -acetil-12 α -bromo28,13 β -ólida (106)	41
5.4.3.3. Obtención de 3 β - <i>O</i> -acetil-11-en-28,13 β -ólida (107)	42
5.4.3.4. Obtención de 3 β - <i>O</i> -acetil-11 α ,12 α -epoxioleanan-28,13 β -ólida (90)	42
5.4.4. Estudio químico de <i>E. subcoriacea</i>	43
5.4.4.1. Estudio químico del extracto metanólico de la corteza	43
5.4.4.2. Estudio químico del extracto metanólico de las ramas	48
5.4.4.3. Estudio químico del extracto metanólico de las hojas	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
6.1. Primera parte	51
6.1.1. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos crudos	51
6.1.2. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de <i>E. platycarpa</i>	54
6.2. Segunda parte	56
6.2.1. Estudio químico de <i>E. platycarpa</i>	57
6.2.2. Estudio químico de <i>E. subcoriacea</i>	67
6.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos puros	73
6.2.4. Evaluación de la actividad hipoglicemiante en ratas diabetizadas con estreptozotocina	75
6.3. Tercera parte	76
6.3.1. Síntesis por relevo de la 3 β -acetil-11 α ,12 α -epoxioleanan-28,13 β -ólida (90)	76
6.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante de 90 y 98 en un modelo de diabetes experimental	77
7 CONCLUSIONES	85
8. REFERENCIAS	87

9. ESPECTROS

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Principales causas de defunción en México	4
2. Especies vegetales con actividad antioxidante y antihiper glucémica	9
3. Especies de la familia Fabaceae empleadas en la medicina tradicional mexicana para tratamiento de la diabetes	16
4. Especies vegetales selectas para este estudio	26
5. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de las especies seleccionadas.	53
6. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H para 80 y Dinklagina B	60
7. Datos de RMN ^{13}C y ^1H para glicicumarina (105) y 98 .	72
8. Actividad antioxidante de 90 y los compuestos aislados de <i>E. subcoriacea</i>	75

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Metabolismo de la glucosa en la diabetes	5
2. Sistema antioxidante endógeno	6
3. Metodología general	25
4. Evaluación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	32
5. Evaluación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GSHPx)	33
6. Evaluación de la actividad de la catalasa (Cat.)	34
7. Procedimiento experimental aplicado al extracto metanólico de la corteza	43
8. Tratamiento experimental de la fracción soluble en <i>n</i> -BuOH del extracto MeOH de la corteza	47
9. Tratamiento del extracto metanólico de las hojas	50
10. Peroxidación de lípidos inducida por el HAAP	52
11. Efecto agudo de HEP (a) and REP (b) en ratas normales	54
12. Efecto agudo de HEP (a), CEP (b) y REP (c) en ratas diabetizadas con estreptozotocina	56
13. Compuestos aislados de <i>E. platycarpa</i>	57
14. Desplazamientos químicos del anillo de hidroxidimetildihidropirano presente en 80	59
15. Interacciones NOESY (a) y HMBC (b) relevantes para 80	59
16. Determinación de la configuración absoluta de 80	61
17. Interacciones NOESY relevantes de 81	62
18. Fragmentaciones propuestas para 81 y 82	63
19. Fragmentaciones propuestas para 83	64
20. Correlación HMBC selectas de 85	65
21. Dicroísmo circular de 81	65
22. Principal fragmentación de triterpenos con insaturación en Δ^{12}	66
23. Compuestos aislados de <i>E. subcoriacea</i>	67
24. Estructuras resonantes de 98 (fragmento A) que explica las asignaciones establecidas en el espectro de RMN ^1H	69
25. Fragmento de 3"-hidroximetil-4"-hidroxibut-2"-enilo en 98 (fragmento B)	69
26. Interacciones HMBC selectas para 98	70

27. Interacciones NOESY relevantes para 98	71
28. Biosíntesis de pterocarpanos, isoflavanos y cumestanos	73
29. Efecto agudo del ácido 3- <i>O</i> -acetiloleanólico (88) en ratas diabetizadas con estreptozotocina	76
30. Síntesis por relevo de 3 β - <i>O</i> -acetil-11 α ,12 α -epoxi-oleanan-28,13 β -ólida (90)	77
31. Efecto de 90 y 98 en la concentración de glucosa	78
32. Efecto de 90 y 98 en los niveles de SRATB en páncreas	79
33. Descomposición espontánea de la STZ en las células β para formar especies carbamoylantes y alquilantes	80
34. Sistema antioxidante endógeno	81
35. Efecto de 90 y 98 en la actividad de la SOD	82
36. Efecto de 90 y 98 en la actividad de la GSHPx	83
37. Efecto de 90 y 98 en la actividad de la Cat	83

LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1. IR de (1'' <i>R</i>)-5,4',1''-trihidroxi-6,7-(3'',3''-dimetilcroman)-flavona (80)	101
Espectro 2. RMN ¹ H de (1'' <i>R</i>)-5,4',1''-trihidroxi-6,7-(3'',3''-dimetilcroman)-flavona (80)	102
Espectro 3. RMN ¹³ C de (1'' <i>R</i>)-5,4',1''-trihidroxi-6,7-(3'',3''-dimetilcroman)-flavona (80)	103
Espectro 4. IR de 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (81)	104
Espectro 5. RMN ¹ H de 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (81)	105
Espectro 6. RMN ¹³ C de 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (81)	106
Espectro 7. EM de 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (81)	107
Espectro 8. RMN ¹ H de glabranina (82)	108
Espectro 9. EM de glabranina (82)	109
Espectro 10. IR de 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (83)	110
Espectro 11. IR de 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (83)	111
Espectro 12. EM de 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (83)	112
Espectro 13. IR de (2 <i>S</i>)- 4'- <i>O</i> -metil-6-metil-8-prenilnaringenina (85)	113
Espectro 14. RMN ¹ H de (2 <i>S</i>)- 4'- <i>O</i> -metil-6-metil-8-prenilnaringenina (85)	114
Espectro 15. RMN ¹³ C de 5,7-dihidroxi-6-metil-4'-metoxi-8-prenilflavanona (85)	115
Espectro 16. IR del ácido 3β- <i>O</i> -acetiloleanólico (88)	116
Espectro 17. RMN ¹ H del ácido 3β- <i>O</i> -acetiloleanólico (88)	117
Espectro 18. EM del ácido 3β- <i>O</i> -acetiloleanólico (88)	118
Espectro 19. IR de 3β- <i>O</i> -acetil-11α,12α-epoxi-oleanan-28,13β-ólida (90)	119
Espectro 20. RMN ¹ H de 3β- <i>O</i> -acetil-11α,12α-epoxi-oleanan-28,13β-ólida (90)	120
Espectro 21. EM de 3β- <i>O</i> -acetil-11α,12α-epoxi-oleanan-28,13β-ólida (90)	121
Espectro 22. IR de 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxfenil)-6-(3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enil)-7-hidroxicumarina (98).	122
Espectro 23. UV de 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxfenil)-6-(3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enil)-7-hidroxicumarina (98)	123
Espectro 24. RMN ¹ H de 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxfenil)-6-(3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enil)-7-hidroxicumarina (98)	124

LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro 25. RMN ^{13}C de 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxfenil)-6-(3"-hidroximetil-4"-hidroxibut-2"-enil)-7-hidroxicumarina (98)	125
Espectro 26. RMN ^1H de (+)-catequina (99)	126
Espectro 27. RMN ^1H de (+)-afzelequina (100)	127
Espectro 28. RMN ^1H de 3- <i>O</i> - β -D-galactopiranosido de la catequina (101)	128
Espectro 29. RMN ^{13}C 3- <i>O</i> - β -D-galactopiranosido de la catequina (101)	129
Espectro 30. RMN ^1H de (-)-epicatequina (102)	130
Espectro 31. RMN ^1H de (-)-eriodictiol (103)	131
Espectro 32. RMN ^1H de 3- <i>O</i> - β -D-galactopiranosido de la quercetina (104)	132

RESUMEN

Se analizó la actividad antioxidante *in vitro* de *Eysenhardtia platycarpa*, *E. subcoriacea*, *E. punctata*, *Senna occidentalis*, *S. obtusifolia*, *S. uniflora* y de *S. hirsuta*, las cuales fueron seleccionadas mediante criterios etnomédicos, quimiotaxonómicos y disponibilidad práctica. Las especies pertenecientes a *Eysenhardtia* desplegaron mayor actividad antioxidante contra el daño inducido por el dihidrocloruro de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (HAAP), comparada con las especies de *Senna*, la cual correlacionó con su capacidad reductora del radical 1,1-difenilpicrilhidrazilo (DFPH). De manera adicional, el extracto metanólico de las ramas de *E. platycarpa* desplegó actividad hipoglucemiante en ratas normales y diabetizadas con estreptozotocina (STZ), mientras que el extracto metanólico de hojas sólo mostró actividad en ratas normales. El estudio químico de las partes aéreas de *E. platycarpa* permitió el aislamiento de los nuevos productos naturales (1''*R*)-5,4',1''-trihidroxi-6,7-(3'',3''-dimetilcroman)-flavona (**80**) y (2*S*)-4'-*O*-metil-6-metil-8-prenilnaringenina (**85**), junto con metil-prenilflavanonas (**81-84**, **86**, **87**), triterpenos pentacíclicos (**88-92**), esteroides (**93-95**) y azúcares (**96**, **97**) conocidos. El ácido 3β-*O*-acetiloleanólico (**89**), constituyente mayoritario del extracto metanólico de las ramas disminuyó el nivel de glucosa en ratas diabéticas, a una dosis de 31 mg/kg, 7 h después de su administración. El estudio químico biodirigido de las partes aéreas de *E. subcoriacea* permitió el aislamiento del nuevo producto natural: 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxfenil)-6-(3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enil)-7-hidroxicumarina (Subcoriacina, **98**), y los compuestos conocidos catequina (**99**), (+)-afzelequina (**100**), (+)-3-*O*-β-D-galactopiranosido de (+)-catequina (**101**), (-)-epicatequina (**102**), eriodictiol (**103**) y 3-*O*-β-D-galactopiranosido de quercetina (**104**) como constituyentes bioactivos, así como los compuestos conocidos inactivos **83**, **84**, **88**, **89**, **91**, **92**, **97**. Así mismo, la 3β-*O*-acetil-11α-12α-epoxioleanan-28,13β-ólida (**90**), aislada de las ramas de *E. platycarpa*, desplegó actividad antioxidante *in vitro* e incrementó los niveles de GSH pancreático al igual que **98-100** y **102**. La administración por separado de **90** y **98** (100 mg/kg/5 días), a ratas normales y tratadas con estreptozotocina, disminuyó los niveles de glucosa e incrementó la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GSHPx), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Cat). La actividad antioxidante mostrada por las especies vegetales pertenecientes a *Eysenhardtia* y los compuestos **90** y **98** sugiere un efecto protector, el cual correlaciona con el uso popular de estas especies.

SUMMARY

The antioxidant activities of plant extracts from *Eysenhardtia platycarpa*, *E. punctata*, *E. subcoriacea*, *Senna occidentalis*, *S. obtusifolia*, *S. uniflora* and *S. hirsuta* (Fabaceae) species, used in Mexican traditional medicine for the treatment of diabetes complications, were analyzed in a rat pancreas homogenate model. The species were collected following the ethnomedical and taxonomic criteria as well as the practical accessibility of the plants. Methanolic extracts from *E. platycarpa*, *E. punctata*, and *E. subcoriacea* protected the pancreatic homogenate from 2,2-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH)-induced damage. The inhibitory effect was dose-dependent at concentrations of 10-1000 ppm and correlated with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenger capacity. In addition, the methanolic extracts from branches (BEP) and leaves (LEP) of *E. platycarpa* significantly decreased the blood glucose levels in normal and streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. The chemical analysis of bioactive extracts allowed the isolation of the new flavonoids (1''*R*)-5,4',1''-trihydroxy-6,7-(3'',3''-dimethylchroman)flavone (**80**) and (2*S*)-4'-*O*-methyl-6-methyl-8-prenylnaringenin (**85**) together with known triterpenes, methylprenylflavanones and sterols. Additionally, 3 β -*O*-acetyloleanolic acid (**89**), the major constituent of BEP, showed a significant decrease in the glucose level of diabetic rats. On the other hand, 3 β -*O*-acetyl-11 α ,12 α -epoxy-oleanan-28,13 β -olide (**90**), (+)-catechin (**99**), and (+)-catechin 3-*O*- β -D-galactopyranoside (**101**), isolated from the branches of *E. platycarpa*, displayed significant antioxidant activity. The bioguided chemical analysis of aerial parts from *E. subcoriacea*, allowed the isolation of the new compound 3-(2'-hydroxy-4',5'-methylendioxyphenyl)-6-(3''-hydroxymethyl-4''-hydroxybut-2''-enyl)-7-hydroxycoumarin (subcoriacin, **98**) together with the known flavonoids **99**, (+)-afzelechin (**100**), **101**, (-)-epicatechin (**102**), eriodictyol (**103**) and quercetin 3-*O*- β -D-galactopyranoside (**104**) as bioactive constituents. Additionally, the inactive constituents **83**, **84**, **88**, **89**, **91**, **92**, **97** were characterized. The bioactive compounds showed also moderate to strong radical scavenging properties against DPPH radical. In addition, compounds **90**, **98**, **99**, **100** and **102** improved the reduced glutathione levels in rat pancreatic homogenate. Compound **90** was obtained from oleanolic acid by relay synthesis *via* acetylation, bromo-lactonization, dehydrobromination, and oxidation, and its antioxidant effect was evaluated on streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Compounds **90** and **98** (100 mg/kg b. wt. ip. for 5 d) significantly decreased the blood glucose levels and the

thiobarbituric reactive substances (TBARS) in normal and STZ treated rats compared with the control groups. In this sense, **90** increased the activities of glutathione peroxidase (GSHPx) and catalase (Cat), while **98** additionally increased the activity of superoxide dismutase (SOD). The present study suggested that the bioactivities displayed by the organic extracts from *E. platycarpa* and *E. subcoriacea*, as well as those for compounds **90** and **98** correlated with an improvement of the antioxidant enzymatic system, and this could explain some of the medicinal uses of these species.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglicemia) y una alteración en el metabolismo de lípidos y proteínas. La hiperglicemia ha sido asociada con un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y con una disminución en la capacidad antioxidante endógena, conduciendo a un estrés oxidativo persistente, implicado con las principales complicaciones, el desarrollo y la progresión de la enfermedad [1-2]. Diversos estudios han demostrado que el daño celular causado por las ERO puede ser debido a la inducción de la peroxidación lipídica de las membranas, dañando tejidos como hígado, riñón, cerebro, entre otros [3]. De manera adicional, se ha demostrado que las células β -pancreáticas son particularmente susceptibles al estrés oxidativo [4]. Cuando la hiperglicemia se agudiza, las células β sufren un daño constante, secretan menos insulina culminando con la pérdida de la función pancreática. Asimismo, varios estudios han determinado que no sólo ocurre un incremento en la producción de los productos de peroxidación, sino que existe una disminución significativa en la masa pancreática [5].

El control de la enfermedad se ha enfocado principalmente al uso de hipoglicemiantes orales con la finalidad de disminuir los niveles de glucosa sanguínea [6]. Sin embargo, la prevención y el tratamiento de las complicaciones, ha requerido la combinación de dieta, ejercicio, suplementos alimenticios, hipoglicemiantes orales y, eventualmente, preparados tradicionales [7]. En México, se ha documentado el uso de aproximadamente 306 especies pertenecientes a 235 géneros y 93 familias con estos fines [8]. Algunas especies pertenecientes a los géneros *Eysenhardtia* y *Senna* son empleadas en la medicina tradicional. *Eysenhardtia platycarpa*, *E. subcoriacea* y *E. punctata*, conocidas como palo dulce y palo azul, son usadas indistintamente como diurético y para el tratamiento de complicaciones renales desarrolladas con la diabetes [8-9]. Estudios previos han destacado la actividad hipoglicemiante de *E. polystachya* [10], así como el aislamiento de isoflavanos citotóxicos [11] y chalconas con actividad insecticida [12] a partir de la corteza y el tronco de *E. polystachya*.

Senna occidentalis, *S. obtusifolia*, *S. uniflora* y *S. hirsuta*, conocidas comúnmente como frijolillo, son empleadas en el estado de Morelos como coadyuvante en el control de la

hiperglucemia [13]. De manera adicional, las semillas de estas especies son valoradas por su actividad purgante, sin embargo, se ha resaltado su efecto tóxico. Estudios previos han reportado la actividad hipoglicemiante de *S. occidentalis* y *S. obtusifolia* en ratones diabetizados con estreptozotocina (STZ) [14]. Asimismo, las flores y partes aéreas de *S. fistula* y *S. auriculata* mostraron actividad antihiperglicémica *in vivo* e incrementaron la actividad del sistema antioxidante endógeno en un modelo de diabetes experimental inducido con estreptozotocina [15-16].

Como parte del estudio de metabolitos secundarios con actividad antioxidante y antihiperglicémica, la presente tesis versa sobre: **a)** la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de *Eysenhardtia platycarpa*, *E. subcoriacea*, *E. punctata*, *Senna occidentalis*, *S. obtusifolia*, *S. uniflora* y de *S. hirsuta*, contra el daño inducido por el dihidrocloruro de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (HAAP) en homogenado pancreático, así como la evaluación de la actividad reductora del radical 1,1-difenilpicrilhidrazilo (DFPH) de dichos extractos; **b)** la evaluación de la actividad hipoglicemiante, en ratas normales y diabetizadas con estreptozotocina (STZ), de los extractos metanólicos de las ramas, hojas y corteza de *E. platycarpa*; **c)** el estudio químico y la determinación estructural de los constituyentes químicos presentes en dichos extractos; **d)** la bioevaluación de los constituyentes aislados de *E. platycarpa*; **e)** el estudio químico biodirigido de la corteza, ramas y hojas de *E. subcoriacea*; **f)** la síntesis por relevo de 3 β -*O*-acetil-11 α ,12 α -epoxi-oleanan-28,13 β -ólida, constituyente bioactivo de las ramas de *E. platycarpa*; y **g)** el efecto de 3 β -*O*-acetil-11 α ,12 α -epoxi-oleanan-28,13 β -ólida y 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxfenil)-6-(3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enil)-7-hidroxicumarina en un modelo de diabetes experimental.

2. ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES DE LA DIABETES

La diabetes es un síndrome metabólico caracterizado por niveles altos de glucosa (hiperglucemia), como resultado del defecto en la secreción y/o acción de la insulina. Los primeros síntomas incluyen poliuria, pérdida de peso, algunas veces polifagia y pérdida progresiva de la visión. Las complicaciones a largo plazo incluyen retinopatía con pérdida gradual de la visión; nefropatía que conduce a fallo renal, neuropatía periférica con riesgo de úlceras en los pies, neuropatía autónoma que causa disfunción gastrointestinal y genitourinaria [1]. Se ha establecido que la diabetes es el principal factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares [17].

La diabetes constituye un problema de salud pública mundial, tanto por los cuantiosos recursos requeridos para su atención, como por la disponibilidad limitada de opciones que permitan tratamientos eficientes. México no queda fuera de este contexto, ya que en los últimos 50 años ha aumentado más de 30 veces la incidencia de esta enfermedad [18], y se estima que para 2025 ocupará el séptimo lugar mundial con 12 millones de enfermos [19]. En México, las complicaciones relacionadas a la diabetes, representó la primer causa de muerte entre la población de edad adulta durante 2005 (tabla 1).

La diabetes mellitus se divide principalmente en dos grupos: tipo I o diabetes dependiente de insulina, y tipo II o diabetes no dependiente de insulina [20]. La diabetes tipo I, la cual engloba entre el 5 al 10 % de los pacientes diabéticos, es resultado de la destrucción celular autoinmune de las células β -pancreáticas, provocando pérdida total en la producción de insulina. La diabetes tipo II o diabetes no insulino-dependiente, es una enfermedad de etiología múltiple que manifiesta una amplia variedad de estados diabéticos presentes en edad adulta. En estos estados, las células β producen cada vez menos insulina, o bien, no es aprovechada adecuadamente por el organismo.

Tabla 1. Principales causas de defunción en México^a

Causas	Defunciones	%
Diabetes mellitus	3 901	8.5
Asfixia y trauma al nacimiento	3 533	7.7
Enfermedad cerebrovascular	2 455	5.3
Infecciones respiratorias	2 403	5.2
Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	2 322	5.0
Enfermedades isquémicas del corazón	1 340	2.9
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	1 133	2.5
VIH/SIDA	1 119	2.4
Enfermedades hipertensivas	1 084	2.3
Leucemia	661	1.4
Tuberculosis	540	1.2
Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón	323	0.7
Total		45.1

^aDatos de acuerdo a la encuesta nacional de salud del 2005 (IMSS)

2.1.1. Diabetes y estrés oxidativo (Figura 1)

La etiología de la enfermedad es diversa y no es totalmente conocida. Existe evidencia de que los factores genéticos influyen en la susceptibilidad a la diabetes tipo II. Sin embargo, diversos trabajos han sugerido que la sobreproducción de ERO durante la hiperglicemia juega un papel importante en el inicio, desarrollo y progresión de sus complicaciones [1-5, 17, 21-23]. Bajo condiciones fisiológicas, la glucosa se metaboliza mediante la glucólisis y posteriormente la fosforilación oxidativa (figura 1, paso 1) para producir ATP. Se ha expuesto que los niveles altos de glucosa pueden inhibir diversos sistemas enzimáticos implicados en la glucólisis y por lo tanto estancar este proceso, provocando que la glucosa, fructuosa-1,6-bis-P y gliceraldehído-3-P se acumulen y sigan otras vías metabólicas como: la activación del metabolismo del sorbitol (figura 1, paso 2) y de la hexosamina (figura 1, paso 3); la activación de cinasas proteicas (CP) (figura 1, paso 4); la enolización y formación de α -cetoaldehídos (figura 1, paso 5) y; la formación de

compuestos dicarbonílicos como metilglioxal que posee la habilidad de conjugarse con las proteínas (figura 1, paso 6) [23]. La activación de estas vías metabólicas conducen a la sobreproducción de diversas ERO, que incluyen radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) peroxilo ($\cdot\text{OOR}$), y no radicales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido hipocloroso (HOCl) (figura 1).

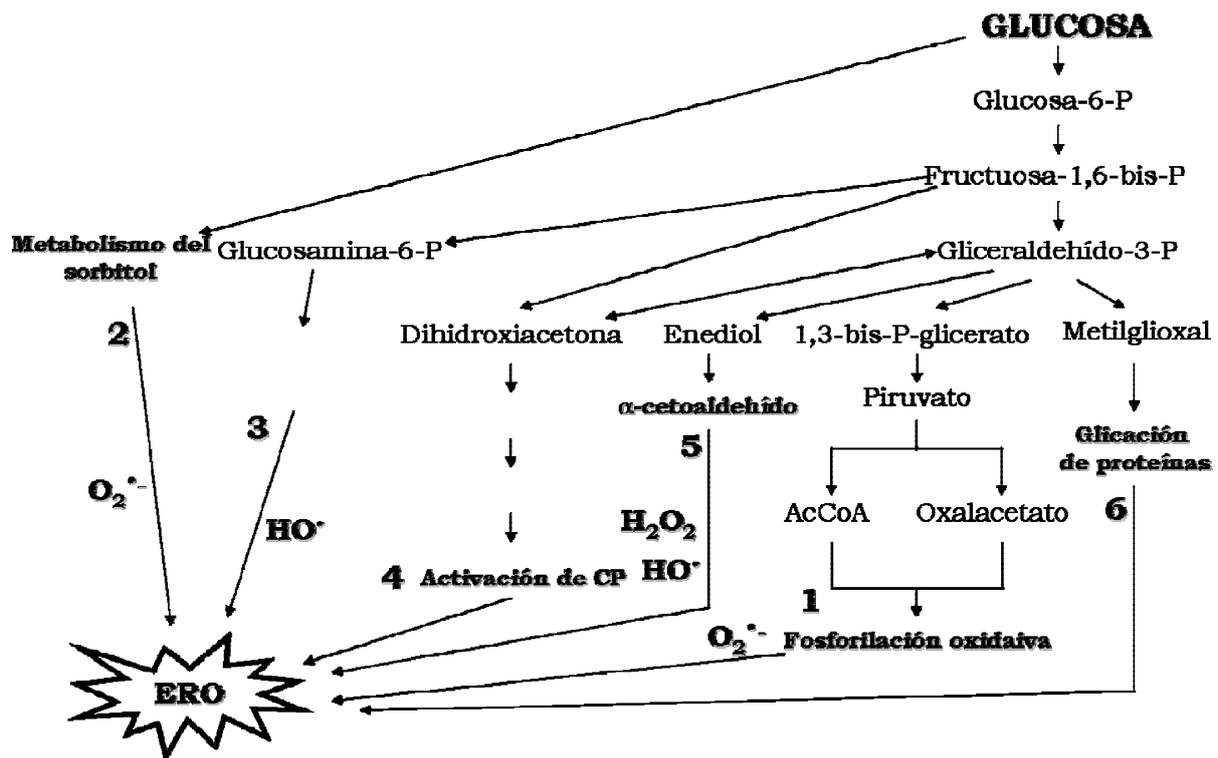


Figura 1. Metabolismo de la glucosa en la diabetes [21].

De manera adicional, la glucosa en presencia de Cu y Fe, puede oxidarse produciendo anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) [23]. La sobreproducción de ERO debilita al sistema antioxidante endógeno y conduce a un estado de estrés oxidativo persistente. Las ERO pueden estimular la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LBD) en células endoteliales conduciendo a la formación de placa aterosclerótica [24]. El anión $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 estimulan la señalización mediada por NF- κ B, p38-MAPK y STAT-JAK en los procesos inflamatorios. Además, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede reaccionar inmediatamente con $\cdot\text{NO}$ generando ONOO^- , reacción que tiene varias consecuencias: primero, ONOO^- altera la función de biomoléculas por la nitración de proteínas e inducir la peroxidación de lípidos; segundo, ONOO^- causa ruptura de ADN; y tercero,

disminuye la disponibilidad de NO deteriorando la relajación y el efecto antiproliferativo de NO [25].

Bajo condiciones normales, las ERO son eliminadas por mecanismos de defensa antioxidante enzimático y no enzimático. El $\text{O}_2^{\cdot -}$ es dismutado a H_2O_2 por la superóxido dismutasa dependiente de magnesio (SOD-Mg) en la mitocondria y la SOD dependiente de cobre (SOD-Cu) en el citosol. El H_2O_2 es reducido a H_2O y O_2 por la glutatión peroxidasa dependiente de selenio (GSHPx-Se) y catalasa en mitocondria y lisosomas, respectivamente (figura 2) [26].

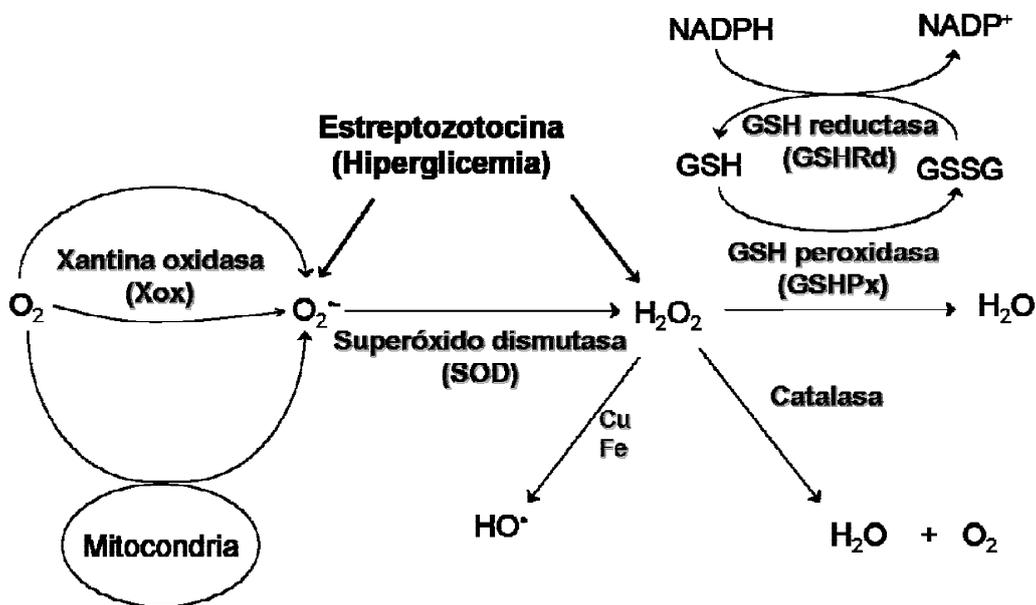


Figura 2. Sistema antioxidante endógeno.

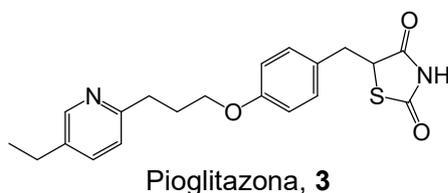
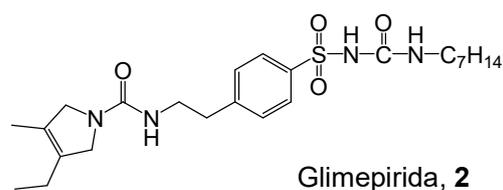
Los antioxidantes no enzimáticos incluyen vitamina A, C y E; glutatión reducido (GSH), ácido α -lipóico, carotenos, coenzima Q_{10} , ácido úrico, albúmina, y vitaminas B_1 , B_2 , B_6 y B_{12} . Sin embargo, bajo un estrés oxidativo persistente, las ERO conducen a una disminución de la capacidad total antioxidante, alterando la estructura y fluidez de las membranas biológicas, lo cual finalmente altera su función. En este sentido, se ha sugerido que las células pancreáticas son susceptibles al estrés oxidativo [27], debido a la baja expresión de las enzimas antioxidantes y los bajos niveles de antioxidantes no enzimáticos, lo cual contribuye al deterioro progresivo de la función celular de los pacientes diabéticos.

Estudios efectuados en diversos modelos de diabetes han demostrado cambios en indicadores bioquímicos que evidencian una situación de estrés oxidativo: a) disminución de las concentraciones plasmáticas de vitaminas A y E; b) incremento en la susceptibilidad a la peroxidación de LBD; c) incremento de la concentración sanguínea de los marcadores de la peroxidación de lípidos (malondialdehído, 5-hidroxinonal, entre otros); d) disminución de la capacidad antioxidante total del plasma y daño en el material genético [5, 28].

2.2. TRATAMIENTO DE LA DIABETES

2.2.1. Hipoglucemiantes orales

El tratamiento común de la enfermedad incluye dieta, ejercicio, agentes hipoglucemiantes orales y/o insulina, dependiendo del tipo de diabetes y con el objetivo de disminuir los niveles de glucosa sanguínea [6]. Los agentes hipoglucemiantes reducen los niveles de glucosa por 4 mecanismos generales: **1)** las biguanidinas, incrementan la formación de glucógeno en el hígado; **2)** las tiazolidendionas, activan el factor PPAR γ el cual posee importantes funciones en la adipogénesis y la homeostasis de la glucosa en tejido adiposo y músculo esquelético, respectivamente; **3)** los inhibidores de la α -glucosidasa, enzima responsable de la hidrólisis de polisacáridos a monosacáridos, los cuales retardan la absorción intestinal de carbohidratos; y **4)** las sulfonilureas y meglitinidas, que inducen la secreción de insulina por las células β .

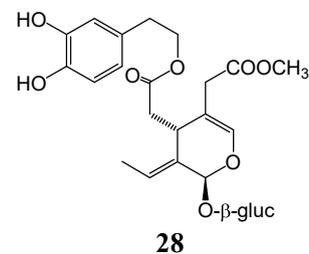
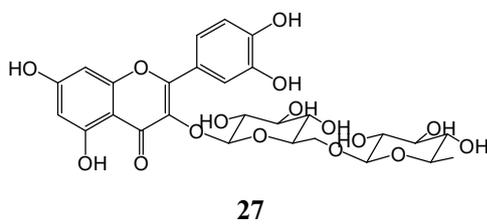
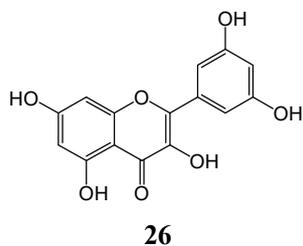
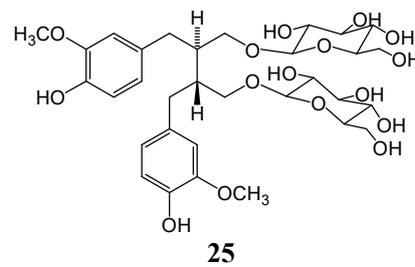
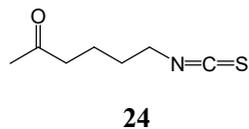
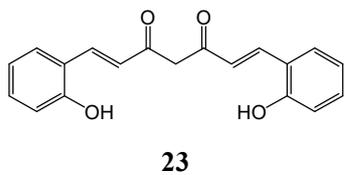
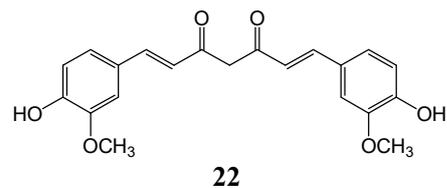
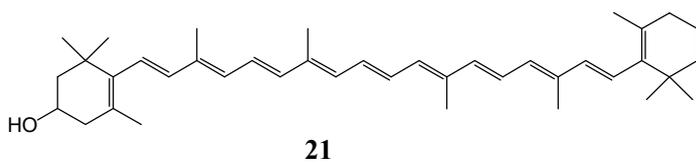
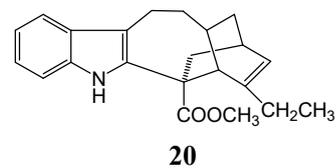
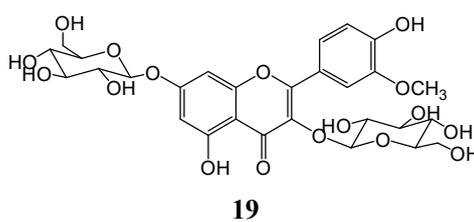
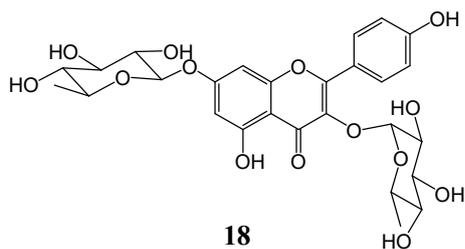
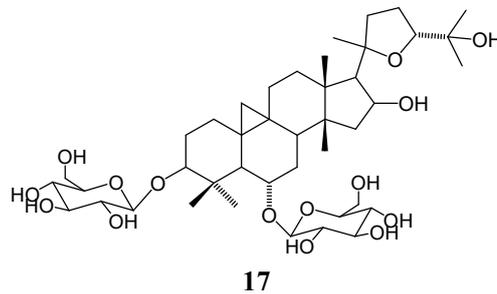
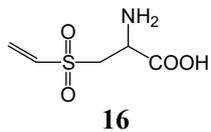
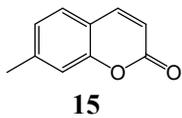


Algunos trabajos han demostrado un incremento de la actividad del sistema antioxidante endógeno por la gliclazida (**1**) y la glimepirida (**2**), protegiendo las células β de la apoptosis

inducida por los estados de hiperglicemia [29-30]. Además, el tratamiento con pioglitazona (3) durante 8 semanas a ratas diabetizadas con aloxana disminuyó la peroxidación de lípidos en hígado e incrementó la actividad de la Zn-SOD-Cu [31]. Sin embargo, Tsubouchi *et al* [32] han destacado la actividad pro-oxidante *in vitro* de la glibenclamida. Aunque los hipoglicemiantes orales ofrecen un amplio rango de acciones metabólicas para reducir la hiperglicemia, su efectividad es limitada por tres razones principales: 1) no suprimen la resistencia a la insulina y no favorecen la restauración de la función celular; 2) no revierten el deterioro en el organismo ocasionado por la hiperglicemia e hiperlipidemia; y 3) finalmente lo más importante, no previenen la pérdida gradual de la masa y función de las células β .

2.2.2. Medicina tradicional

Además de los tratamientos arriba mencionados, para el control de las complicaciones de la diabetes se han utilizado los preparados tradicionales [7]. En este sentido, la OMS estima que el 80 % de la población mundial ha utilizado la medicina tradicional en el control de la enfermedad y se ha informado el uso de más de 1130 especies vegetales empleadas en el mundo. En México, se ha documentado que 306 especies pertenecientes a 235 géneros y 93 familias son usadas empíricamente para el control de la diabetes. Las familias Asteraceae (47) y Fabaceae (30) son las más utilizadas, seguido por Cactaceae (16), Solanaceae, Euforbiaceae (10) y Lamiaceae (9) [8, 9, 13]. Diversos estudios han destacado, en algunas de estas especies, la presencia de una amplia variedad de sustancias con actividad antioxidante, que incluyen flavonoides, cumarinas, diterpenos, lignanos, monoterpenos, fenilpropanoides, taninos y triterpenos [34]. En este sentido, se ha sugerido que la actividad antioxidante de esta clase de compuestos puede estar relacionada con la capacidad de reducir radicales libres, quelatar metales y/o favorecer la capacidad del sistema antioxidante endógeno [34-35]. Asimismo, varios trabajos efectuados en diversas partes del mundo, han evaluado la actividad antioxidante de algunas de estas especies con diversos modelos experimentales de diabetes (Tabla 2), sugiriendo que la actividad antihiperglicémica de los extractos orgánicos de algunas especies es el resultado del fortalecimiento del sistema antioxidante endógeno. El estudio químico de las especies bioactivas, permitió el aislamiento de algunos metabolitos secundarios con estructuras diversas que muestran actividad antioxidante relacionada principalmente a favorecer la capacidad del sistema antioxidante endógeno, con lo cual normalizan los niveles de glucosa sanguínea.



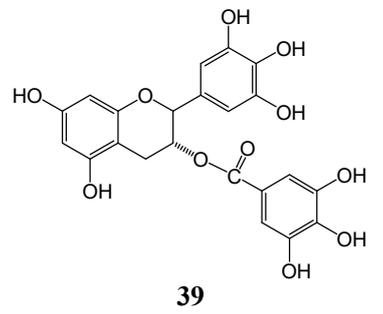
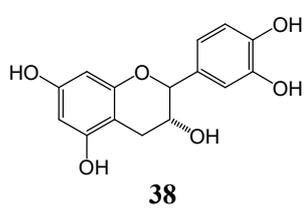
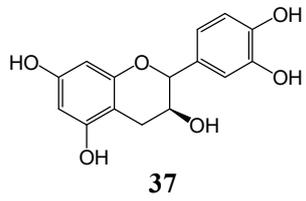
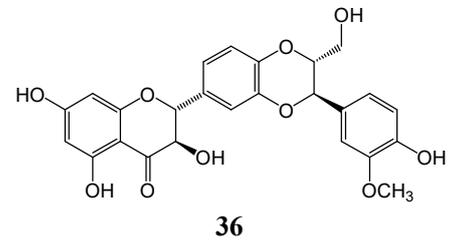
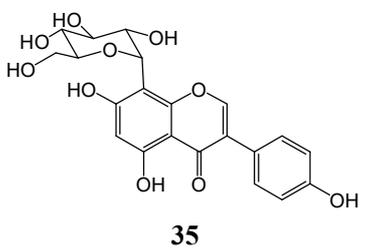
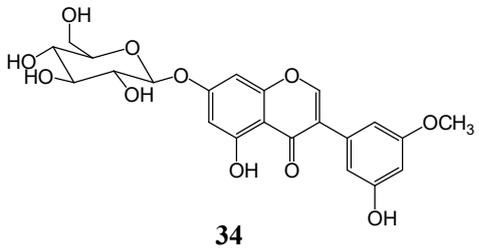
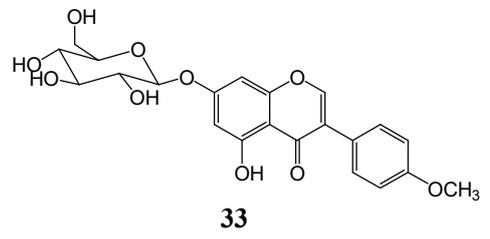
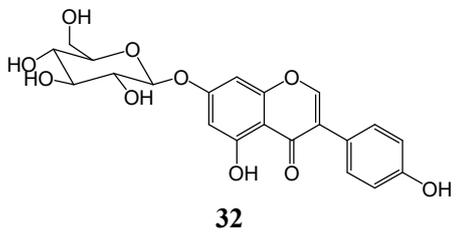
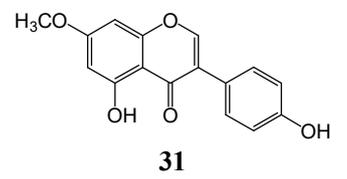
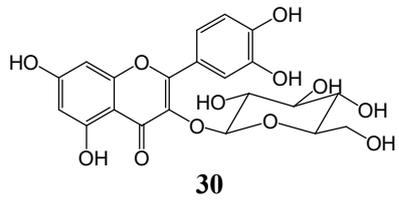
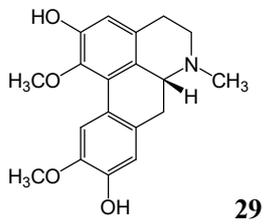


Tabla 2. Especies vegetales con actividad antioxidante y antihiperglicémica.

Especie (parte utilizada)	Familia	(Modelo) Actividad	Constituyentes bioactivos	Ref
<i>Aegle marmelos</i> (L.) Correa (Parte aérea)	Rutaceae	(Aloxana); ↓ Glucosa, SRATB, dienos, ROOH; ↑ GSH, SOD, GPx, Cat en sangre e hígado; Umbeliferona: (30 mg/kg/45 días) ↓ Glucosa, SRATB, ROOH, dienos en plasma; ↑ GSH, SOD, GSHPx, Cat. Vit E en plasma e hígado.	Umbeliferona (4)	[38-39]
<i>Allium sativum</i> Linn	Liliaceae	(STZ); ↓ Glucosa, SRATB, ROOH, colesterol, lípidos, NO; ↑ GSH, SOD, GPx en hígado y riñón.	Sulfóxido de S-ali cisteina (4)	[40-41]
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. fil. (hojas y pulpa)	Liliaceae	(STZ ratas neonatales); ↓ SRATB, alanita-transaminasa, fosfatasa-alcaldina, ↑ insulina, GSH en hígado		[42]
<i>Annona squamosa</i> L. (hojas)	Annonaceae	(STZ); ↓ Glucosa, lípidos, SRATB; ↑ insulina, GSH, SOD, GPx, Cat y GRd		[43]
<i>Anoectochilus formosanus</i> Hayata	Orchidaceae	(STZ); ↓ Glucosa, fructosamina, triglicéridos, colesterol; ↑ GSH y Cat en riñón		[44]
<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge (raíz)	Fabaceae	(STZ); ↓ TGF-β1, mRNA, colágeno IV, laminina, ↑ GSH y SOD, GPx, Ca. GRd <i>in vitro</i> ; ↓ permeabilidad renal <i>in vivo</i>	<i>Astragalus</i> Saponina I (6)	[45]
<i>Aspalanthus linearis</i> (Hojas)	Fabaceae	(STZ); ↓ AGEs, SRATB en plasma, hígado y retina		[46]
<i>Averrhoa bilimbi</i> Linn (hojas)	Oxalidaceae	(STZ); ↓ Glucosa, glucosa-6-fosfatasa; ↑ insulina		[47]
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss (semillas)	Meliaceae	(STZ); ↓ Glucosa, SRATB en plasma; ↑ Cat y SOD en hígado y corazón. (2g/kg)		[48]
<i>Bauhinia divaricata</i> (Hojas)	Fabaceae	(STZ y Aloxana); ↓ Glucosa y glucógeno hepático; ↑ GSH y SOD, GPx, Cat, GRd en plasma	Kaemferitina (7)	[49-50]
<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern.	Brassicaceae	(STZ); ↓ Glucosa, 5-HMF, Alg, SRATB en suero, hígado y riñón.	3,7-di-O-β-D-glucopiranosido de isoramnetina (8)	[51]
<i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br. (látex)	Asclepiadaceae	(Aloxana); ↓ Glucosa y glucógeno hepático; ↑ GSH y SOD, GPx, Cat., GRd hígado		[52]

Tabla 2. Continuación

Especie (parte utilizada)	Familia	Actividad	Principios activos	Ref
<i>Capparis decidua</i> (Fruto)	Caparaceae	(Aloxana); ↓ SRATB, glucosa, glucosa-6-fosfatasa hepática; ↑ SOD, GPx, Cat., GRd y GST en hígado, riñón y corazón		[53]
<i>Cassia auriculata</i> L. (flores)	Fabaceae	(STZ); ↓ Glucosa, SRATB, ROOH; ↑ GSH, SOD, GPx, Cat. en cerebro		[15]
<i>Catharanthus roseus</i> (hojas y ramas)	Apocinaceae	(STZ); ↓ glucosa y SRATB; ↑ glucógeno sintetasa, glucosa 6-fosfato-dehidrogenasa, succinato dehidrogenasa y malato dehidrogenasa en hígado	Catarantina (9)	[54]
<i>Citrus unshiu</i> (Mak.) Marcov. (fruto)	Rutaceae	(STZ); ↑ GSH y SOD, GPx, Cat. GRd en hígado	Criptoxantina (10)	[55]
<i>Coccinia indica</i> W. and A. (hojas)	Curcubitaceae	(STZ); ↓ Glucosa, SRATB, ROOH; ↑ GSH y SOD, GPx, Cat. GRd en hígado y riñón		[56]
<i>Curcuma longa</i> . Linn. (rizomas)	Zingiberaceae	(Aloxana ratones albinos); ↓ Glucosa, Alg, SRATB, SDH, Alg en plasma; ↑ GPx, Cat. SOD, vit. C y vit. E en páncreas.	Curcumina (11), bis- <i>o</i> -hidroxí-cinamoilmetano (12).	[57-58]
<i>Emblica officinalis</i> Gaertn.	Euphorbiaceae	(STZ); ↓ Glucosa, AGEs, 5-hidroxiacetilfurfural, SRATB, ↑ adiponectina	Polifenoles	[59]
<i>Eugenia jambolana</i> Lam.	Mirtaceae	(STZ); ↓ Glucosa, Alg, SRATB, ROOH; ↑ insulina, GSH y SOD, GPx, Cat. GRd en hígado y riñón		[60]
<i>Eruca sativa</i> Mill. (semillas)	Brassicaceae	(Aloxana); ↓ Glucosa, SRATB; ↑ GSH y SOD, en hígado	Sulforafano (13)	[61]
<i>Gongronema latifolium</i> (hojas)	Asclepiadaceae	(STZ); ↓ Glucosa, SRATB, triglicéridos, colesterol en plasma, y glucocinasa en hígado; ↑ SOD, GPx, en plasma, y glucógeno, hexocinasa, fructuocinasa y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa; en hígado		[62-63]
<i>Gymnema montanum</i> Hook (hojas)	Asclepiadaceae	(Aloxana); ↓ Glucosa, SRATB, ROOH; ↑ GSH, vitaminas C y E en plasma		[64]
<i>Juglans regia</i> L.	Juglandaceae	(STZ ratón); ↓ SRATB, ROOH; ↑ GSH y SOD, GSHPx, Cat. GRd en plasma		[65]

Tabla 2. Continuación

Especie/Nombre comun (parte utilizada)	Familia	Actividad	Principios activos	Ref.
<i>Linum usitatissimum</i> L./ Linaza (semillas)	Linaceae	STZ Previno la diabetes inducida por STZ; ↑ SOD, en plasma	Diglicósido del secoisolariciresinol (14)	[66]
<i>Laminaria japonica</i>		(STZ); ↓ Glucosa, Xoxd, SRATB; ↑ GSH en hígado.		[67]
<i>Lycium barbarum</i> L. (fruto)	Solanaceae	(Aloxana, conejos); ↓ Glucosa, colesterol, triglicéridos TEAC, ORAC	Criptoxantina (10)	[68]
<i>Momordica charantia</i> L. calabaza amarga, karela (semillas)	Curcubitaceae	(STZ) ↓ Glucosa, SRATB, ROOH vit. E en plasma; ↑ GSH, vit. A, insulina, SOD, GPx, Cat. en páncreas	Curcubitacinas	[69]
<i>Morus tinctoria</i> L.	Moraceae	(Aloxana) Morina: ↓ Glucosa, MDA; ↑ SOD, GPx, en páncreas; Rutina: ↓ Glucosa, SRATB, ROOH, Hbg en plasma; ↑ insulina, péptido C, proteínas, vit C y vit E en plasma	Morina (15), Rutina (16)	[70]
<i>Morinda officinalis</i> How (raíz)	Rubiaceae	(STZ); ↓ Glucosa, SRATB, ROOH, colesterol y triglicéridos en plasma; ↑ GSHPx, SOD, Cat. y GSH en hígado y riñón		[71]
<i>Nigella sativa</i> L. (semillas)	Ranunculaceae	(STZ); ↓ SRATB, NO en suero; ↑ GSH y SOD, GSHPx, Cat. GRd y GST en páncreas		[72]
<i>Olea europaea</i> L. (hojas)	Oleaceae	(Aloxana, conejos); ↓ glucosa, SRATB; ↑ GSH y SOD, GSHPx, Cat. GRd y en plasma	Oleuropeína (17)	[73]
<i>Peumus boldus</i> Molina Boldo (hojas)	Monimiaceae	(STZ); ↓ Glucosa, O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂ , NO; ↑ GSH y SOD, GSHPx, Cat. GRd en riñón y páncreas	Boldina (18)	[74]
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. frijol (vaina)	Fabaceae	(STZ); ↓ Glucosa, SRATB, ROOH; ↑ GSH y SOD, GSHPx, Cat. GRd en hígado y riñón		[75]
<i>Pinus maritima</i> Mill. (corteza)	Pinaceae	(STZ); ↓ Glucosa, Cat.; ↑ GSH, GSHPx, GRd en hígado y riñón (10 mg/kg/14 días).	proantocianidinas	[76]

Tabla 2. Continuación.

Especie (parte utilizada)	Familia	Actividad	Principios activos	Ref
<i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Wk. & Lge.	Fabaceae	Efecto protector <i>in vitro</i> sobre células endoteliales	Isoquercitrina (19), prunetina (20), genistina (21) sisotrina (22), 7-O-β-glucósido de la 5,5'-dihidroxi-3'-metoxiisoflavona (23)	[77]
<i>Pueraria lobata</i> (Willd) Ohwi.	Fabaceae	(Islotes pancreáticos) Inhiben la apoptosis inducida por H ₂ O ₂ ; ↓ Xoxd; ↑ Cat, SOD.	Puerarina (24)	[78]
<i>Silybum marianum</i> (Parte aérea)	Asteraceae	(aloxana, 200 mg/kg/30 días) ↓ Glucosa, SRATB en plasma ↑ GSH, SOD, GSHPx, insulina, Pdx1 y ARNm de páncreas.	Silimarina (25)	[82]
<i>Silygium cumini</i> L. (semillas)	Mirtaceae	(aloxana, 5 g/kg/42 días) ↓ Glucosa, Alg, ↑ GSH, SOD, GPx, Cat. 1 en hígado riñón y corazón		[83]
<i>Theobroma cacao</i> (semillas)	Sterculiaceae	(STZ); ↓ SRATB, ROOH y formación de cataratas. ↑ GSH	(+)-Catequina (26), (-)-epicatequina (27), proantocianidinas	[85]
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	Fabaceae	(STZ, 50 mg/kg/28 días); ↓ Glucosa, Alg, SRATB; ↑ insulina, GSH hepático		[86]
<i>Trigonella foenum-graecum</i> (Semillas)	Fabaceae	(Aloxana); ↓ Glucosa; ↑ SOD, GSHPx, Cat. GRd en corazón, hígado, riñón y cerebro		[87]
<i>Viburnum dilatatum</i> Thunb.(fruto)	Caprifoliaceae	(STZ); ↓ Glucosa, SRATB, colesterol, ROOH,	Galato de (-)-epigallocatequina (28)	[88]
<i>Vitis vinifera</i> L.	Vitaceae	Reductor de radicales, ↓ SRATB, ↑ GSH pancreático	proantocianidinas	[89]

↑ aumento, ↓ disminución; STZ = Estreptozotocina, SRATB = Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, ROOH = hidroperóxidos lipídicos, MDA = malondialdehído, GSH = Glutación reducido, Alg = Albúmina glicosilada, AGEs = Productos finales de la glicosilación, Cat = Catalasa, SOD = Superóxido Dismutasa, GSHPx = Glutación peroxidasa, GRd = Glutación reductasa, GSt = Glutación-S-transferasa, Xoxd = Xantina oxidasa

2.3. DIABETES Y FAMILIA FABACEAE

La familia Fabaceae (sinónimo: Leguminosae) es una de las más numerosas entre las familias de plantas superiores, agrupando a distintos tipos de especies como árboles, arbustos, lianas y plantas herbáceas de extensa distribución mundial [36]. Muchas de ellas tienen una gran relevancia económica como alimento humano (chícharo, garbanzo, haba, lenteja, frijol, soya, entre otras), además de su importancia como calidad de alimento por su aporte de proteínas y carbohidratos a la dieta, también presentan importantes usos como forrajero, forestal, ornamental, industrial y medicinal (antiparasitaria, antiinflamatoria, antimicrobiana y antioxidante, entre otras). De manera adicional, algunas especies han demostrado poseer actividad tóxica importante. Por otro lado, en México se ha registrado la presencia de 26 tribus, las cuales comprenden 132 géneros y 1710 especies (Tabla 3) [37].

La recopilación y organización de la información sobre especies vegetales empleadas en la medicina tradicional mexicana para el control de la diabetes, permitió la integración de la tabla 4, la cual incluye 30 especies pertenecientes a 20 géneros [7-8].

Tomando en consideración el alto aprecio en el uso popular, la disponibilidad del material vegetal, las relaciones taxonómicas, la inambigüedad en la identificación botánica, así como la ausencia de investigaciones previas, fueron seleccionadas *Eysenhardtia platycarpa*, *E. punctata*, *E. subcoriacea*, *Senna occidentalis*, *S. obtusifolia*, *S. hirsuta* y *S. uniflora* para explorar las propiedades antioxidantes e hipoglucemiantes con modelos *in vitro* e *in vivo*.

Tabla 3. Especies de la familia Fabaceae empleadas en la medicina tradicional mexicana para tratamiento de la diabetes.

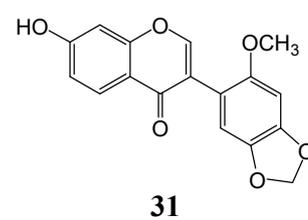
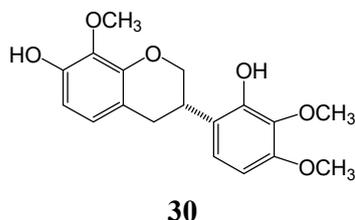
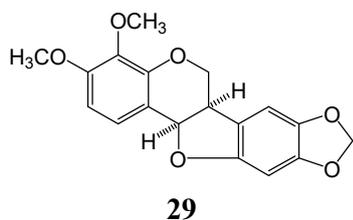
Nombre científico	Nombre Común	Parte utilizada
<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	Huizache	Hojas
<i>Acacia retinoides</i> Schltldl	Mimosa	Hojas
<i>Acharis hypogaea</i> L.	Cacahuatate	Semillas y aceite
<i>Bauhinia divaricata</i> L.	Pata de vaca	Hojas y flores
<i>Calliandra anomala</i> (Kunth) J.F. Macbr.	Cabello de ángel	Hojas
<i>Chamaecrista hispidula</i> (Vahl) H.S. Irwin & Barneby	Frijolillo	Hojas
<i>Crotalaria acapulcensis</i> Cav.	Retama	Ramas
<i>Eysenhardtia platycarpa</i> Pennell & Saff.	Palo dulce, palo azul, taray	Ramas y Hojas
<i>Eysenhardtia polystachya</i> Ort. Sarg.	Palo dulce, palo azul, taray, tlapalezpatli, urza, palo blanco.	Corteza y ramas
<i>Eysenhardtia punctata</i> Penn.	Palo dulce, palo azul, taray	Corteza
<i>Eysenhardtia subcoriacea</i> Pennell	Palo dulce, palo azul, taray	Corteza y ramas
<i>Haemahtoxylon brasiletto</i> H. Karst.	Palo Brasil	Corteza
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	Guaje	Semilla
<i>Lonchocarpus cruentus</i> Lundell	Guayacán	—
<i>Lysiloma acapulcensis</i> (Kunth.) Benth	Tepehuaje	Hojas y corteza
<i>Mimosa zygophylla</i> Benth.	Gatuño	Hojas
<i>Parkinsonia aculeata</i> L.	Bagote	Hojas
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Frijol	Cáscara del fruto
<i>Pithecellobium dulce</i> (Roxb.) Benth	Guamúchil	Corteza y fruto
<i>Prosopis juliflora</i> (Swartz) DC.	Mezquite	Fruto
<i>Senna fistula</i> L.	Caña fístula	Fruto
<i>Senna hirsuta</i> (L.) Irwin et Barneby	Frijolillo	Hojas y raíz
<i>Senna occidentalis</i> (L.) Linn.	Frijolillo	Hojas y raíz
<i>Senna obtusifolia</i> (L.) Irwin et Barneby	Frijolillo	Hojas
<i>Sena uniflora</i> (Hill.) HS. Irwin et Barneby	Frijolillo	Hojas y raíz

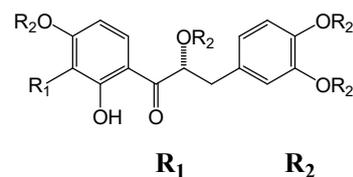
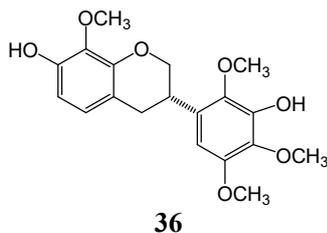
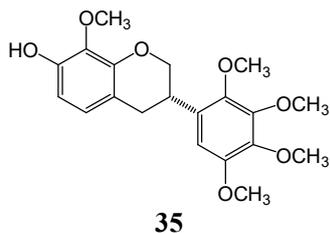
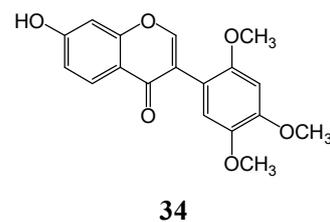
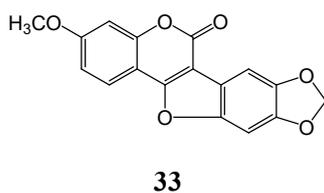
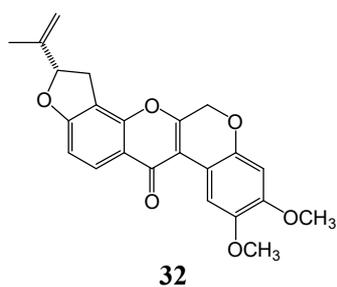
A continuación se describen sucintamente los estudios químicos y biológicos efectuados en diversas partes del mundo de las especies selectas.

2.4. GENERALIDADES DEL GÉNERO *EYSENHARDTIA*

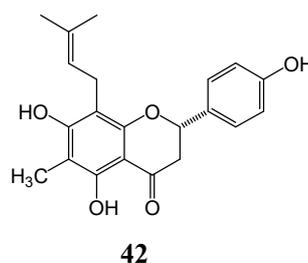
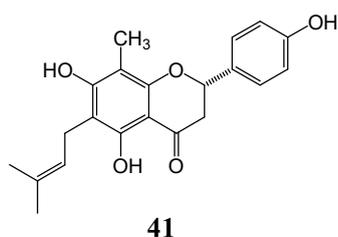
El género *Eysenhardtia* (Fabaceae) engloba a aproximadamente 14 especies [90], distribuidas a través de México y el sureste de Texas. Algunas especies dentro de este género han sido usadas indistintamente para el tratamiento de diversos padecimientos relacionados a las vías urinarias [8] y como diurético. En la actualidad no existen estudios químicos y biológicos de *E. platycarpa*, *E. subcoriacea* y *E. punctata*. Sin embargo, *E. polystachya* es la especie mayormente distribuida y el extracto acuoso del tronco ha mostrado actividad hipoglucemiante [9].

El análisis químico de la corteza y tronco de *E. polystachya* permitió el aislamiento de agustlegorretósida [91], 3,4-dimetoxi-8,9-metilenedioxipterocarpano (**29**), (3*S*)-(-)-isoduartina (**30**), cuneatina (**31**), deshidrorotenona (**32**), 9-metoxi-2,3-metilenedioxicumestano (**33**), 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona (**34**), (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavano (**35**), (3*S*)-3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxiisoflavano (**36**) [11], (α R)- α ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidro-chalcona (**37**), (α R)-3'-C- β -D-xilopiranosil- α ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidrochalcona (**38**), (α R)-3'-O- β -D-xilopiranosil- α ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidrochalcona (**39**), (α R)-3'-C- β -D-glucopiranosil- α ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidrochalcona (**40**) [12]. De las partes aéreas de *E. texana* se aislaron dos flavanonas: la 4',5,7-trihidroxi-8-metil-6-prenilflavanona (**41**) y 4',5,7-trihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**42**) con actividad antibacteriana y antifúngica [92].





37	H	H
38	C-β-xilopiranosil	H
39	O-β-xilopiranosil	H
40	O-β-glucopiranosil	H



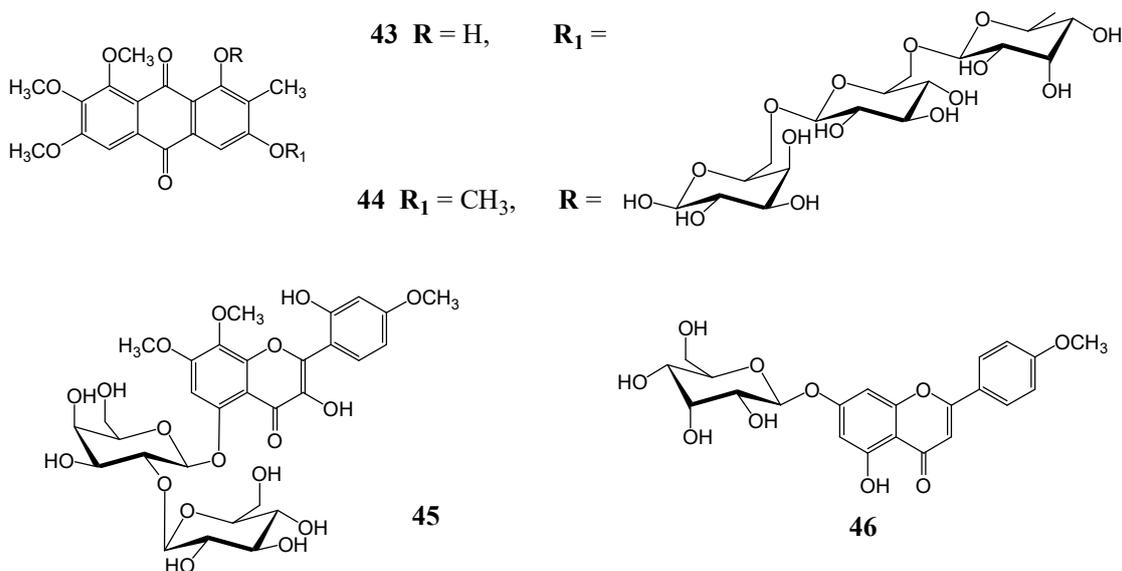
2.5. GENERALIDADES DEL GÉNERO *SENNA*

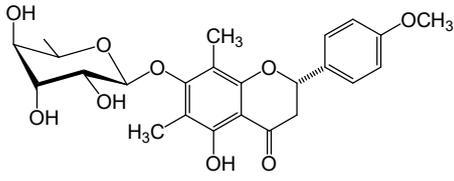
Senna (Sinónimo: *Cassia*) es un género amplio y diverso que comprende aproximadamente 500 especies de árboles, arbustos y hierbas, de las cuales el 80 % se encuentra en el continente americano [93]. Varias especies han sido utilizadas en la medicina tradicional desde los siglos IX y X, principalmente como purgante y laxante [94]. Además son reconocidas sus propiedades antioxidantes [16], antibacterianas [95], antiinflamatorias [96], hepatoprotectoras [97], hipoglucemiantes [14], entre otras. El género *Senna* se caracteriza por biosintetizar una amplia variedad de metabolitos fenólicos, especialmente antraquinonas, flavonoides y estilbenos, confiriendo una amplia gama de actividades biológicas; *S. occidentalis* y *S. obtusifolia* han sido ampliamente estudiadas en diversas partes del mundo. Sin embargo, no existe información de estudios dirigidos hacia las especies distribuidas en México. A continuación se describen sucintamente los estudios químicos y farmacológicos en la literatura de estas especies.

2.5.1. *Senna occidentalis* Linn.

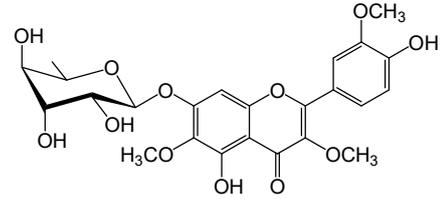
Hierba de hasta 1.5 m de altura, hojas en forma de foliolos por pares y los terminales mas grandes. Frutos en forma de legumbres delgados y alargados de hasta 15 cm de largo. *S. occidentalis* está ampliamente distribuida en los estados de Morelos, Guerrero y Michoacán, donde es conocida como frijolillo. Las raíces son utilizadas como diuréticas y antipiréticas. Las semillas son utilizadas en el tratamiento del asma y la infusión de las flores para la bronquitis. Las partes aéreas son empleadas para el tratamiento de desórdenes urinarios e hipoglucemiantes [14, 98-99]. Sin embargo, algunos trabajos han destacado la toxicidad de las semillas [100].

El estudio químico de esta especie ha permitido el aislamiento de las antraquinonas 1-hidroxi-3-*O*-(α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -galactopiranosil)-6,7,8-trimetoxi-2-metil-antraquinona (**43**), 1-*O*-(α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -galactopiranosil)-3,6,7,8-tetrametoxi-2-metil-antraquinona (**44**) [101] y los flavonoides 5-*O*-(β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -galactopiranosil)-3,2'-dihidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavona (**45**), 7-*O*- β -D-alopiranosido de la apigenina (**46**) [102], 7-*O*-ramnopiranosido de 5-hidroxi-4'-metoxi-6,8-dimetil-flavanona (**47**), 7-*O*-ramnopiranosido de 5,4'-dihidroxi-3,6,3'-trimetoxiflavona (**48**) [103] cassiaoccidentolinas A (**49**), B (**50**) y C (**51**) [104]. De las raíces se ha aislado crisofanol (**52**), emodina (**53**), fisciona (**54**), pinselina (**55**), 1,7-dihidroxi-3-metilxantona (**56**), islandicina (**57**), helmintosporina (**58**), xantorina (**59**) [105] singueanol I (**60**), occidentalol -I (**61**) y occidentalol-II (**62**) [106].

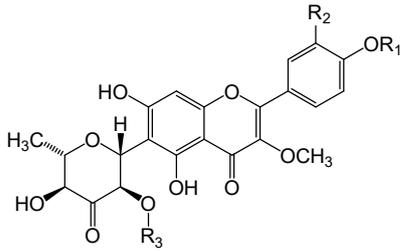




47



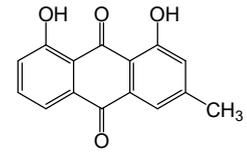
48



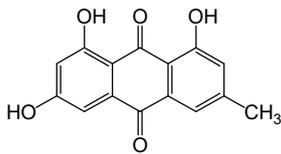
49 $R_1 = R_2, R_3 = \text{Rha}$

50 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{Rha}$

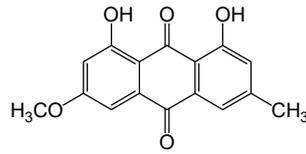
51 $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{Rha}$



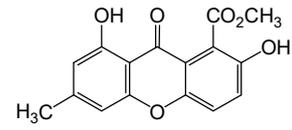
52



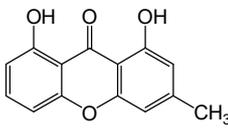
53



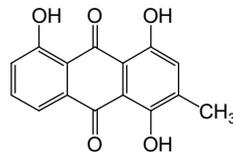
54



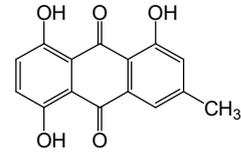
55



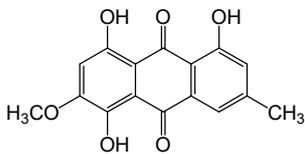
56



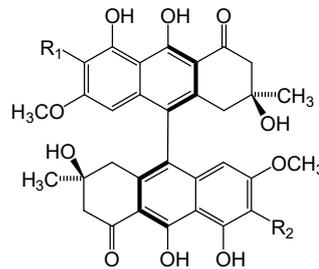
57



58



59



60 $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$

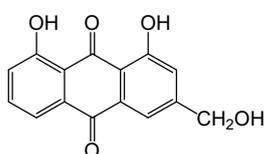
61 $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$

62 $R_1 = R_2 = \text{H}$

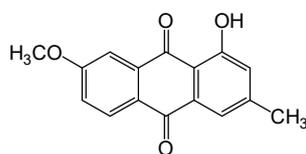
2.5.2. *Senna obtusifolia* Irwin et Barneby.

Hierba de hasta 1.5 m de altura, hojas alargadas en forma de foliolos por pares y los terminales más grandes. Frutos en forma de legumbres delgados y alargados de hasta 30 cm de largo. Es conocida comúnmente como frijolillo en los estados de Morelos y Guerrero donde la infusión derivada de las raíces es utilizada como analgésica, laxante y antimicrobiana, y la infusión de las partes aéreas posee actividad hipoglucemiante.

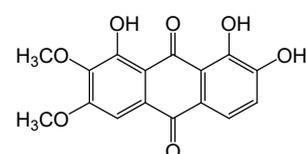
De esta especie se ha logrado aislar principalmente antraquinonas como crisofanol (**52**), emodina (**53**), fisciona (**54**) aloe-emodina (**63**), 1-hidroxi-7-metoxi-3-metil-antraquinona (**64**), 1,2,8-trihidroxi-6,7-dimetoxiantraquinona (**65**), 1-*O*-metilcrisofanol (**66**), 8-*O*-metilcrisofanol (**67**) [107], obtusifolina (**68**) [108], rubrofusarina (**69**), obtusina (**70**), crisobtusina (**71**), aurantiobtusina (**72**) [109], torasacrisona (**73**) isotoralactona (**74**), casialactona (**75**), toralactona (**76**) [110] y tres glicósidos de naftopironas casiasida C (**77**), B (**78**) y el 6-*O*-gentiobiosido de rubrofirasina (**79**) [111]. Emodina, crisofanol e islandicina han demostrado propiedades diarreas por lo que son utilizadas como laxantes [112]. Sin embargo, también se ha informado su efecto mutagénico [113].



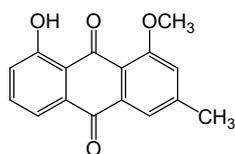
63



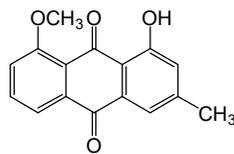
64



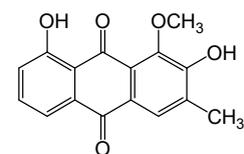
65



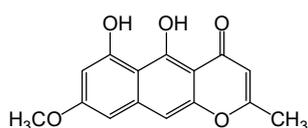
66



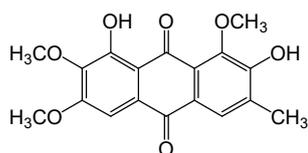
67



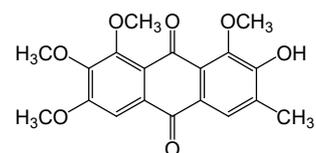
68



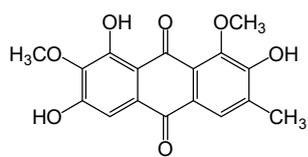
69



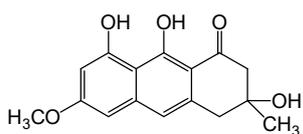
70



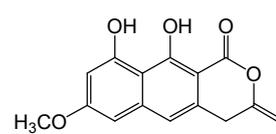
71



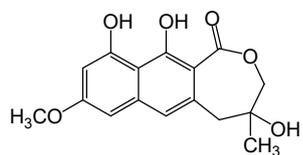
72



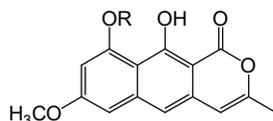
73



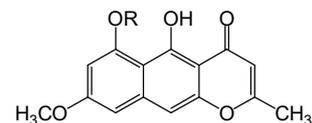
74



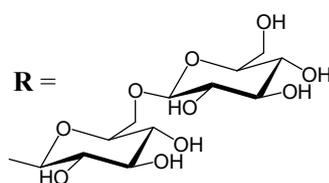
75



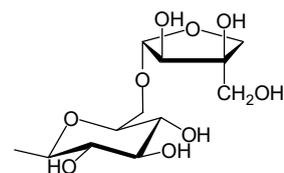
76 R = H



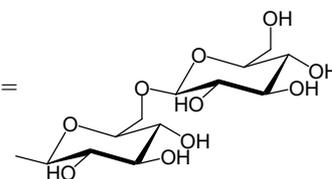
77 R =



78 R =



79 R =



3. HIPÓTESIS

Considerando: a) la diversidad de la flora empleada en la medicina tradicional en nuestro país, b) el uso reconocido y frecuente de ciertas plantas de la familia Fabaceae en preparaciones empleadas para el tratamiento de la diabetes, y c) conociendo que esta familia biosintetiza compuestos de notable diversidad estructural; entonces deben existir en las especies seleccionadas de *Eysenhardtia* y *Senna* metabolitos secundarios que muestren actividad antioxidante enfocada a su habilidad para reducir radicales ($\cdot\text{OH}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$) y/o fortalecer el sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) y no enzimático (glutatión y α -tocoferol), los cuales podrán ser aislados y caracterizados mediante el análisis biodirigido (con un modelo *in vitro* de homogenado de páncreas) y ponderados en un modelo de diabetes experimental. Lo anterior generará conocimiento de los diversos mecanismos de protección (al daño oxidativo) de metabolitos secundarios presentes en especies mexicanas empleadas en el control de esta enfermedad y sus complicaciones.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente proyecto es la generación de conocimiento acerca de los metabolitos secundarios presentes en especies vegetales del género *Eysenhardtia* y *Senna*, que muestren actividad antioxidante y antihiper glucémica.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compilar la información etnobotánica, química y biológica de las especies vegetales de la familia Fabaceae, empleadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diabetes.
- Recolectar las especies vegetales selectas y obtener los extractos correspondientes con disolventes de polaridad creciente.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos crudos obtenidos (contra el daño inducido por el HAAP en homogenado pancreático y frente al radical DFPH).
- Evaluar la actividad hipoglucemiante en ratas normales y diabetizadas con estreptozotocina de los extractos antioxidantes.
- Mediante un análisis químico, con base en la actividad antioxidante contra el daño inducido por el HAAP en homogenado pancreático, aislar, identificar, purificar y caracterizar los diferentes metabolitos secundarios que constituyen las fracciones biológicamente activas.
- Evaluar el efecto de la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos aislados frente al daño inducido por estreptozotocina en ratas normales.
- Mediante la integración de los resultados de los experimentos químicos y biológicos, evaluar el potencial de los metabolitos aislados como compuestos bioactivos alternativos en el tratamiento de la diabetes.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. METODOLOGIA GENERAL

El análisis de las especies selectas de la familia Fabaceae se llevó acabo de acuerdo a la metodología general ilustrada en el diagrama de la figura 3.

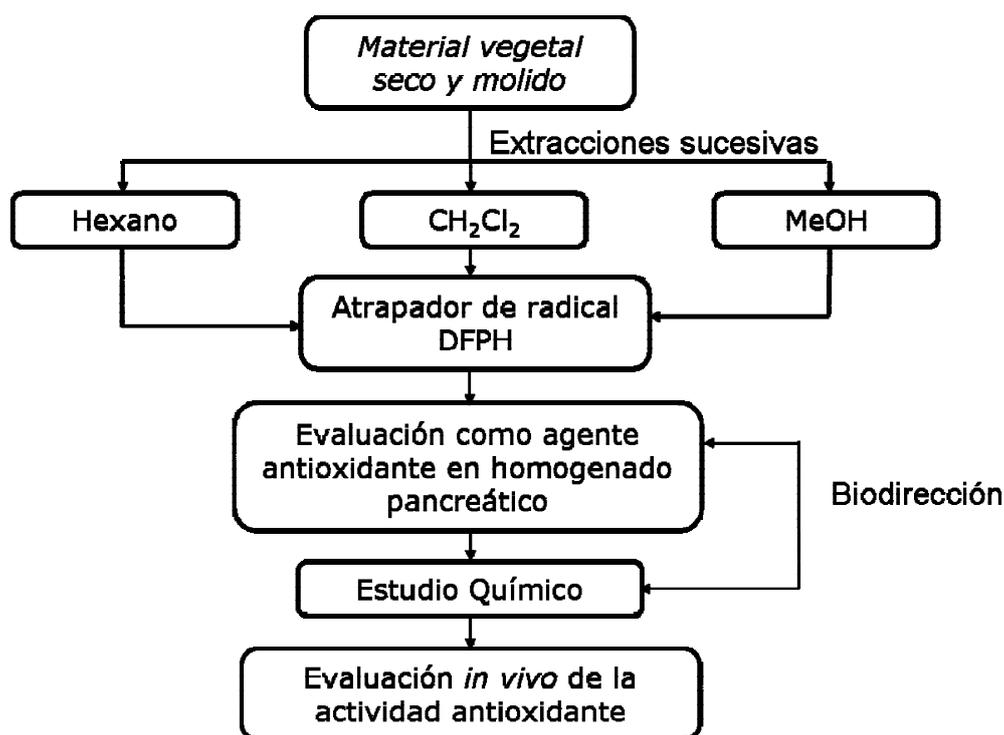


Figura 3. Metodología general.

Las plantas estudiadas — *E. platycarpa* (corteza, ramas y hojas), *E. subcoriacea* (corteza, ramas y hojas), *E. punctata* (corteza, ramas y hojas), *S. occidentalis* (parte aérea), *S. obtusifolia* (parte aérea y raíz), *S. hirsuta* (parte aérea) y *S. uniflora* (parte aérea y raíz) — se recolectaron con la asesoría del M. en C. Ramiro Cruz Durán, técnico académico del Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, quien clasificó las muestras. Las muestras del material vegetal fueron depositadas en el Herbario de la Facultad de Ciencias (HFC) y los registros se muestran en la tabla 8.

5.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y a la sombra. Este se extrajo sucesivamente con *n*-hexano, CH₂Cl₂ y MeOH a temperatura ambiente. La eliminación del disolvente permitió la obtención de los residuos correspondientes (tabla 4).

Tabla 4. Especies vegetales selectas para este estudio.

Especie vegetal	Localidad (No. registro) ^a	Parte usada (g)	Extracto ^b (g)		
			A	B	C
<i>E. platycarpa</i> Pennell & Safford ex Pennell	Tetipac, Guerrero (1325)	Hojas (300)	n.o.	n.o.	49.9
		Ramas (2500)	n.o.	n.o.	153.4
		Corteza (500)	n.o.	n.o.	38.5
<i>E. punctata</i> Pennell	Huatla, Morelos (88577)	Hojas (373)	32.5	25.6	51.3
		Ramas (1 522)	24.1	343.5	172.4
<i>E. subcoriacea</i> Pennell	Ixmiquilpan, Hidalgo (11322)	Hojas (1 300)	129.6	365.6	385.6
		Ramas (920)	115.6	386.5	486.5
		Corteza (550)	16.8	32.6	205.5
<i>S. hirsuta</i> (L.) Irwin et Barneby	Huatla, Morelos (88574)	Parte aérea (521)	7.3	6.9	69.7
<i>S. obtusifolia</i> (L.) Irwin et Barneby	Huatla, Morelos (88576)	Parte aérea (1 955)	110.5	43.1	423.4
		Raíz (68)	6.2	3.5	11.1
<i>S. occidentalis</i> (L.) Linn.	Huatla, Morelos (88578)	Parte aérea (921)	103.6	38.8	211.2
<i>S. uniflora</i> (Hill.) HS. Irwin et Barneby	Huatla, Morelos (88579)	Parte aérea (1 565)	18.1	113.4	335.7
		Raíz (355)	12.5	11.3	34.5

^a Número de registro correspondiente al herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM; ^bA: *n*-hexano, B: CH₂Cl₂ and C: MeOH, n.o.: no obtenido.

5.3 EVALUACIONES BIOLÓGICAS

5.3.1 Animales de estudio

Para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* se emplearon ratas macho Wistar (180-220 g de peso), las cuales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Previo a cada experimento las ratas fueron mantenidas con alimento estándar (Harlan) y agua *ad libitum*. Los experimentos realizados se llevaron a cabo siguiendo las normas de principios y cuidados de animales de laboratorio, detalladas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999

5.3.2. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos de *E. platycarpa* en ratas normales.

Ratas machos Wistar de 200-250 g de peso fueron divididas al azar en cinco grupos de cinco ratas cada uno:

Grupo I (Control): se administró 1 ml del vehículo (0.05% tween 80 en solución salina),

Grupo II: Una dosis de 30 mg de extracto/kg de peso vía intragástrica en 1 ml de vehículo;

Grupo III: Una dosis de 100 mg extracto/kg de peso vía intragástrica en 1 ml de vehículo;

Grupo IV; Una dosis de 300 mg extracto/kg de peso vía intragástrica en 1 ml de vehículo; y

Grupo V (Control positivo): Una dosis de glibenclamida (10 mg/kg) vía intragástrica en 1 ml de vehículo.

Las muestras de sangre fueron recolectadas de la vena caudal por medio de una pequeña incisión en el final de la cola en los siguientes tiempos: 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 h después de la administración de cada extracto. La concentración de glucosa se determinó en cada tiempo empleando el método de la glucosa oxidasa [114] usando un glucómetro comercial (One Touch Basic I, Johnson-Johnson). El porcentaje de variación de la glucemia en cada grupo fue calculado con respecto al nivel inicial (0 h) de acuerdo a la siguiente relación: % de variación = $(Gt-Gi)/Gi \times 100$ donde Gi es la glicemia inicial y Gt es la glicemia a cada tiempo de muestreo.

5.3.3. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos de *E. platycarpa* en ratas diabetizadas con estreptozotocina.

Ratas machos Wistar de 200-250 g de peso fueron administradas con una dosis de STZ 50 mg/kg (en solución amortiguadora de citratos pH 4.5). Las ratas que mostraron niveles de glicemia mayores de 250 mg/dl de sangre fueron divididas al azar en cinco grupos de cinco ratas cada uno:

- Grupo I (Control): se administró 1 ml del vehículo (0.05% tween 80 en solución salina),
- Grupo II: Una dosis de 30 mg de extracto/kg de peso vía intragástrica en 1 ml de vehículo;
- Grupo III: Una dosis de 100 mg extracto/kg de peso vía intragástrica en 1 ml de vehículo;
- Grupo IV; Una dosis de 300 mg extracto/kg de peso vía intragástrica en 1 ml de vehículo;
- Grupo V (Control positivo): Una dosis de glibenclamida (10 mg/kg) vía oral en 1 ml de vehículo.

-

Los niveles de glucemia se determinaron de acuerdo a lo anteriormente expuesto y se estableció el porcentaje de variación de la glucemia. El ácido 3 β -*O*-acetiloleanólico (**88**) se evaluó a dosis de 3.1, 10 y 31 mg/kg.

5.3.3.1. Análisis estadístico. Los datos fueron expresados como la media de $n = 5 \pm$ el error estándar. La evaluación estadística se efectuó usando el análisis de varianza por una vía (ANOVA), seguido por la prueba t de Dunnett. Las diferencias en cada experimento fueron consideradas a $p < 0.05$ para ser significativas.

5.3.4. Evaluación de la actividad antioxidante en homogenado pancreático. Determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB).

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y el páncreas de cada rata fue removido por disección, limpiado de restos de tejido graso, secado y pesado. Cada páncreas fue homogenizado en 9 volúmenes de amortiguador de fosfatos 7.8 mM (SAF, pH 7.4) a 4 °C usando un homogenizador Polytron, y centrifugado por 10 min a 3000 rpm. El contenido de proteínas en

el homogenizado se cuantificó espectrofotométricamente [115], para ello, 5 y 10 µl de homogenizado fueron aforados a 3 ml por duplicado. Se midió la absorbancia de cada disolución a 280 y 205 nm, y se determinó el contenido de proteínas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{mg proteína/ml} = A_{205}/[27+120(A_{280}/A_{205})]$$

El contenido de proteínas se estandarizó en 10 mg/ml de homogenado con SAF. En un tubo eppendorf se mezclaron 90 µl de SAF, 10 µl de cada muestra en sulfóxido de dimetilo (DMSO) y 200 µl de homogenado, y se incubaron a 37 °C por 30 min. Transcurrido el tiempo se agregaron 400 µl de una solución de HAAP (175 mM) y se incubó la mezcla a 37 °C durante 2 h. Después de la incubación se agregaron 50 µl de una solución de BHT (2% en EtOH). El grado de peroxidación se estableció con base al método descrito por Ohkawa et al [116]. A la mezcla de reacción se agregaron 700 µl de una mezcla (1:1) de ácido tiobarbitúrico (ATB, 1% en NaOH 0.05N) y ácido tricloroacético (ATC, 5 %), se mezcló en vortex y se colocó a ebullición durante 30 min. Después de este tiempo, los tubos se colocaron en baño de hielo por 5 min, se centrifugaron a 10 000 rpm por 5 min y se midió la absorbancia a 532 nm comparado con un blanco de reactivos. Se elaboró una curva estándar empleando 1,1,3,3-tetrametoxipropano 0.1 mM (TMP) y se determinó los nmoles de MDA por mg de proteína. La evaluación se efectuó empleando las siguientes concentraciones para cada caso: a) extractos = 31.6, 100 y 316.2 ppm, b) fracciones = 100 ppm, y c) compuestos puros = 1, 3.1, 10, 31 y 100 µM. De las muestras que presentaron una inhibición igual o mayor al 50%, en la concentración de 100 ppm, se determinó la concentración necesaria para inhibir el 50 % de la peroxidación (CE₅₀).

5.3.5. Cuantificación del glutatión reducido (GSH) en homogenado pancreático.

El GSH fue cuantificado usando el método de Sedlak y Lindsay [117]. 500 µl de homogenado de tejido y 10 µl de cada muestra (en DMSO) se mezclaron e incubaron a 37 °C por 30 min. Enseguida, se añadieron 400 µl de HAAP (135 mmol/l in PBS) y se incubó la mezcla a 37 °C por 2 h. Después de este tiempo, se añadieron 500 µl de 5% ATC (en EDTA 5 mmol/l) y se colocó a baño de hielo por 5 min. La mezcla se centrifugó a 10, 000 rpm durante 10 min. A 500 µl de sobrenadante, se agregaron 500 µl de Tris (pH 13, 40 mmol/l) y 100 µl de DTNB (0.01 mmol/l

en metanol). Le reacción se mezcló en vortex y se midió la absorbancia de cada muestra a 412 nm después de 5 min de añadido el DTNB. Se construyó una curva estándar empleando GSH y se determinaron los μg de GSH por mg de proteína. Al mismo tiempo, se evaluó un grupo sin tratamiento, es decir, sin adicionar el inductor, y otro con inductor. Los compuestos puros se evaluaron a 1, 3.1, 10, 31 y 100 μM .

5.3.6. Evaluación de la actividad reductora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DFPH).

Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo al protocolo previamente descrito [118]. En placas de Elisa se colocaron 50 μl de cada extracto disuelto en DMSO a varias concentraciones (1, 31, 100, 310 y 1000 ppm) o de los compuestos puros (1, 3.1, 10, 31 and 100 μM), y se incubaron a 37 °C por 30 min. Enseguida se midió la absorbancia a 515 nm en un lector de microplacas ELx 808 comparando con un blanco de reactivos. Cada medición se efectuó por triplicado en al menos tres ensayos independientes. El por ciento de reducción del radical DFPH se determinó de acuerdo a la siguiente relación:

$$\{(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{muestra}}) / Abs_{\text{control}}\} \times 100.$$

Para las muestras que redujeron al radical mínimo en un 50 % en la concentración de 100 ppm, se determinó la concentración necesaria para reducir al 50 % el radical DFPH, utilizando mínimo 5 concentraciones y en tres experimentos por triplicado.

5.3.7. Evaluación del efecto de la actividad antioxidante en ratas tratadas con estreptozotocina (STZ).

Ratas macho Wistar (180-220 g de peso) se dividieron en los siguientes grupos:

- Grupo control (n = 6): Grupo sin tratamiento.
- Grupo tratado (n = 6) Una administración de STZ (50 mg/kg, vía i.p.).
- Tratamiento (n = 6) Una administración de STZ (50 mg/kg, vía i.p.) y **90** o **98** (100 mg/kg, vía oral) diariamente durante 5 días.

Después de 5 días de tratamiento, cada animal se anestesió con pentobarbital sódico (63 mg/kg, vía i.p.). Por medio de punción cardíaca se colectaron 3 ml de sangre. El páncreas fue removido por disección y fue homogenizado en 10 volúmenes de SAF 50 mM (pH = 7.4) empleando un homogenizador politrón. El homogenizado fue filtrado y centrifugado a 4°C durante 5 min. El sobrenadante fue usado para efectuar los análisis bioquímicos.

5.3.7.1. Cuantificación de glucosa en sangre. La sangre se centrifugó a 3000 rpm por 15 min. 50 µl de suero se mezclaron con 3 ml de reactivo de *o*-toluidina por triplicado [119]. La mezcla se colocó a ebullición durante 10 min y enseguida en baño de hielo por 10 min. Se construyó una curva estándar de glucosa y se determinó la concentración que se expresó en mmol de glucosa por litro de sangre (mM).

5.3.7.2. Cuantificación de proteínas en el homogenado pancreático. La cuantificación se efectuó en 100 µl de homogenado, los cuales se aforaron a 1 ml con agua bidestilada. 20 µl de esta solución se colocaron en un tubo de ensayo y se agregaron 80 µl de agua bidestilada. Enseguida, se agregaron 2.4 ml de reactivo de Bradford (100 ml H₃PO₄ 85 %, 100 mg de azul de Coomassie G-250 y 50 ml de EtOH), se agitaron los tubos y se midió la absorbancia de cada solución a 595 nm [120]. Se construyó una curva estándar y se determinó el contenido de proteínas en mg/ml.

5.3.7.3. Cuantificación de los productos de peroxidación de lípidos (SRATB). A 200 µl de sobrenadante se agregaron 50 µl de BHT (2% en EtOH) y 700 µl de una mezcla (1:1) de ATB (1% en NaOH 0.05N) y ATC (5 %). La mezcla se sometió a ebullición durante 30 min y después se enfrió en baño de hielo por 5 min. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y se su absorbancia se leyó a 532 nm, comparando con un blanco de reactivos. El resultado se expresó como nmoles de MDA por mg de proteína.

5.3.7.4. Evaluación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). La actividad de SOD fue medida en 500 µl de sobrenadante (aproximadamente 5 mg proteína) empleando el método de Sun et al. [121] y descrito por Kakkar et al. [122], detallado en el esquema de la figura 4.

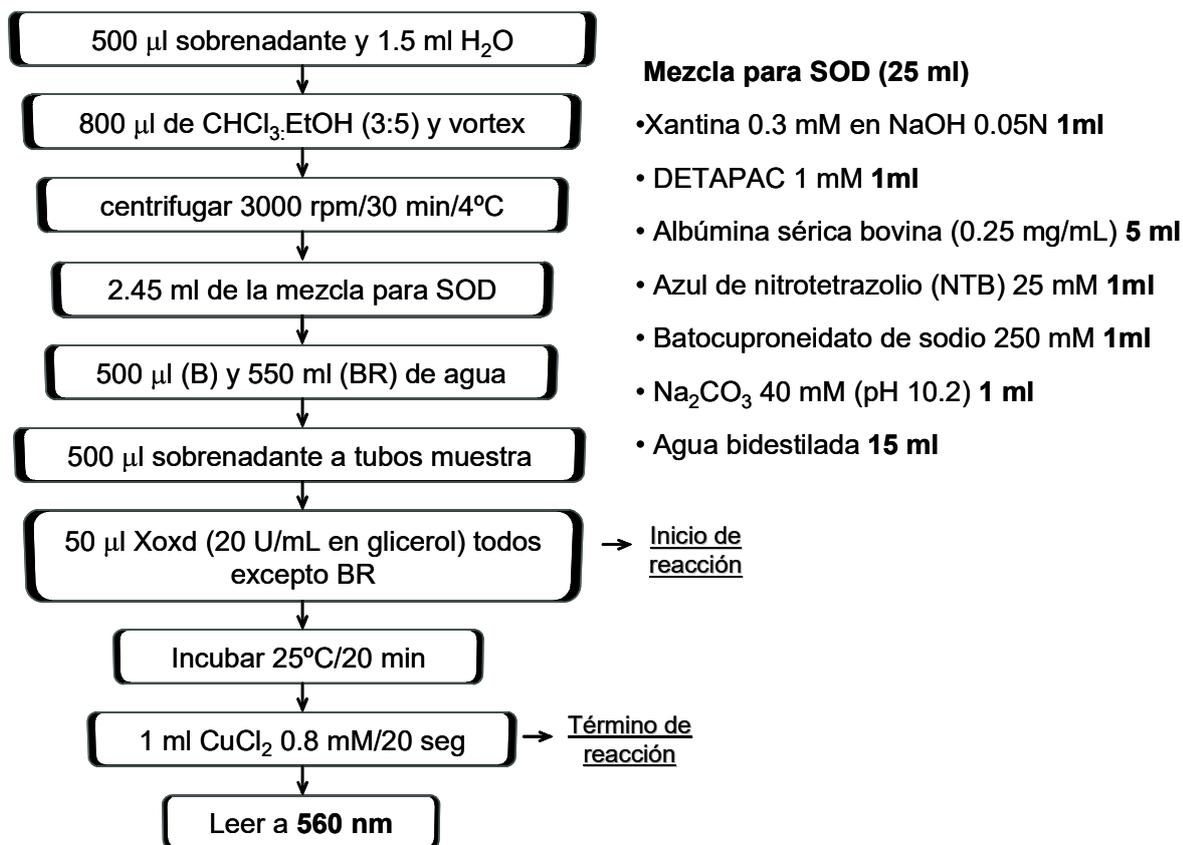


Figura 4. Evaluación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD).

La actividad de la enzima se determinó de acuerdo a las siguientes relaciones:

$$\text{Actividad} = \text{Unidades totales/mg proteína}$$

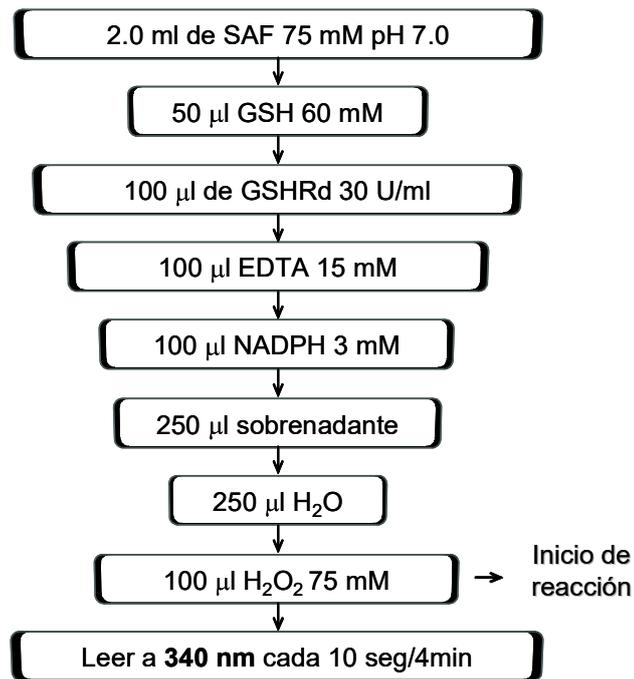
$$\text{Unidades totales} = (\text{Unidades} \times \text{vol. homogenado})/\text{alícuota}$$

$$\text{Unidades} = \% \text{ de inhibición}/-50$$

$$\% \text{ inhibición} = [(Abs_B - Abs_{SBR}) - (Abs_{Muestra} - Abs_{SBR})] / (Abs_B - Abs_{SBR}) - 100.$$

Donde Abs_B es la absorbancia de un blanco sin la enzima Xoxd, Abs_{SBR} es la absorbancia de 1 blanco de reactivos y Abs_{Muestra} es la absorbancia del grupo de tratamiento con Xoxd.

5.3.7.5. Evaluación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GSHPx). GSHPx fue medida en una alícuota de 250 µl de sobrenadante de acuerdo al método de Paglia y Valentine [123], modificado por Lawrence y Burk [124] y descrito por Kakkar et al. [122], siguiendo el procedimiento mostrado en el esquema de la figura 5.



$$\text{Actividad} = (\Delta \text{ pendiente} \times 3) / (6.22 \times \text{mg proteína})$$

$$\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.22 \times 10^6$$

Figura 5. Evaluación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GSHPx).

5.3.7.6. Evaluación de la actividad de la catalasa (Cat). La actividad de la Cat fue estimada en 50 µl de sobrenadante siguiendo el método de Aebi [125] descrito Kakkar et al. (figura 6) [122]. La actividad se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = (\text{mg proteína} \times 60) / (\text{dA/min} \times 1000)$$

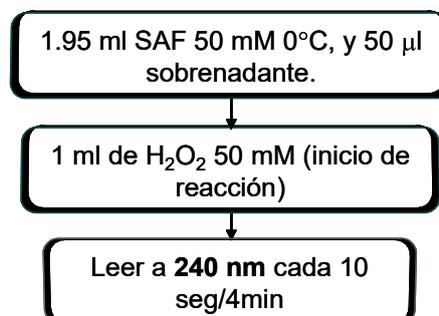


Figura 6. Evaluación de la actividad de la catalasa (Cat.)

5.4 ESTUDIO QUIMICO

5.4.1. Métodos Generales

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. La cromatografía en columna a presión reducida (CCPR) se efectuó empleando sílica gel 60 GF₂₅₄ de Merck. Las cromatografías en columna (CC) se realizaron con sílica gel 60 Merck en una proporción de 30 g de sílica por cada gramo de muestra analizada. El seguimiento de las columnas cromatográficas y de la pureza de los productos aislados se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (CCF) en cromatofolios de aluminio AL TLC de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck. Las cromatografías en capa fina preparativa (CCFP) se efectuaron en cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ de Merck. Los métodos de visualización utilizados fueron luz ultravioleta con una lámpara portátil Mineralight 254/366 nm modelo UVGL-25; y como reactivo cromogénico, una solución de 12 g de sulfato cérico amoniacal y 22 ml de ácido sulfúrico concentrado en 350 g de hielo.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C se obtuvieron en espectrómetros Varian Unity Plus-500 y Varian INOVA-400, utilizando cloroformo deuterado (CDCl₃) sulfóxido de dimetilo deuterado (DMSO-*d*₆), metanol deuterado (CD₃OD) y piridina deuterada (C₅D₅N) como disolventes, así como tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) están descritos en partes por millón; las constantes de acoplamiento (*J*) se encuentran en Hertz. Los espectros de infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro Bruker con detector Vector 22, en pastilla de KBr y en solución con CHCl₃. Los espectros de masas se obtuvieron en un equipo JEOL JMS-AX 505 HA. Los espectros de masas por impacto electrónico fueron obtenidos a 70 eV de energía de ionización.

5.4.2. Estudio químico de *E. platycarpa*

5.4.2.1. Estudio químico del extracto metanólico de las ramas. El extracto metanólico de las ramas (150 g) se suspendió en CH₂Cl₂ obteniéndose una fase soluble y un sólido café (sólido A). La fase soluble en CH₂Cl₂ se concentró a sequedad para dar 20.6 g de un residuo rojizo. El residuo se adsorbió con 21 g de sílica gel y colocó en una columna empacada con sílica gel (280

g, 8 × 55 cm), la cual se eluyó con *n*-hexano, seguido por un gradiente de *n*-hexano/AcOEt y finalmente con AcOEt 100 %, para obtener 174 fracciones de 200 ml cada una. De acuerdo al análisis por cromatografía en capa fina (CCF), las fracciones que mostraron componentes similares se reunieron y se evaporaron a sequedad para disponer de 10 fracciones principales (F_1 - F_{10}). F_1 [1/24 (780 mg, *n*-hexano 100%)], F_2 [25/66 (812 mg, de *n*-hexano 100% a AcOEt/*n*-hexano 10 %)], F_3 [67/80, 1.2 g, AcOEt/*n*-hexano de 10 % al 20%], F_4 [81/99, 1.98 g, AcOEt/*n*-hexano de 20 % al 30%], F_5 [100/119, 1.1 g, AcOEt/*n*-hexano de 15 % al 20%], F_6 [120/132, 1.23 g, AcOEt/*n*-hexano de 20 % al 30%], F_7 [133/142, 1.12 g, AcOEt/*n*-hexano de 40 % al 40%], F_8 [143/157, 2.02 g, AcOEt/*n*-hexano de 40 % al 50%], F_9 [158/166, 1.02 g, AcOEt/*n*-hexano de 60 % al 70%], F_{10} [167/174, 1.73 g, AcOEt/*n*-hexano de 80 % a AcOEt 100 %].

La fracción F_1 contiene principalmente ácidos grasos. El análisis por CCF de la fracción F_2 (812 mg) mostró una mezcla compleja, la cual fue separada por cromatografía en columna (CCr) usando sílica gel (300-400) y eluyendo con un gradiente de AcOEt/*n*-hexano (de 0 al 100%, 15 ml cada fracción), de donde se obtuvieron 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**83**) [126] y 5,7-dihidroxi-8-metil-6-prenilflavanona (**84**, 12 mg) [127], respectivamente.

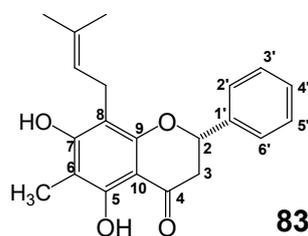
5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (83). Sólido cristalino amarillo (CH_2Cl_2); p.f 175-177 °C; $R_f = 0.45$ (*n*-hexano-AcOEt, 80:20); $[\alpha]_D +35.3^\circ$ (c 1.0, MeOH).

IR (CHCl_3) ν_{max} (cm^{-1}) **espectro 10**: 3583, 3374, 2968, 1629, 1462, 1371, 1340, 1121, 1091, 1001, 901.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) espectro 11: δ 12.34 (1H, s, OH-5), 6.18 (1H, s, OH-7), 5.40 (1H, dd, $J = 12.9, 3.3$ Hz, H-2), 5.25 (1H, tq, $J = 7.3, 2.7, 1.5$ Hz, H-2''), 3.39 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H1''), 3.04 (1H, dd, $J = 17.1, 12.6$ Hz, H3 α), 2.85 (1H, d, $J = 17.1, 3.3$ Hz, H3 β), 2.04 (3H, s, CH_3 -C-6), 1.84 (3H, s, CH_3 -4''), 1.77 (3H, d, $J = 0.9$ Hz, CH_3 -5'').

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 196.3 (C, C-4), 162.2 (C, C-7), 158.8 (C, C-5), 158.1 (C, C-9), 138.9 (C, C1'), 136.1 (C, C-3''), 128.8 (CH, C-3'), 128.8 (CH, C-5'), 128.5 (CH, C-4'), 125.8 (CH, C-2'), 125.8 (CH, C-6'), 121.5 (CH, C-2''), 106.0 (C, C-8), 103.3 (C, C-10), 102.7 (C, C-6), 78.6 (CH, C-2), 43.4 (CH_2 , C-3), 25.9 (CH_3 , C-5''), 21.3 (CH_2 , C-1''), 17.9 (CH_3 , C4''), 7.5 (CH_3 , C6'').

EM-FAB m/z (rel int) espectro 12: 339 [M^+H] (90.1), 338 (100), 283 (40), 233 (21.8), 179 (51.8), 154 (46.8), 136 (34.9), 117, (60.7), 91 (23.8).



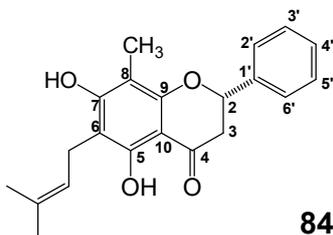
5,7-dihydroxy-8-metil-6-prenilflavanona (84). Sólido amorfo (CH_2Cl_2); pf. 156-157 °C; R_f = 0.52 (*n*-hexano-EtOAc, 80:20) $[\alpha]_D +34.6^\circ$ (c 1.0, MeOH).

IR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}): 3583, 3374, 2968, 1629, 1462, 1371, 1340, 1121, 1091, 1001, 901.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ 12.11 (1H, s, OH-C-5), 6.17 (1H, s, OH-C-7), 5.39 (1H, dd, $J = 12.9, 3.2$ Hz, H-2), 5.22 (1H, tq, $J = 7.3, 2.7, 1.5$ Hz, H-2''), 3.37 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 3.05 (1H, dd, $J = 17.3, 12.9$ Hz, H-3 α), 2.84 (1H, d, $J = 17.3, 3.2$ Hz, H-3 β), 2.04 (3H, s, CH_3 -6''), 1.76 (3H, s, CH_3 -4''), 1.75 (3H, d, $J = 0.9$ Hz, CH_3 -5'').

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ 196.3 (C, C-4), 161.9 (C, C-7), 158.9 (C, C-5), 157.1 (C, C-), 138.9 (C, C-1'), 135.7 (C, C-3'), 128.8 (CH, C-3'), 128.8 (CH, C-5'), 128.6 (CH, C-4'), 125.9 (CH, C-2'), 125.9 (CH, C-6'), 121.7 (CH, C-2''), 109.3 (C, C-8), 104.5 (C, C-10), 102.8 (C, C-6), 78.8 (CH, C-2), 43.5 (CH_2 , C-3), 25.8 (CH_3 , C-5''), 20.1 (CH_2 , C-1''), 17.8 (CH_3 , C-4''), 6.8 (CH_3 , C-6'').

EM-FAB m/z (rel int): 339 [M^+H] (100), 338 (75.6), 283 (56.6), 233 (11.7), 179 (21.4), 154 (16.2), 136 (14.5), 117, (19.8), 91 (21.2).



La fracción F_3 se disolvió en 20 ml de etanol y se agregó carbón activado (30 mg) sometiéndose a ebullición durante 3 min. La solución se filtró a través de celita y la fase etanólica se concentró a sequedad a presión reducida y el residuo fue cromatografiado por CCV (sílica

gel), empleando gradientes de *n*-hexano/CH₂Cl₂, de donde se obtuvo la 3β-*O*-acetil-11α,12α-epoxi-oleanan-28,13β-ólida (**90**, 205 mg) [128].

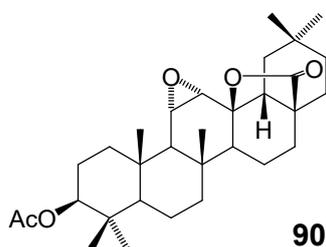
3β-*O*-acetil-11α,12α-epoxi-oleanan-28,13β-ólida (90). Sólido cristalino (CH₂Cl₂/MeOH); pf. > 300°C; R_f: 0.47 (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5); [α]_D +44.8° (c 1.0, MeOH).

IR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹) espectro 19 3620, 2954, 2868, 1755, 1719, 1471, 1368, 1143, 1027, 988, 868.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) espectro 20: δ 0.81 (1H, dd, *J* = 9 y 2 Hz, H5), 0.86 (3H, s, CH₃-23) 0.87 (3H, s, CH₃-24), 0.92 (3H, s, CH₃-30), 1.04 (3H, s, CH₃-25), 1.06 (3H, s, CH₃-26), 1.09 (3H, s, CH₃-27), 1.92 (1H, tr, *J* = 7, 3.5, 3.5 Hz, H16a), 2.12 (1H, ddd, *J* = 19, 13.5, 6 Hz) 2.31 (1H, *J* = 14, 3.5 Hz, H-18), 3.01 (1H, dd, *J* = 4, 1.5 Hz, H-11), 3.03 (1H, d, *J* = 4 Hz, H-12), 4.53 (1H, dd, *J* = 11, 5.5 Hz, H-3);

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, TMS): δ 179.3 (C, C28), 170.9 (C, C32), 87.5 (C, C13), 80.4 (CH, C3), 57.0 (CH, C12), 54.6 (CH, C5), 52.6 (CH, C11), 50.6 (CH, C9), 49.6 (CH, C18), 43.8 (C, C17), 41.3 (C, C8), 40.5 (C, C14), 37.8 (CH₂, C1), 37.8 (C, C4), 37.8 (CH₂, C19), 37.4 (C, C10), 34.3 (CH₂, C21), 33.2 (CH₃, C29), 31.4 (C, C20), 31.0 (CH₂, C7), 27.7 (CH₃, C23), 27.0 (CH₂, C15), 26.7 (CH₂, C22), 23.6 (CH₃, C30), 23.1 (CH₂, C2), 21.3 (CH₃, C31), 21.3 (CH₂, C16), 20.0 (CH₃, C26), 18.8 (CH₃, C27), 17.4 (CH₂, C6), 17.2 (CH₃, C25), 16.2 (CH₃, C24);

EIMS *m/z* (rel int) espectro 21: 512 [M]⁺ (45), 498 (12), 497 (24), 494 (9), 484 (7), 467 (7), 466 (16), 452 (16), 451(10), 438 (6), 437 (13), 277 (69), 263 (73), 249 (21), 248 (23), 235 (22), 218 (21), 217 (58), 205 (41), 204 (100), 203 (95), 189 (98), 175 (48), 161 (36.2), 119 (50), 43 (57).



La fracción *F*₄ se suspendió en *n*-hexano caliente y se filtró a vacío, de donde se separó la 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (**81**, 18 mg) [129]. El filtrado fue evaporado a sequedad obteniendo un residuo blanco, el cual fue recromatografiado por CC empleando sílica gel (300-

400) y eluyendo con AcOEt/*n*-hexano 10% y donde se obtuvo ácido 3β-*O*-acetiloleanólico (**88**, 550 mg) [130], lupeol (**91**, 150 mg) [131] y β-sitosterol (**93**, 500 mg) [132]. Los compuestos **91** y **93** fueron identificado mediante comparación directa con una muestra auténtica.

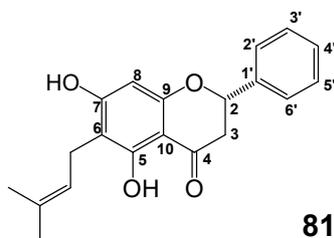
5,7-dihydroxy-6-prenilflavanona (81). Sólido amarillo (CH₂Cl₂); pf. 214-216°C; *R_f* = 0.37 (AcOEt/*n*-hexano 20 %); [α]_D²⁵ = +34.9° (c 1.0, MeOH);

IR (CHCl₃) ν_{max} espectro 4: 3143, 3042, 2918, 1633, 1586, 1482, 1457, 1303, 1216, 1079 cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃-DMSO, TMS) espectro 5: δ 12.27 (1H, s, OH-C5), 6.08 (1H, s, H-8) 5.38 (1H, dd, *J* = 12.9, 3.3 Hz, H-2), 5.21 (1H, tq, *J* = 6.9, 3, 1.5 Hz, H2"), 3.22 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H1"), 3.04 (1H, dd, *J* = 17.1, 12.9 Hz, H3α), 2.76 (1H, d, *J* = 17.1, 3 Hz, H3β), 1.67 (3H, s, CH₃-4"), 1.77 (3H, s, CH₃-5").

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) espectro 6: δ 194.7 (C, C4), 164.2 (C, C7), 160.7 (C, C9), 160.0 (C, C5), 138.2 (C, C1"), 130.5 (C, C3"), 128.2 (CH, C3'), 128.1 (CH, C5'), 128.1 (CH, C4'), 125.6 (CH, C2'), 125.6 (CH, C6'), 122.13 (CH, C2"), 108.09 (C, C8), 101.6 (C, C10), 94.5 (C, C6), 78.3 (CH, C2), 42.8 (CH₂, C3), 25.3 (CH₃, C5"), 20.5 (CH₂, C1"), 17.3 (CH, C4").

EM-FAB⁺ *m/z* (rel int) espectro 7: 325 [M⁺+H] (72.3), 324 (99.6), 269 (100), 219 (16.3), 165 (49.5), 154 (95.2), 136 (69.6), 91 (32.5).



Las fracciones *F*₅₋₇ fueron reunidas, considerando su perfil en CCF, y cromatografiadas usando CCV, empleando mezclas de CH₂Cl₂/MeOH de polaridad creciente como sistemas de elución, de donde se obtuvo (1''*R*)-5,4',1''-trihidroxi-6,7-(3'',3''-dimetilcroman)-flavona (**80**) y una mezcla de ácido oleanólico (**89**) [130] y ácido betulínico (**92**) [131], la cual fue identificada por CCF y separa por CCP empleando CH₂Cl₂/MeOH (99:1, 6 eluciones) como mezcla de elución. De manera adicional, se aisló el palmitato del β-sitosterilo (**95**) [132].

(1''*R*)-5,4',1''-trihidroxi-6,7-(3'',3''-dimetilcroman)-flavona (80). Sólido amarillo a partir de MeOH/CH₂Cl₂; pf. 254-255 °C; *R*_f: 0.47 (MeOH/CH₂Cl₂ 5 %); [α]_D²⁵ +0.3° (c 0.1; MeOH).

UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 218 (4.47), 301 (4.14) 334 (4.31) nm

IR (KBr, ν_{max}) espectro 1: 3358, 1669, 1618, 1507, 1093, 1024 cm⁻¹

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆, TMS) espectro 2: tabla 6,

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆, TMS) espectro 3: tabla 6,

EIMS (*m/z*): 354 [M]⁺ (64.6), 321 (30.7), 295 (100), 268 (13.2), 267 (9.3), 239 (2.0), 176 (5.6), 121 (4.8), 149 (3.8).

Obtención de los ésteres (*S*)- y (*R*)-MTPA de 80. El compuesto **80** (7 mg) fue disuelto en 700 μl de piridina anhídrida deuterada (C₅D₅N) y colocado en un tubo de resonancia. Se agregó 10 μl del enantiómero (*R*) de cloruro de metoxitri fluorometilfenilacetilo (MTPA). En otro tubo conteniendo **80** en C₅D₅N se añadió 10 μl de isómero (*S*) del MTPA. En cada caso, la mezcla resultante fue agitada para dar los correspondientes ésteres (*S*) y (*R*) de **80** y sus espectros fueron obtenidos a 300 MHz [133].

(*S*)-MTPA éster de 80 (80a):

RMN ¹H (300 MHz, Py-*d*₅, TMS): δ 7.61 (2H, m, MTPA-ArH), 7.43 (3H, m, MTPA-ArH), 3.45 (3H, s, MTPA-OCH₃), 5.23 (1H, dd, *J* = 5.2, 7.0 Hz, H-1''), 3.51 (1H, dd, *J* = 5.2, 13.2 Hz, H-2''a), 3.43 (1H, dd, *J* = 7.3, 13.2 Hz, H-2''b).

(*R*)-MTPA éster de 80 (80b):

RMN ¹H (300 MHz, Py-*d*₅, TMS): δ 7.63 (2H, m, MTPA-ArH), 7.47 (3H, m, MTPA-ArH), 3.47 (3H, s, MTPA-OCH₃), 5.28 (1H, dd, *J* = 5.1, 7.2 Hz, H-1''), 3.98 (1H, dd, *J* = 7.2, 13.8 Hz, H-2''a), 3.96 (1H, dd, *J* = 5.1, 13.8 Hz, H-2''b)

5.4.2.2. Estudio químico del extracto metanólico de las hojas. El extracto metanólico de las hojas (22 g) fue fraccionado empleando CCV en sílica gel (66 g) y como mezcla de elución un gradiente de polaridad de *n*-hexano-AcOEt (de *n*-hexano 100% a AcOEt 100%, 120 ml de cada fracción) y finalmente con MeOH para obtener 33 fracciones principales. La *F*₃ (1.422 g, *n*-hexano 100%) fue separada por CC en sílica gel permitiendo la obtención del nuevo compuesto

4'-*O*-metil-6-metil-8-prenilnaringenina (**85**, 81.8 mg), y 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**83**, 180 mg) [126].

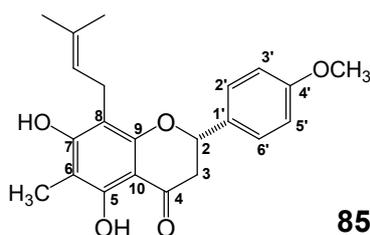
(**2S**)- 4'-*O*-metil-6-metil-8-prenilnaringenina (**85**). Sólido amarillo (CH₂Cl₂); pf. 152-155 °C, *R_f* = 0.49 (AcOEt/*n*-hexano 20 %), [α]_D²⁵ = -40 (c 0.1 CHCl₃)

IR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹) espectro 13: 3304, 2930, 2870, 1633, 1591, 1458, 1336, 1253, 1120, 1035.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, TMS) espectro 14: δ 5.28 (1H, dd, *J* = 12.6, 3.2 Hz, H-2); 3.00 (1H, dd, *J* = 17.2, 12.8 Hz, H-3a), 2.70 (1H, dd, *J* = 17.2, 3.2 Hz, H-3b), 12.29 (1H, s, OH-C-5), 1.94 (3H, s, CH₃-C-6), 6.20 (1H, s, OH-C-7), 7.32 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', H-5'), 6.89 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', H-6') 3.78 (3H, s, OCH₃-8'') 3.31 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1''), 5.18 (1H, t *J* = 7 Hz H-2''), 1.77 (3H, s, CH₃-4''), 1.70 (3H, CH₃-5'').

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, TMS) espectro 15: δ 78.4 (CH, C2), 43.3 (CH₂, C3), 196.6 (C, C4), 102.8 (C, C10), 159.8 (C, C5), 103.3 (C, C6), 7.6 (CH₃, C7''), 162.3 (C, C7), 106.0 (C, C8), 158.8 (C, C9), 136.2 (CH₂-C1'), 127.5 (CH, C2', C6'), 114.2 (CH, C3', C5'), 158.3 (C, C4'), 55.4 (CH₃, C8''), 21.3 (CH₂, C1''), 121.6 (CH, C2''), 131.1 (C, C-3''), 25.9 (CH₃, C-4''), 17.9 (CH₃, C-5''), 7.6 (CH₃, C7'')

FABMS m/z (rel int): 368 [M⁺+H] (100), 353 (18), 325 (18), 313 (25), 219 (72), 179 (66), 134 (32), 83 (14), 65 (5), 43 (5).



Las cristalizaciones sucesivas de las fracciones *F*₄₋₇ (329 mg, *n*-hexano 100%) con *n*-hexano/CH₂Cl₂ permitieron la obtención de la 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (**81**, 36.7 mg) [129]. El análisis por CCF de la fracción *F*₉ (378 mg, AcOEt/*n*-hexano 10 %) mostró una mezcla compleja la cual fue separada por CCF preparativa empleando AcOEt/*n*-hexano 20 % (*R_f* 0.61) como sistema de elución (una elución), donde se obtuvo 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona (**87**, 31 mg) [129]. La fracción *F*₁₁ fue cromatografiada en sílica gel y eluyendo con un gradiente

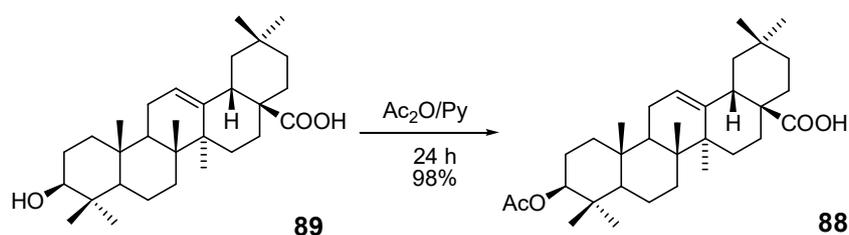
de polaridad de *n*-hexano-AcOEt, obteniendo principalmente 4'-*O*-metil-8-prenilnaringenina (**86**, 9.1 mg) [134].

Por otro lado, 8 g del sólido A fueron acetilados con 5 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina. El producto de la reacción mostró, por CCF, una mezcla muy compleja, la cual fue separada por CCV, empleando AcOEt/*n*-hexano como sistema de elución, y donde se obtuvieron los derivados acetilados de β -D-glucósido de β -sitosterilo (**94**, 75 mg), sacarosa (**96a**, 1.73 g) y 5-*O*-metil-*myo*-inositol (**97**, 5.7 g) [135]. Los compuestos conocidos fueron identificados al comparar sus propiedades físicas y espectroscópicas con las informadas en la literatura.

5.4.3 Síntesis por relevo de 3 β -*O*-acetil-11 α ,12 α -epoxi-oleanan-28,13 β -ólida (**90**).

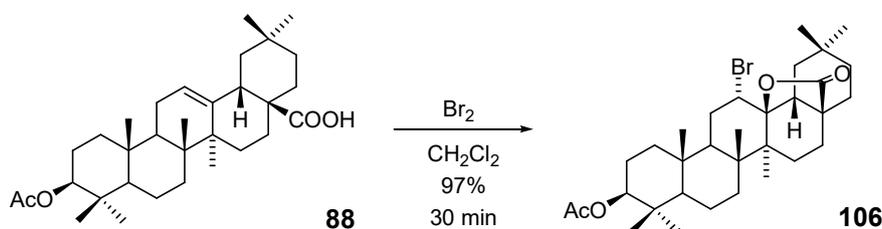
La síntesis se efectuó a partir del ácido oleanólico, de acuerdo a la metodología descrita en la literatura [136].

5.4.3.1. Ácido 3 β -*O*-acetiloleanólico (88**).** El ácido oleanólico (**89**, 1g, 2.19 mmol), disuelto en anhídrido acético (10 ml) y piridina (10 ml) se hizo reaccionar a temperatura ambiente por 24 h. Transcurrido el tiempo se agregó de agua (10 ml) y el producto se recuperó de manera convencional obteniéndose el ácido 3 β -*O*-acetiloleanólico (**88**, 1.05 g, 2.10 mmol, 98%) con pf. 214-215 °C [130]; IR ν_{\max} cm^{-1} (CHCl_3) 3514, 2950, 2877, 1722, 1695, 1638, 1371, 1027.

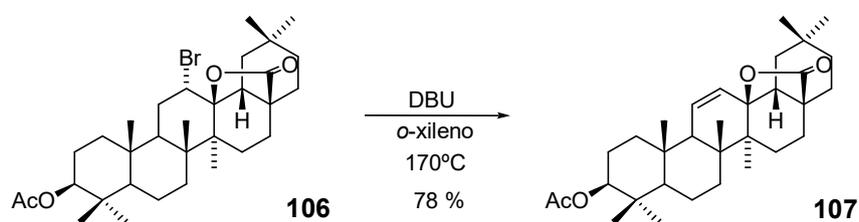


6.4.3.2. 3 β -*O*-acetil-12 α -bromo-oleanan-28,13 β -ólida (106**).** El ácido 3 β -*O*-acetiloleanólico (**88**, 1 g, 2.006 mmol) en CH_2Cl_2 (25 ml) se trató con una solución de bromo (1.20 g, 7.62 mmol) en MeOH (50 ml) a temperatura ambiente. Después de 15 min de reacción se agregó agua (50 ml). El producto se recuperó mediante extracciones con CH_2Cl_2 (5 extracciones), lavándose sucesivamente la fase orgánica con NaHSO_3 (5 %) y agua, y se secó a través de

Na₂SO₄ anhidro. Después de la recristalización con CH₂Cl₂/MeOH se obtuvo un sólido blanco cristalino (**106**, 1.13 g, 1.96 mmol, 97 %) con pf. 194-196 °C [136]. IR ν_{\max} cm⁻¹ (CHCl₃) 2958, 2937, 1762, 1721, 1468, 1389, 1369, 1301, 1257.

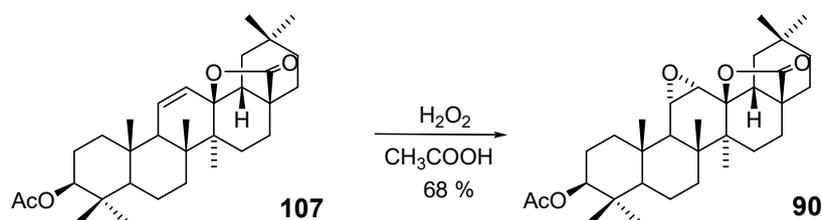


6.4.3.3. 3β-O-acetil-11-en-oleanan-28,13β-ólida (107). La 3β-O-acetil-12α-bromo-28,13β-ólida (**106**, 1 g, 1.72 mmol) se sometió a reflujo con DBU (7.6 ml, 0.05 mmol) y *o*-xileno (15 ml) por 18 h a 170 °C. Enseguida, se agregó agua (20 ml) y se extrajo con CH₂Cl₂ (5 veces). La fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl (10%), NaHCO₃ (saturado) y salmuera. Después de la eliminación del disolvente a presión reducida se obtuvo **107** como un sólido blanco cristalino (665 mg, 1.34 mmol, 78 %) de pf. 226-227 °C [136]. IR ν_{\max} cm⁻¹ (CHCl₃) 2953, 1754, 1720, 1639, 1469, 1390, 1368, 1320, 1299, 1257, 1139, 1084.



6.4.3.4. 3β-O-acetil-11α,12α-epoxi-oleanan-28,13β-ólida (90). La 3β-O-acetil-11-en-28,13β-ólida (**107**, 1 g, 2.01 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (25 ml) y se agregó una mezcla de H₂O₂ 30 % (15 ml, 0.44 mmol) y CH₃COOH (15 ml) gota a gota con agitación y en baño de hielo. Posteriormente la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 29 h. Se agregó (15 ml) y el producto se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ (saturado), salmuera y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Después de la recristalización con CH₂Cl₂/MeOH se obtuvo un sólido cristalino (**90**, 701mg, 1.37 mmol, 68%) con pf. > 300°C [128]; R_f: 0.47

(CH₂Cl₂/MeOH, 95:5); [α]_D²⁵ +44.8° (c 1.0, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3620, 2954, 2868, 1755, 1719, 1471, 1368, 1143, 1027, 988, 868.



5.4.4. Estudio químico de *E. subcoriacea*

6.4.4.1. Estudio químico del extracto metanólico de la corteza. Parte del extracto metanólico de la corteza (80 g) fue suspendido en agua (300 ml) y extraído con AcOEt, donde se obtuvieron 53 g de un sólido café (denominado CM1). La fase acuosa resultante se extrajo con *n*-BuOH (figura 7). Se evaluó la actividad antioxidante de cada una de las fracciones obtenidas a concentraciones de 100 ppm en tres ensayos distintos.

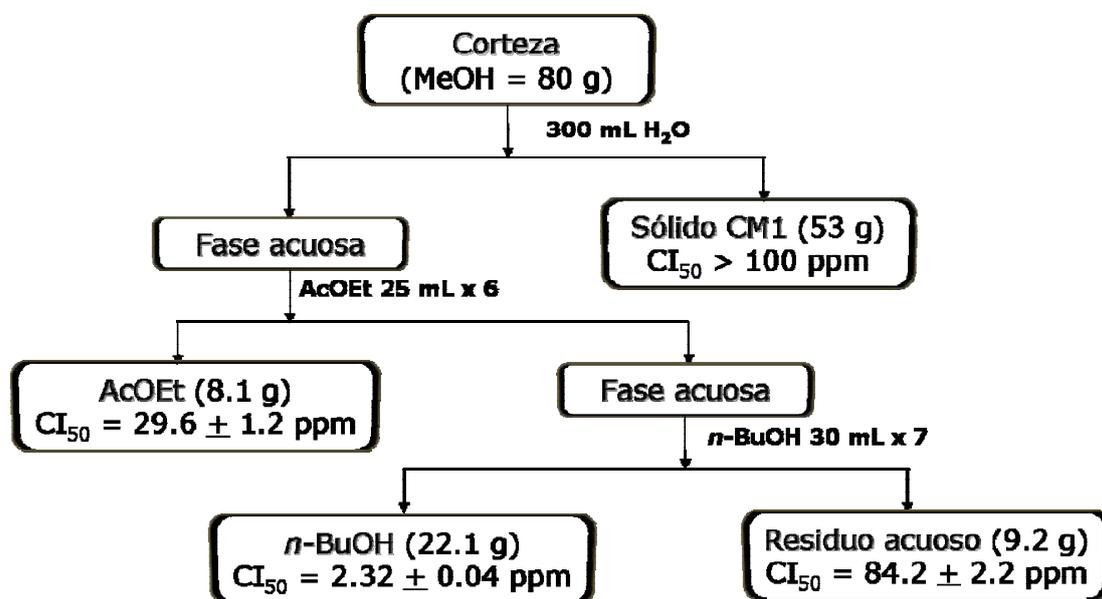


Figura 7. Procedimiento experimental aplicado al extracto metanólico de la corteza.

La fracción soluble en AcOEt fue cromatografiada usando CCV (sílica gel, 12.5 cm × 3 cm) eluyendo con mezclas de polaridad creciente de *n*-hexano y AcOEt, finalmente con mezclas de AcOEt/MeOH/H₂O (98:1:1 y 95:2.5:2.5), colectando 80 fracciones de 100 ml cada una. El análisis de las fracciones permitió reunir aquellas de composición similar, obteniendo 11 fracciones principales como a continuación se describe: *F*₁ [1/7 (126 mg, 100% *n*-hexano)], *F*₂ [8/20 (425 mg, de 10 a 20% AcOEt/*n*-hexano)], *F*₃ [21/24 (395 mg, 30% AcOEt/*n*-hexano)], *F*₄ [25/27 (512 mg, 40% AcOEt/*n*-hexano)], *F*₅ [28/31 (574 mg, 50% AcOEt/*n*-hexano)], *F*₆ [32/41 (225 mg, 60% AcOEt/*n*-hexano)], *F*₇ [42/48 (231 mg, 70% AcOEt/*n*-hexano)], *F*₈ [49/51 (384 mg, 80% AcOEt/*n*-hexano)], *F*₉ [52/58 (621 mg, 100% AcOEt)], *F*₁₀ [59/64 (2.2 g, 98:1:1 AcOEt/MeOH/H₂O)] y *F*₁₁ [65/80 (1.3 g, 95:2.5:2.5 AcOEt/MeOH/H₂O)]. Se evaluó la actividad antioxidante contra el daño inducido por el HAAP en el homogenado pancreático a 100 ppm de cada fracción. Cuando el porcentaje de inhibición fue mayor al 50 % se determinó la CE₅₀ en cada caso.

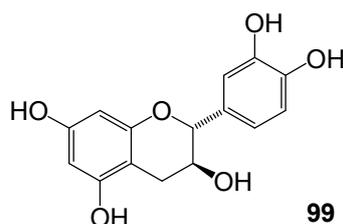
Las cristalizaciones sucesivas con CH₂Cl₂ de sólidos obtenidos a partir de las fracciones *F*₃ (CE₅₀ 15.3 ± 2.1 ppm) y *F*₄ (CE₅₀ 35.8 ± 1.13 ppm) permitieron la obtención de (+)-catequina (**99**, 132 mg, AcOEt/*n*-hexano 10%) [137] y (+)-afzelequina (**100**, 115 mg, AcOEt/*n*-hexano 10%) [138] respectivamente.

(+)-Catequina (99). Sólido café (CH₂Cl₂), pf. 123-125 °C *R*_f = 0.51 (AcOEt/*n*-hexano 20 %), $[\alpha]_D^{25} = +23.5$ (c 0.1 CHCl₃)

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3304, 2930, 2870, 1633, 1591, 1458, 1336, 1253, 1120, 1035.

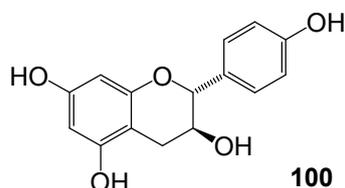
RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, TMS) espectro 26: δ 4.55 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-2); 3.96 (1H, ddd, *J* = 5.4, 7.8 y 7.8 Hz, H-3 α), 2.84 (1H, dd, *J* = 5.4 y 16.2 Hz, H-4 α), 2.49 (1H, d, *J* = 8.1 y 16.2 Hz, H-4 β), 5.92 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6), 5.85 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-8), 6.82 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2'), 6.71 (1H, dd, *J* = 2.4 y 9.9 Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, *J* = 9.9 Hz, H-5').

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS): δ 82.9 (CH, C2), 68.8 (CH, C3), 28.5 (CH₂, C4), 157.6 (C, C5), 95.5 (CH, C6), 157.8 (C, C7), 96.3 (CH, C8), 156.9 (C, C9), 100.8 (C, C10), 132.2 (C, C1'), 115.2 (CH-C2'), 146.2 (C, C3'), 146.3 (C, C4'), 116.1 (CH, C5'), 120.1 (CH, C6').



(+)-Afzelequina (100). Sólido café (CH₂Cl₂), pf. 123-125 °C $R_f = 0.51$ (AcOEt/*n*-hexano 20 %), $[\alpha]_D^{25} = +23.5$ (c 0.1 CHCl₃)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO, TMS) espectro 27: δ 5.12 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-2); 3.62 (1H, ddd, $J = 5.4, 7.5$ y 7.5 Hz, H-3 α), 2.75 (1H, dd, $J = 5.4$ y 17.1 Hz, H-4 α), 2.43 (1H, d, $J = 8.1$ y 16.2 Hz, H-4 β), 6.49 (1H, s, H-6), 6.41 (1H, s, H-8), 7.81 (1H, dd, $J = 1.8$ y 6.9 Hz, H-2', H-6'), 6.88 (1H, dd, $J = 1.8$ y 6.9 Hz, H-3', H-5').



Las fracciones F_9-F_{11} (4.121 g, EC₅₀ 10.2 \pm 1.1 ppm) se reunieron de acuerdo a su perfil cromatográfico, se concentraron a sequedad y se purificaron por cromatografía en columna con sefadex-LH-20, previamente equilibrado con MeOH/H₂O (1:1) y eluido con la misma mezcla, para obtener 2 fracciones principales F_9-F_{11A} (2.32 g) y F_9-F_{11B} (625 mg). La recristalización del sólido obtenido a partir de la fracción F_9-F_{11A} con CH₂Cl₂/MeOH permitió la obtención de 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxfenil)-6-(3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enil)-7-hidroxicumarina (**98**, 2.3 g, pf. 230-235 °C).

3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxfenil)-6-(3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enil)-7-hidroxicumarina (98). Sólido amarillo (CH₂Cl₂/MeOH), R_f 0.21 (MeOH/CH₂Cl₂, 7%).

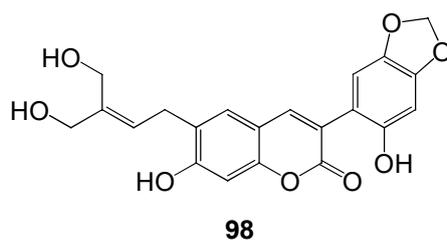
IR ν_{max} (KBr, cm⁻¹) espectro 22: 3387 (OH), 2928, 1693 (CO), 1615, 1231, 1037, 843

UV (CH₃OH) λ_{max} nm (log ϵ) espectro 23: 348 (44.9), 270 (23.9) 210 (138.1) nm

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD, TMS) espectro 24: tabla 7,

RMN ¹³C (125MHz, CD₃OD, TMS) espectro 25: tabla 7,

HR-FAB-MS m/z 399.1078 [M+1]⁺ (C₂₁H₁₈O₈ requerido para 399.1080).



Asi mismo, el 3-*O*- β -D-galactopiranosido de la catequina (**101**, 520 mg) [137] fue obtenido de la cristalización de MeOH del sólido obtenido de la fracción F_9 - F_{11B} . El análisis cromatográfico de la fracción inactiva F_2 permitió el aislamiento de glabranina (**82**, 135 mg) [139], 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**83**, 135 mg) [126], 5,7-dihidroxi-8-metil-6-prenilflavanona (**84**, 119 mg) [127] y lupeol (**91**, 42 mg) [131]. La fracción F_5 contenía una mezcla de ácido oleanólico (**89**) [130] y ácido betulínico (**92**) [131].

El residuo de la extracción con *n*-BuOH (22.1 g, CE₅₀ 15.8 \pm 2.1 ppm) fue adsorbido en sílica gel, aplicado en una columna cromatográfica (38 cm x 18 cm) y eluido primero con AcOEt (100 %) y después con AcOEt/MeOH/H₂O, donde se obtuvo 3-*O*-metil-*chyro*-inositol (**97**, 2.4 g) y **101** (12.5 g,) de acuerdo al esquema detallado en la figura 8.

(+)-3-*O*- β -D-galactopiranosido de la catequina (101). Sólido café (CH₂Cl₂), pf. 220-225 °C
R_f = 0.30 (*n*-BuOH/AcOH/H₂O, 4:1:2).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD, TMS) espectro 26: δ 4.92 (1H, d, J = 6 Hz, H-2); 4.20 (1H, q, J = 5.4, 7.8 y 7.8 Hz, H-3), 2.84 (2H, dd, J = 2.0 y 5.5 Hz, H-4), 5.92 (1H, d, J = 4 Hz, H-6), 5.89 (1H, d, J = 4 Hz, H-8), 4.17 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1"), 3.10 (1H, ddd, J = 2.5, 7.5 y 7.4 Hz, H-2"), 3.23 (1H, dd, J = 2.5 y 7.5 Hz, H-3"), 3.19 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-4"), 3.17 (1H, m, H-5"), 3.84 (1H, dd, J = 2.1 y 12.1 Hz, H-6"), 3.64 (1H, dd, J = 5.4 y 12.1 Hz, H-6").

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, TMS): δ 80.1 (CH, C2), 76.1 (CH, C3), 26.1 (CH₂, C4), 157.4 (C, C5), 95.4 (CH, C6), 157.9 (C, C7), 95.6 (CH, C8), 156.6 (C, C9), 100.7 (C, C10), 132.2 (C, C1'), 114.8 (CH-C2'), 146.2 (C, C3'), 146.3 (C, C4'), 116.2 (CH, C5'), 119.6 (CH, C6') 103.8 (CH, C1"), 75.2 (CH-C2"), 71.6 (CH, C3"), 77.8 (CH, C4"), 78.0 (CH, C5"), 62.8 (CH, C6").

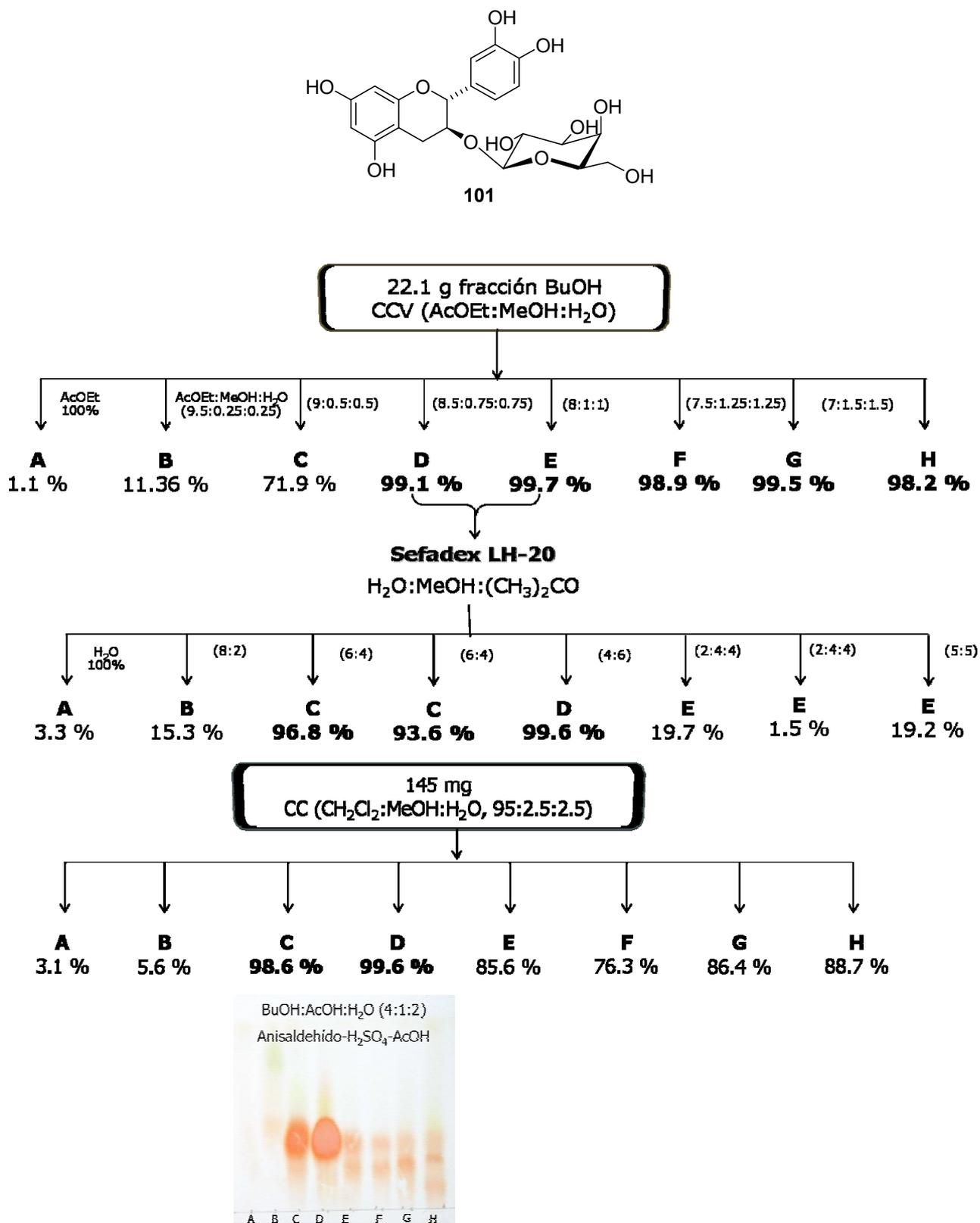


Figura 8. Tratamiento experimental de la fracción soluble en *n*-BuOH del extracto MeOH de la corteza

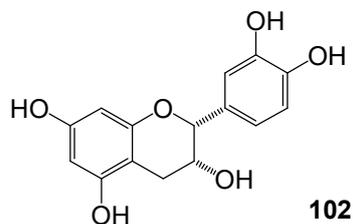
5.4.4.2. Estudio químico del extracto metanólico de las ramas. El extracto metanólico de las ramas (210 g) fue adsorbido en sílica gel, aplicado en una columna cromatográfica (930 g sílica gel, 51 x 9.5 cm) y eluido con *n*-hexano, mezclas de polaridad creciente de AcOEt/*n*-hexano (de 0 a 100%) y finalmente con AcOEt/MeOH/H₂O (98:1:1, 97:1.5:1.5 y 95:2.5:2.5) para obtener 157 fracciones de 700 ml cada una. El perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas permitió reunir 11 fracciones principales: F_{1-11} (F_1 [1/16 (3.5 g, *n*-hexano 100% a AcOEt/*n*-hexano 15 %)], F_2 [17/33 (4.32 g, AcOEt/*n*-hexano 20 al 25 %)], F_3 [34/52 (5.12 g, AcOEt/*n*-hexano de 30 a 50%)], F_4 [53/65 (512 mg, AcOEt/*n*-hexano 70%)], F_5 [66/79 (574 mg, AcOEt/*n*-hexano 80%)], F_6 [80/91 (225 mg, AcOEt 100%)], F_7 [92/104 (231 mg, AcOEt 100%)], F_8 [105/117 (6.25 g, AcOEt/MeOH/H₂O 98:1:1)], F_9 [118/127 (4.71 g, AcOEt/MeOH/H₂O 98:1:1)], F_{10} [128/136 (9.48 g, AcOEt/MeOH/H₂O 97:1.5:1.5,)] y F_{11} [137/157 (14.2 g, AcOEt/MeOH/H₂O 95:2.5:2.5)]).

La fracción F_1 contenía principalmente material graso y no mostró actividad antioxidante, por lo que no fue investigada. Las fracciones F_{2-3} (9.44 g, EC₅₀ 112.1 ± 1.9 ppm) fueron adsorbidas en sílica gel y aplicadas en una columna cromatográfica (2.5 x 5 cm empacada con 130 g of sílica gel). La columna fue eluida con una serie de mezclas de disolventes: *n*-hexano 100%, AcOEt/*n*-hexano (de 10 a 40 %) para obtener 4 fracciones F_{2-3A} , F_{2-3B} , F_{2-3C} y F_{2-3D} . La subfracción F_{2-3A} contenía principalmente lupeol (**91**). El ácido oleanólico (**89**) fue obtenido de la cristalización del sólido blanco de la subfracción F_{2-3B} . La subfracción F_{2-3C} estaba constituida de una mezcla (3:2) de ácido betulínico (**92**) y ácido oleanólico (**89**).

La subfracción bioactiva F_{2-3D} fue separada por cromatografía en columna usando sílica gel (300-400) y eluyendo con AcOEt/*n*-hexano 20 % para dar dos fracciones A y B, que contenían (-)-epicatequina (**102**, 425 mg) [138] y eriodictiol (**103**, 221 mg) [140] respectivamente.

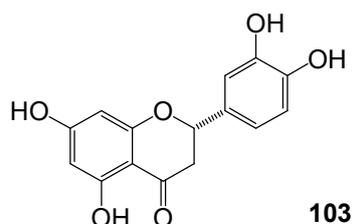
(-)-Epicatequina (102). Sólido café (CH₂Cl₂), pf. 131-133 °C $R_f = 0.44$ (AcOEt/*n*-hexano 20 %), $[\alpha]_D^{25} = -31.2$ (c 0.1 CHCl₃)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) espectro 30: δ 4.78 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2), 4.13 (1H, ddd, $J = 1.5, 3.6$ y 4.8 Hz, H-3β), 2.79 (1H, dd, $J = 4.8$ y 16.8 Hz, H-4α), 2.49 (1H, d, $J = 3.6$ y 16.8 Hz, H-4β), 5.99 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.87 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.99 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 6.71 (1H, dd, $J = 1.5$ y 8.4 Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5').



(-)-Eriodictiol (103). Sólido amarillo (CH₂Cl₂), pf. 131-133 °C $R_f = 0.37$ (AcOEt/*n*-hexano 20 %), $[\alpha]_D^{25} = -21.8$ (c 0.1 CHCl₃)

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, TMS) espectro 31: δ 5.31 (1H, dd, $J = 3.0$ y 12.9 Hz, H-2), 3.00 (1H, dd, $J = 12.9$ y 16.8 Hz, H-3 α), 2.68 (1H, dd, $J = 3.0$ y 16.8 Hz, H-3 β), 6.92 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.34 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.71 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 6.48 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, H-6').



El análisis de las fracciones F_{8-11} por CCF en celulosa y empleando *n*-BuOH/AcOH/H₂O (4:1:2, una elución) como sistema de elución, mostró una mezcla compleja de azúcares y compuestos polifenólicos [141]. Por lo tanto, estas fracciones fueron reunidas (34.6 g) y suspendidas en agua (200 ml). Esta suspensión fue extraída sucesivamente con AcOEt ($F_{8-11AcOEt}$, 4.49 g, EC₅₀ 9.2 ± 1.1 ppm) y *n*-BuOH ($F_{8-11BuOH}$, 19.4 g, EC₅₀ 11.5 ± 3.1 ppm). La fracción $F_{8-11AcOEt}$ fue adsorbida en sílica gel y aplicada en una columna cromatográfica (25 x 5 cm). La columna fue eluida con AcOEt 100%, AcOEt/MeOH/H₂O (98:1:1, 97:1.5:1.5 y 95:2.5:2.5) colectando 500 ml para cada subfracción: A (1/5), B (6/11), C (12/17) y D (18/22). La subfracción A no muestra actividad antioxidante. Las cristalizaciones sucesivas de los sólidos obtenidos de las fracciones B (CE₅₀ 9.1 ± 2.0 ppm) and C (CE₅₀ 18.1 ± 1.8 ppm) permitieron la obtención de **98** y **101** respectivamente. 3-*O*-metil-*chiro*-inositol (625 mg) fue separado de la fracción inactiva D.

5.4.4.3. Estudio químico del extracto metanólico de las hojas. El extracto metanólico de las hojas fue tratado de acuerdo al procedimiento mostrado en el esquema detallado de la figura 9. El extracto metanólico (385 g) fue suspendido en 600 ml de agua. La suspensión fue extraída con AcOEt (CE_{50} 28.2 ± 2.4 ppm) y *n*-BuOH (CE_{50} 11.5 ± 1.8 ppm), obteniendo dos fases orgánicas, un sólido amarillo (sólido HMS1, 92 g, CE_{50} 9.8 ± 1.2 ppm) y la fase acuosa (CE_{50} > 100 ppm). El análisis de la fase soluble en AcOEt por CCF mostró una mezcla de 99 y 102 principalmente. Parte del sólido A (80 g) fue adsorbido en sílica gel, aplicado en una columna cromatográfica (30 x 16 cm) y eluida con AcOEt 100 %, AcOEt/MeOH/H₂O (98:1:1 y 95:2.5:2.5), para obtener 3 fracciones principales F_1 (1/5), F_2 (6/16) y F_3 (17/30). La cristalización de la fracción F_2 con MeOH permitió la obtención de 3-*O*-β-D-galactopiranosido de quercetina (104, 61 g, espectro 32) [138].

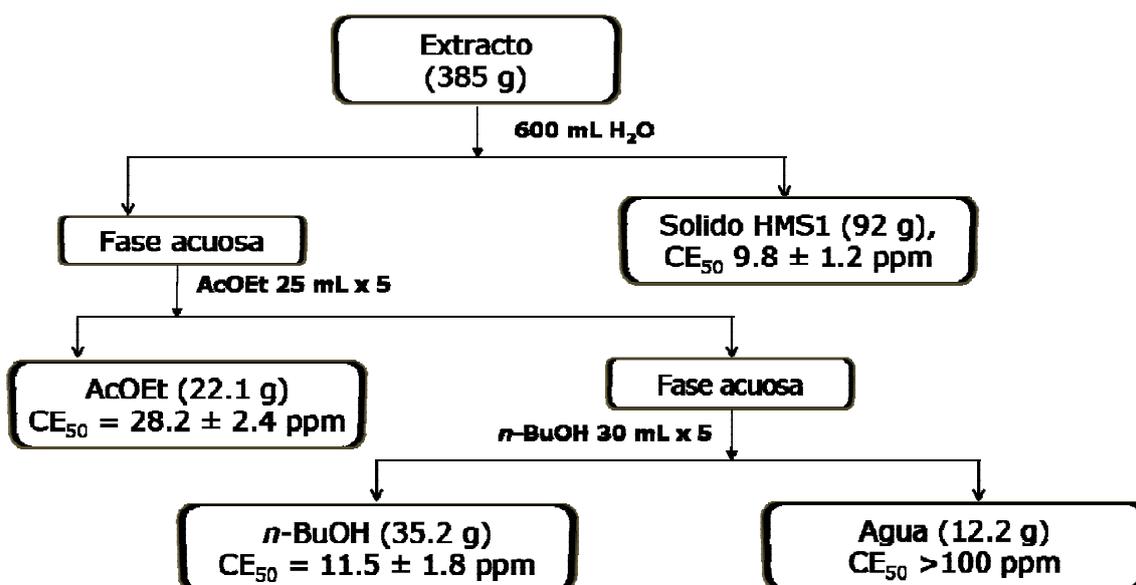


Figura 9. Tratamiento del extracto metanólico de las hojas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados y la discusión se presentan en tres partes: la primera, describe la evaluación de la actividad antioxidante (mediante los ensayos de la capacidad reductora del radical DFPH y la inhibición de la peroxidación de lípidos en un modelo de páncreas de rata) y la evaluación de la actividad hipoglicemiante, en ratas normales y diabéticas de los extractos metanólicos de *E. platycarpa*. La segunda, describe el análisis químico de los extractos bioactivos de *E. platycarpa* y *E. subcoriacea*, así como las evaluaciones biológicas adicionales a las sustancias puras aisladas. La tercera parte comprende la síntesis por relevo de la 3 β -*O*-acetil-11 α ,12 α -epoxi-oleanan-28,13 β -ólida (**90**) a partir de ácido oleanólico (**89**) y la evaluación de la actividad antioxidante de la lactona triterpénica y la 3-aril-6-prenilcumarina (**98**) en ratas tratadas con estreptozotocina.

6.1. PRIMERA PARTE

6.1.1. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos crudos.

La evaluación de la actividad antioxidante (contra el daño causado por el HAAP, un inductor de la formación de radicales peroxilo, sobre homogenado pancreático y la capacidad reductora del radical DFPH), a concentraciones de 1, 10 y 100 ppm, permitió ponderar la bioactividad de los extractos de CH₂Cl₂ y MeOH obtenidos de las diversas partes de las especies selectas, mientras que los extractos con *n*-hexano no mostraron actividad. Se empleó quercetina y α -tocoferol como referencias. Los resultados se muestran en la tabla 5.

El tratamiento del homogenado pancreático (10 mg proteína /ml) con HAAP (135 mM) por 2 h a 37 °C produjo un incremento significativo ($p < 0.001$) de los niveles de malondialdehído (MDA) pancreático (0.42 ± 0.03 nmol MDA mg proteína⁻¹) con respecto al grupo sin tratamiento (0.02 ± 0.01 nmol MDA mg proteína⁻¹) sugiriendo un daño oxidativo celular. El HAAP es un compuesto azo soluble en agua que ha sido utilizado como un generador de radicales peroxilo en sistemas acuosos para el estudio y caracterización de diversos antioxidantes [142-143]. El HAAP se descompone térmicamente a 37 °C formando dos radicales sobre carbono, que se combinan

con el oxígeno molecular obteniendo dos radicales peroxilo. La alta concentración de radicales conduce a un estrés oxidativo en el homogenado pancreático e induce la peroxidación lipídica celular (figura 10) [144].

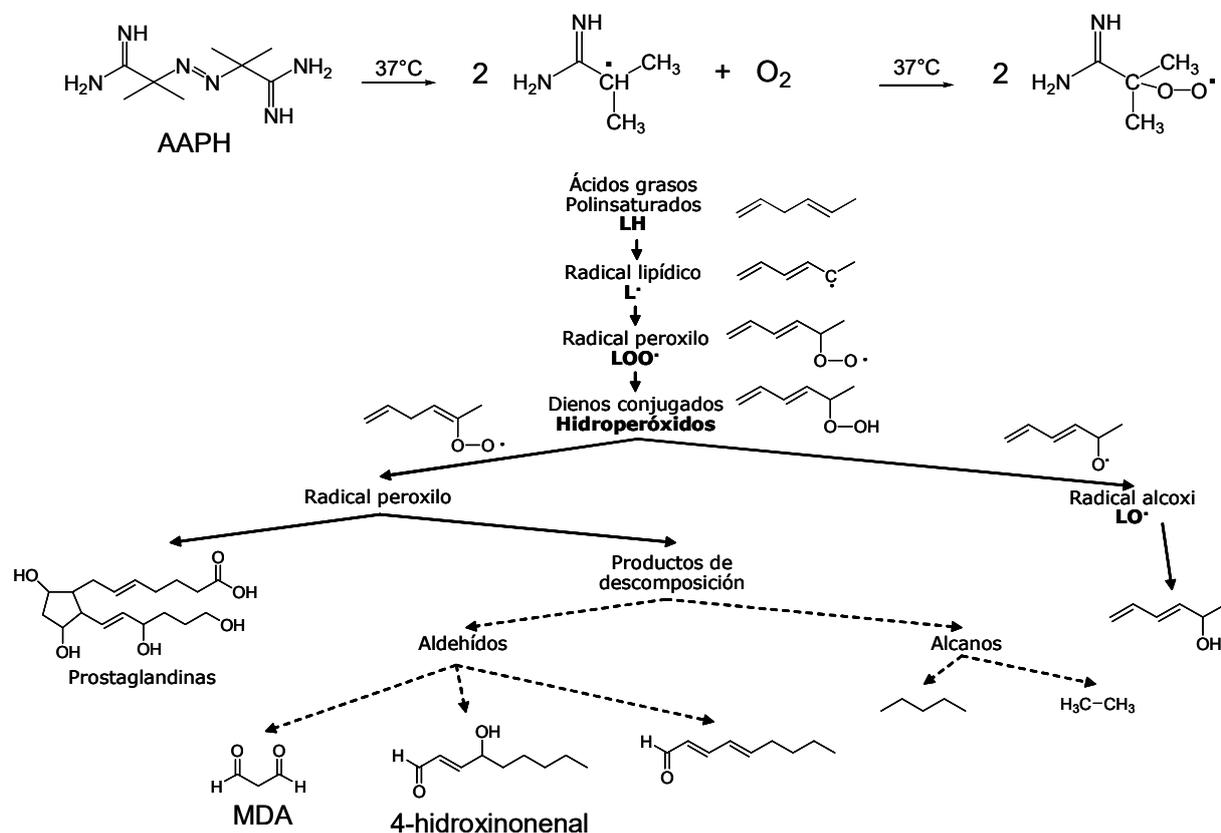


Figura 10. Peroxidación de lípidos inducida por el HAAP.

El incremento observado de SRATB (MDA, 4-hidroxinonal, entre otros) después del tratamiento del homogenado pancreático con HAAP confirma el persistente estado de estrés oxidativo. El tratamiento simultáneo del homogenado y el inductor con los extractos redujo significativamente los niveles de MDA inducido por el HAAP. Los extractos metanólicos de *E. subcoriacea* (CE_{50} hojas = 26.2 ± 5.8 ; CE_{50} ramas = 20.8 ± 4.7 ; CE_{50} corteza = 22.2 ± 3.7 ppm), *E. platycarpa* (CE_{50} hojas = 28.3 ± 3.8 ; CE_{50} ramas = 27.8 ± 5.1 ; CE_{50} corteza = 21.6 ± 2.9 ppm), *S. occidentalis* (CE_{50} parte aérea = 35.7 ± 3.3 ppm), *S. obtusifolia* (CE_{50} raíz = 45.7 ± 5.6 ppm) y *E. punctata* (CE_{50} ramas = 56.7 ± 7.3 ppm) mostraron mayor actividad en comparación con los otros extractos.

Tabla 5. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de las especies seleccionadas.

Especie vegetal	Parte usada	AOA (CE ₅₀) ^a		DFPH (CE ₅₀) ^b	
		CH ₂ Cl ₂	MeOH	CH ₂ Cl ₂	MeOH
<i>E. platycarpa</i>	Hojas	n.d.	28.3 ± 3.8	n.d.	102.3 ± 3.4
	Ramas	n.d.	27.8 ± 5.1	n.d.	79.6 ± 3.5
	Corteza	n.d.	21.6 ± 2.9	n.d.	21.2 ± 0.1
<i>E. punctata</i>	Hojas	>100	86.4 ± 11.2	690.2 ± 8.7	94.6 ± 4.8
	Ramas	88.6 ± 6.9	56.7 ± 7.3	476.7 ± 6.8	55.1 ± 6.1
<i>E. subcoriacea</i>	Hojas	>100	26.2 ± 5.8	>1000	43.5 ± 0.5
	Ramas	58.3 ± 7.7	20.8 ± 4.7	113.5 ± 2.8	39.8 ± 0.5
	Corteza	26.9 ± 4.9	22.2 ± 3.7	96.5 ± 4.6	9.2 ± 0.1
<i>S. hirsuta</i>	Parte aérea	>100	*IP	>1000	92.6 ± 5.3
<i>S. obtusifolia</i>	Parte aérea	>100	75.5 ± 5.4	303.1 ± 2.7	77.2 ± 9.1
	Raíz	>100	45.7 ± 5.6	78.3 ± 4.1	42.9 ± 2.8
<i>S. occidentalis</i>	Parte aérea	85.7 ± 4.4	35.7 ± 3.3	167.3 ± 8.2	62.3 ± 9.5
<i>S. uniflora</i>	Parte aérea	>100	>100	300.1 ± 12.2	79.2 ± 7.4
	Raíz	>100	>100	150.9 ± 4.7	66.9 ± 5.9

CE₅₀ = Concentración efectiva para la reducción al 50 % de la ^a peroxidación en el homogenado pancreático y ^b del radical DFPH dada en ppm y representada por la media de tres experimentos ± error estándar. Quercetina (CE₅₀): AOA = 18.1 ± 2.1 μM, DFPH = 14.3 ± 1.1 μM, n.d.: no determinado. Control sin tratamiento = 0.02 ± 0.01 nmol MDA mg proteína⁻¹; *IP: incremento de MDA (0.55 ± 1.1 nmol MDA mg proteína⁻¹).

Así mismo, los extractos de CH₂Cl₂ de *E. subcoriacea* (CE_{50 corteza} = 26.9 ± 4.9 y CE_{50 ramas} = 58.3 ± 7.7 ppm), *S. occidentalis* (CE_{50 parte aérea} = 85.7 ± 4.4 ppm) *E. punctata* (CE_{50 ramas} = 88.6 ± 6.9 ppm), y de *n*-hexano de la corteza de *E. subcoriacea* (CI₅₀ = 80.4 ± 5.9 ppm) desplegaron actividad inhibitoria significativa. También, estos extractos mostraron actividad reductora del radical DFPH, sugiriendo que la inhibición de peroxidación de lípidos en el homogenado pancreático está relacionada con la inhibición de los radicales formados a partir del HAAP durante la iniciación de la peroxidación.

Por otro lado, los extractos metanólicos de *S. hirsuta* y *S. uniflora* mostraron actividad frente al radical DFPH pero no actividad antiperoxidativa (tabla 5). Adicionalmente, el extracto metanólico de las partes aéreas de *S. hirsuta* no inhibieron la peroxidación a 31 y 100 ppm; sin embargo, a 310 ppm produjo un incremento de los niveles de MDA (0.55 nmol MDA mg proteína⁻¹), es decir incrementaron la peroxidación, lo que sugiere un efecto prooxidante del extracto. El efecto prooxidante ha sido observado para diversos compuestos fenólicos como la quercetina y la emodina [145, 146]. Esta clase de compuestos ha mostrado inhibir el proceso de peroxidación de lípidos, relacionado principalmente a su capacidad de reducir radicales como O₂^{•-} y ROO[•]. Sin embargo, durante el proceso de inhibición se forma un segundo radical a partir del compuesto fenólico, el cual, al acumularse, induce la peroxidación por diversos procesos metabólicos produciendo muerte celular. Esta propiedad podría sugerir un efecto tóxico de esta especie.

6.1.2. Evaluación de la actividad hipoglucemiante de *E. platycarpa*

La actividad hipoglucemiante de los extractos metanólicos de las hojas (HEP), ramas (REP) y corteza (CEP) de *E. platycarpa* se evaluó en ratas normales y diabetizadas con estreptozotocina. La figura 11 muestra el efecto de HEP y REP, a las dosis de 30, 100 and 300 mg/kg, sobre la variación de los niveles de glucosa en ratas normales con respecto al tiempo. CEP no mostró actividad hipoglucemiante.

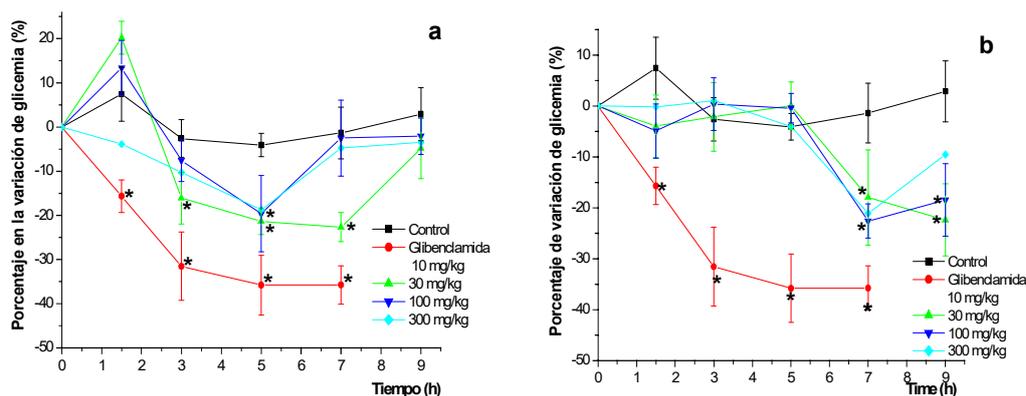


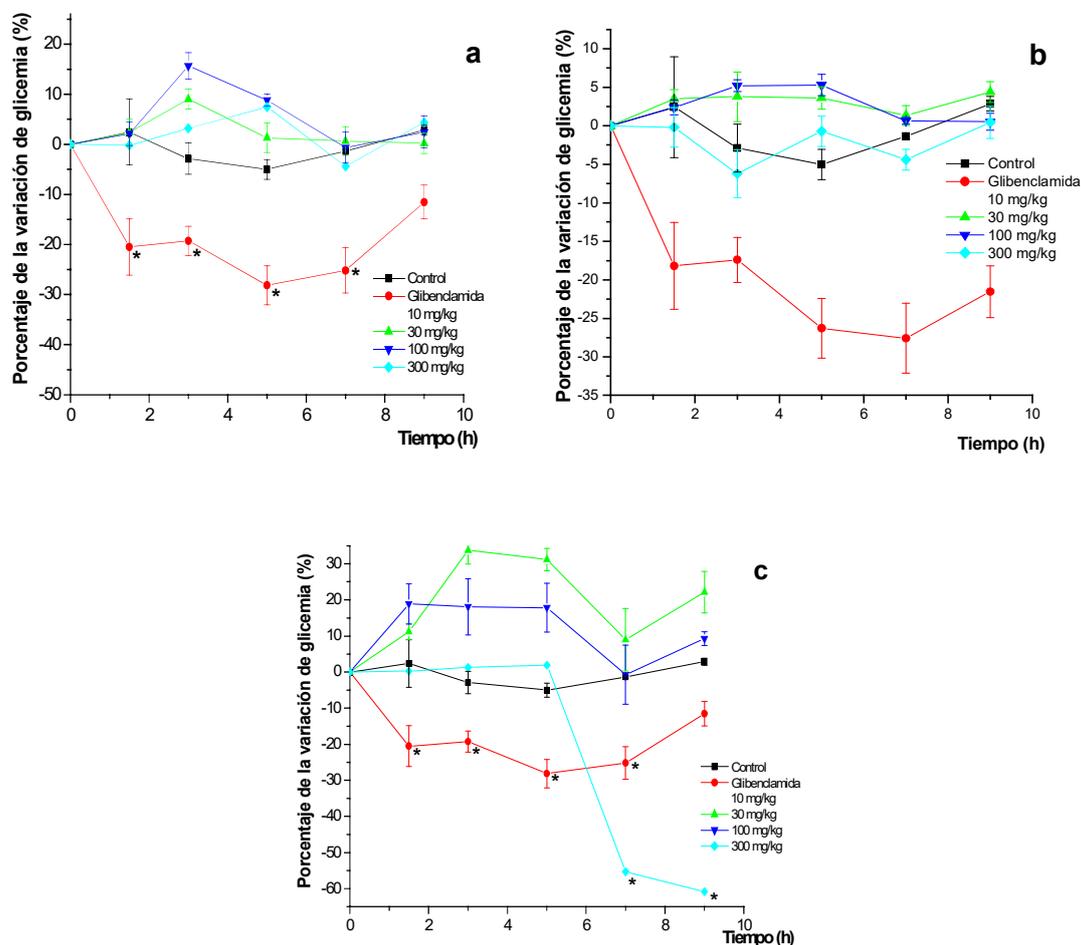
Figura 11.

Efecto agudo de HEP (a) and REP (b) en ratas normales. Los valores son expresados como la media del porcentaje de variación \pm el error estándar; n= 5 en triplicado para cada grupo; *estadísticamente significativo $p < 0.05$.

La administración de HEP a ratas normales ocasionó un incremento significativo de los niveles de glucosa sanguínea a todas las dosis estudiadas (figura 1a), el efecto se mantuvo hasta 90 min después de la administración. Este incremento ha sido observado con diversos extractos vegetales [147-148] y puede atribuirse a un incremento de la glucólisis anaeróbica y la disminución de la gluconeogenesis, debido al incremento del estrés de los animales durante su manejo. Sin embargo, a la dosis más alta no se observó este incremento, sugiriendo un efecto hipoglucémico a esta dosis. La dosis de 30 mg/kg HEP desplegó una disminución significativa de los niveles de glucosa a 3 h ($-16.1 \pm 5.8\%$), 5 h ($-21.4 \pm 2.9\%$) y 7 h ($-22.7 \pm 3.3\%$). El máximo efecto hipoglucémico para las dosis de 100 y 300 mg/kg fue registrado 5 h después de la administración ($-22.6 \pm 3.4\%$ and $-21.1 \pm 3.1\%$, respectivamente). El máximo efecto mostrado por todas las dosis a las 5 h probablemente es debido a un efecto de saturación para las dosis de 100 y 300 mg/kg. Por lo tanto, el mejor efecto se observa con la dosis de 30 mg/kg, el cual se mantuvo hasta 7 h. Después de este tiempo, a las 9 h, los animales recuperaron el nivel inicial de de glucemia en todas las dosis. Por otro lado, el REP (Fig. 1b) no produjo efecto en la variación de glucosa en las primeras 5 h después de la administración de todas las dosis. Después de este tiempo, se observó una disminución significativa de tres dosis probadas, la cual se mantuvo para las dosis de 30 y 100 mg/kg hasta 9 h. Este efecto sugiere que REP ejerce un mecanismo de acción extrapancreático debido a que muestra un perfil de acción antihiperoglucémico diferente al control (glibenclamida).

La administración de STZ (60 mg/kg) a ratas normales incrementó significativamente los niveles de glucosa 5 días después de la administración (20.4 ± 2.4 mM), comparado con el grupo control (6.2 ± 1.6 mM). La figura 12 muestra el efecto de HEP, CEP y REP en la variación de glucosa de las ratas diabéticas. La administración de HEP y CEP a este grupo no provocó efecto significativo en los niveles de glucosa (Figura 12 a y b). Estos resultados sugieren que la insulina es necesaria para el efecto hipoglucémico de HEP, ya que mostró efecto en ratas normales pero no en diabéticas. Por otro lado, la administración de REP en todas las dosis, mostró un incremento significativo en los niveles de glucosa, el cual se mantuvo hasta 5 h después de la administración. Este incremento fue revertido con las 3 dosis a las 7 horas. Únicamente la dosis de 300 mg/kg provocó una disminución significativa de los niveles de glucosa a este tiempo ($-55.3 \pm 3.8\%$) el cual se mantuvo hasta 9 h ($-60.8 \pm 4.5\%$) después del tratamiento. Estos resultados sugieren que REP produce un efecto extrapancreático, posiblemente en la inhibición

de enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos [149] y/o estimulando el aprovechamiento de la glucosa por diversos tejidos [150].



6.2 SEGUNDA PARTE

A continuación se describirá la elucidación estructural de los metabolitos secundarios aislados de las hojas, ramas y corteza de *E. platycarpa* y *E. subcoriacea*.

6.2.1. Estudio químico de *E. platycarpa*

El estudio químico de las ramas de *E. platycarpa* permitió el aislamiento de la nueva flavona (1''*R*)-5,4',1''-trihidroxi-6,7-(3'',3''-dimetilcroman)-flavona (**80**) junto con los compuestos conocidos 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (**81**), 5,7-dihidroxi-8-prenilflavanona (**82**), 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**83**), 5,7-dihydroxy-8-metil-6-prenilflavanona (**84**), ácido 3 β -*O*-acetiloleanólico (**88**) ácido oleanólico (**89**), 3 β -*O*-acetil-11 α ,12 α -epoxi-oleanan-28,13 β -ólida (**90**), lupeol (**91**), ácido betulínico (**92**), β -sitosterol (**93**), β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**94**), palmitato de β -sitosterilo (**95**), sacarosa (**96**) y 3-*O*-metil-*myo*-inositol (**97**). La nueva flavanona, la (2*S*)-4'-*O*-metil-6-metil-8-prenilnaringenina (**85**), así como los compuestos conocidos **82**, **83**, **84**, 4'-*O*-metil-8-prenilnaringenina (**86**) y 5-hidroxi-7-metoxi-8-prenilflavanona (**87**) fueron aislados de las hojas (figura 13).

La identificación de algunos compuestos conocidos se efectuó mediante la comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con las reportadas en la literatura. La elucidación de la estructura molecular de la nueva flavanona y de algunos compuestos conocidos, se efectuó con base al análisis detallado de sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas, el cual se describe a continuación.

El compuesto **80** fue obtenido como un sólido amarillo amorfo (0.009%), pf. 252-254 °C; que al ser analizado por cromatografía en capa fina (CCF) y revelar con FeCl₃ en etanol, presentó la coloración café característica que sugiere la presencia de un hidrógeno quelatado, y el cual se corroboró al observar en su espectro de IR bandas en ν_{\max} 1669 y 1618 cm⁻¹ de carbonilo formando puente de hidrógeno con un hidroxilo (ν_{\max} 3358 cm⁻¹) (espectro 1). Su fórmula molecular C₂₀H₁₈O₆ se dedujo con base en el ion molecular [M⁺] en *m/z* 354. Los datos de sus espectros de EM IE, RMN ¹³C y ¹³C DEPT permiten deducir que el esqueleto base corresponde al de una flavona con sustituyente adicional.

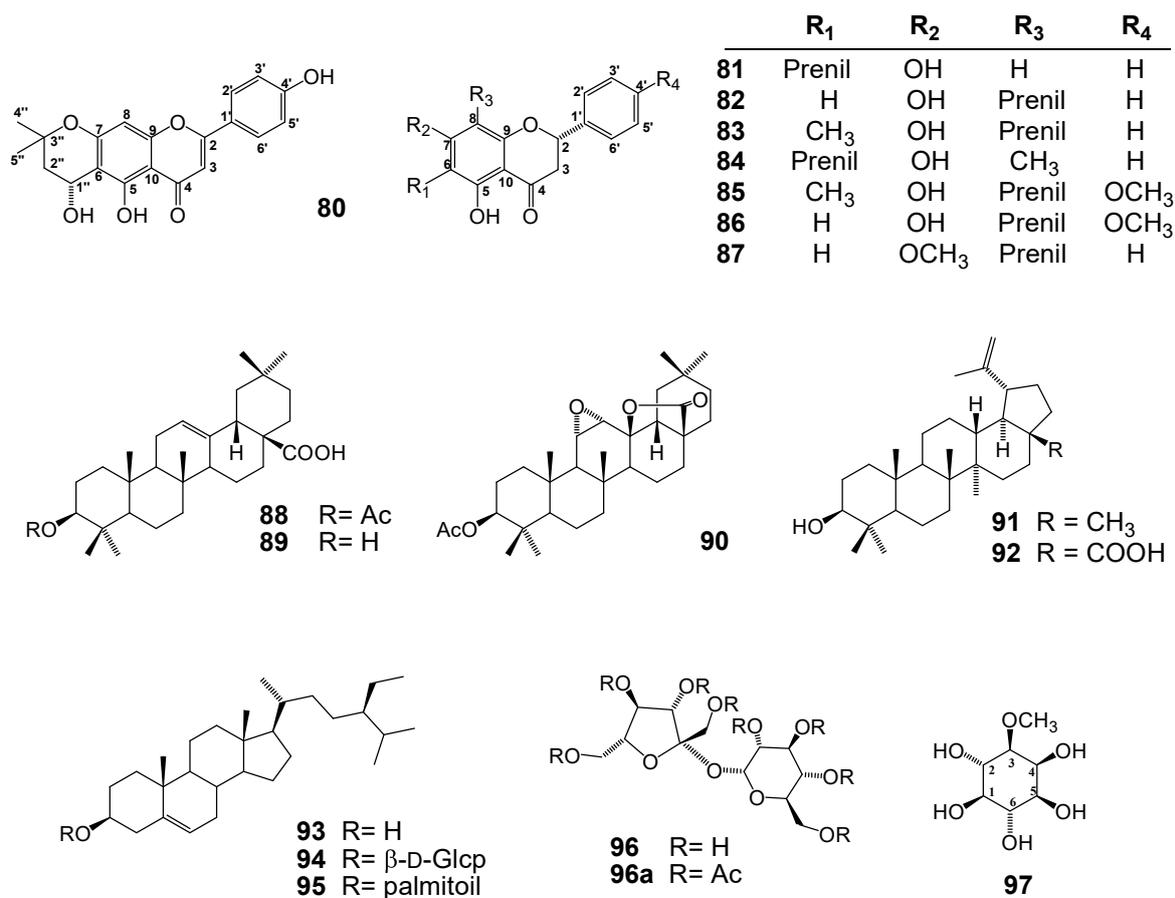


Figura 13. Compuestos aislados de *E. platycarpa*.

En el espectro de RMN ¹H (espectro 2) se observa un singulete en δ 13.18 (*s*, 1 H), que se asignó al hidrógeno del hidroxilo quelatado de la posición 5 de la flavona; dos singuletes en δ 6.78 and δ 6.58 asignados a H-3 y H-8 o H-6 del esqueleto de la flavona [139]. En la región aromática, se reconoce el trazo correspondiente a un sistema AA' BB' del anillo B de la flavona [*dd*, δ 7.91 (*dd*, *J* = 9 y 2 Hz, 2H) y *dd*, δ 6.91 (*J* = 9 y 2 Hz, 2H)] correspondiente a H-2', H-6' y H-3', H-5' respectivamente, el cual se corroboró por las señales a δ_C 128.4 y 115.9 observadas en el espectro de RMN ¹³C (espectro 3), asignadas a C-2', C-6' y C-3', C-5' del anillo B.

La presencia de un oximetino [δ_C 91.4 (*d*)], un metileno [δ_C 25.9 (*t*)], dos metilos geminales [δ_C 25.7 (*q*) y δ_C 24.8 (*q*)], un carbono cuaternario a δ_C 70.0, así como las resonancias a δ_H 3.04 (*d*, *J* = 8.7, 2H) y 4.73 (*t*, *J* = 8.7, 1H) establecieron el fragmento de hidroxidimetildihidropirano (Figura 14).

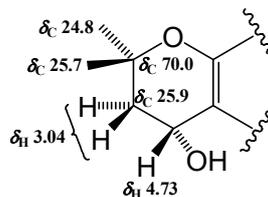


Figura 14. Desplazamientos químicos del anillo de hidroximetildihidropirano presente en **80**.

Al comparar los datos de ^{13}C informados para una estructura análoga (Dinklagina B, tabla 6), donde el hidroxilo se ubica en C-2" [151], el desplazamiento del oximetino resuena en δ 68.4 (cuando está unido directamente a dos carbonos sp^3). Así, el oximetino al estar unido directamente al anillo A de la flavona, resuena δ 91.4 ($\Delta\delta$ -22 ppm).

La estructura de **80** fue confirmada por las interacciones observadas en los experimentos NOESY y HMBC (figura 15). En particular, las interacciones NOESY de H-1" con H-2"a, H-2"b, y con el hidrógeno quelatado del hidroxilo en C-5; así como, las correlaciones HMBC 2J y 3J de H-1" con C-6 y C-5 respectivamente, confirman las asignaciones espectroscópicas.

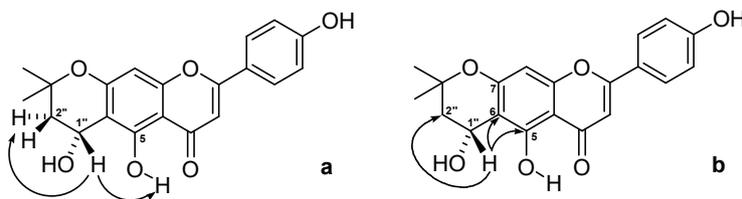


Figura 15. Interacciones NOESY (a) y HMBC (b) relevantes para **80**.

Tabla 6. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H para **80** y Dinklagina B.

Carbano	80		Dinklagina B	
	δ_{C}^a	$\delta_{\text{H}} (J \text{ en Hz})^b$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}} (J \text{ en Hz})$
2	166.1		164.6	
3	102.8	6.78 (s)	103.3	6.65 (s)
4	181.9		182.7	
5	157.2		159.8	
6	109.0		104.5	
7	163.7		161.2	
8	88.8	6.58 (s)	94.9	6.48 (s)
9	155.6		156.0	
10	104.6		104.4	
1'	121.1		131.0	
2'	128.4	7.91 (dd, 2.0, 9.0)	128.8	7.95 (dd, 2.0, 9.0)
3'	115.9	6.91 (dd, 2.0, 9.0)	116.4	7.03 (dd, 2.0, 9.0)
4'	161.2		159.9	
5'	115.9	6.91 (dd, 2.0, 9.0)	116.4	7.03 (dd, 2.0, 9.0)
6'	128.4	7.91 (dd, 2.0, 9.0)	128.8	7.95 (dd, 2.0, 9.0)
1''	91.4	4.73 (t, 8.7)	20.7	2.62 (dd, 7.3, 17.0) 2.96 (dd, 5.2, 17.0)
2''	25.9	3.04 (d, 8.7)	68.4	3.88 (brt, 6.5)
3''	70.0		79.2	
4''	25.7	1.13 (s)	25.5	1.34 (s)
5''	24.8	1.14 (s)	25.3	1.41 (s)
OH-5		13.2 (s)		13.4 (s)
OH-1''		4.73 (s)		4.40 (s)

Diklagina B (CD_3CO) en ^{13}C (75 MHz)^a y ^1H (300 MHz)^b

La configuración (*R*) en C-1" fue establecida de acuerdo al método de Mosher [133]. Muestras separadas de **80** fueron tratadas con el cloruro del (*R*)-(+)- y (*S*)-(-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacetilo (MTPACl) en Py-*d*₅ anhidra, para obtener los ésteres (*S*)- y (*R*)-MTPA (**80a** y **80b**, respectivamente). La diferencia en los desplazamientos químicos del éster (*R*)-MTPA con respecto al éster (*S*)-MTPA [$\Delta\delta = \delta(S)\text{-MTPA} - \delta(R)\text{-MTPA}$], para H-2"a (-0.47 ppm) y H-2"b (-0.53 ppm) es indicativo de que C-1" posee la configuración *R* (figura 16).

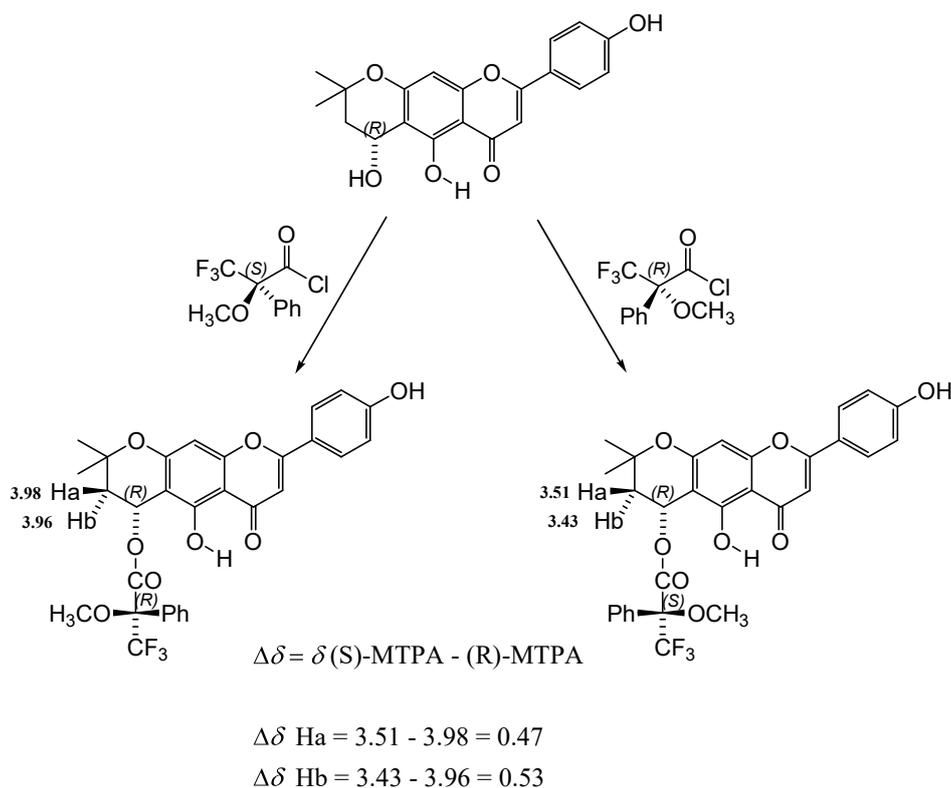
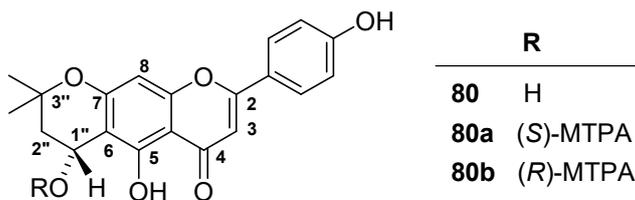


Figura 16. Determinación de la configuración absoluta de **80**

Por lo tanto, la estructura del nuevo compuesto **80** se confirma como (1"R) 5,4'1"-trihidroxi-6,7-(3",3"-dimetilcroman)-flavona.



El compuesto **81**, se obtuvo como sólido amarillo cristalino (0.003%) de pf. 214-216 °C. De acuerdo a los datos obtenidos de sus espectros de RMN ^1H (espectro 5), RMN ^{13}C (espectro 6), ^{13}C DEPT, EM-FAB $^+$ (espectro 7), se asignó una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$. En el espectro de RMN ^1H en la modalidad COSY se observan señales atribuibles a un sistema ABX, una señal en δ 5.38 (*dd*, $J = 13$ y 3 Hz, 1H), acoplándose con las señales en δ 3.37 (*dd*, $J = 17$ y 13 Hz, 1H) y δ 2.76 (*dd*, $J = 17$ y 3 Hz, 1H) correspondientes al protón bencílico H-2, a H-3b y H-3a respectivamente, estableciendo que el esqueleto base es de una flavanona [141]. El doble amplio en δ 3.22 ($J = 7$ Hz, 2H, H-1'') acoplado a la señal en δ 5.20 (*tc*, $J = 7$ y 1.5 Hz, 1H, H-2'') y el doble en δ 1.67 ($J = 1.5$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-C-4''}$) y la señal en δ 1.77 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-C-5''}$) indican la presencia de un grupo dimetilalilo. La unión a C-6 se establece de acuerdo a las interacciones observadas en el experimento NOESY de los protones en C-1'' y los hidroxilos en C-5 y C-7 (figura 17). En la región de los hidrógenos aromáticos, entre 7.3 y 7.5 ppm, se encuentra una señal múltiple que integra para los cinco hidrógenos correspondientes al anillo B de la flavanona.

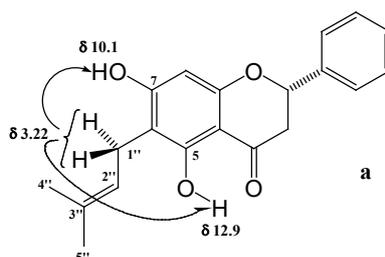


Figura 17. Interacciones NOESY relevantes de **81**.

El patrón de fragmentación observado en el experimento FAB $^+$, 325 $[\text{M}+1]^+$, 324, 269 (100), 165 (50), 154 (95), 136 (71), permitió corroborar la posición del grupo prenilo. Los iones en m/z 269 y 165 se forman por la pérdida de un fragmento neutral C_4H_8 del ión $[\text{M}+1]^+$ en m/z 325 y por la ruptura retro Diels-Alder del fragmento en m/z 269, respectivamente (figura 18, espectro 7). El fragmento en m/z 269 es de mayor abundancia (100 %) cuando el grupo prenilo se localiza en la posición 6, ya que puede ser formado con el OH en C-7 y con el de C-5, mientras que cuando se localiza en C-8, como en el caso de la glabranina (**82**) aislada de la corteza, la abundancia relativa del pico en m/z 269 es de 24% (espectro 9) [152].

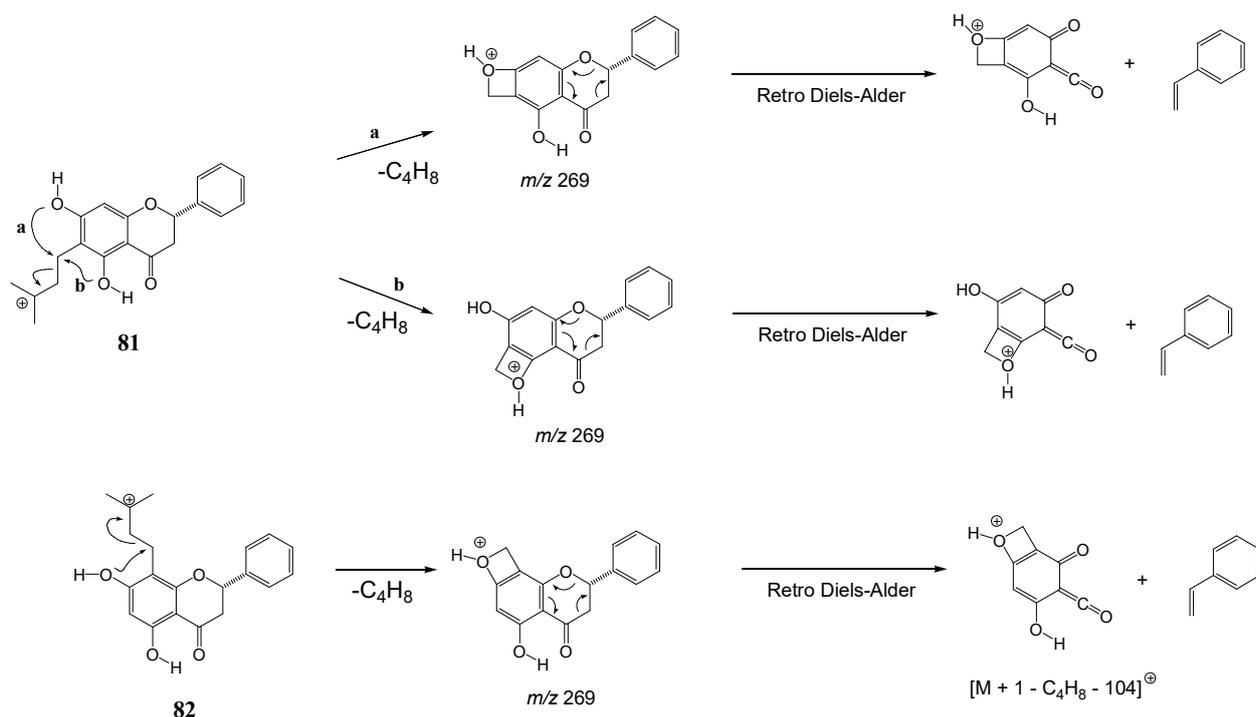


Figura 18. Fragmentaciones propuestas para **81** y **82**.

Por lo tanto, la estructura del compuesto **81** corresponde a la 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona, cuyas características físicas y propiedades espectroscópicas son idénticas con las informadas para esta sustancia [129].

Al compuesto **83**, obtenido como un sólido amarillo (0.0032 %) de pf. 174-177 °C, se le asignó la fórmula molecular $C_{21}H_{22}O_4$, de acuerdo al $[M+1]^+$ observado en el espectro de masas (FAB⁺, espectro 12). Su espectro de RMN ¹H (espectro 11) muestra la misma multiplicidad de señales a campo alto presentada por la sustancia **81**. Se observa un trazo correspondiente a un sistema ABX [δ 5.40 (1H, *dd*, $J = 12.9, 3.3$ Hz), 3.04 (1H, *dd*, $J = 17.1, 12.9$ Hz) y 2.85 (1H, *d*, $J = 17.1, 3.3$ Hz)] característico de los protones en C-2 y C-3 de la flavanona. Asimismo, un sistema A₂B [δ 3.39 (2H, *d*, $J = 7.2$ Hz, H-1'') y 5.25 (1H, *tc*, $J = 7.3, 2.7, 1.5$ Hz, H-2'')], y dos señales simples [δ 1.84 (3H, *s*, CH₃-4''), 1.77 (3H, *s*, CH₃-5'')]; correspondientes a dos metilos indican la presencia de un grupo de un grupo prenilo. De manera adicional, se observa una señal simple en δ 2.04 (3H) de un metilo unido a un anillo aromático. Los grupos prenilo y metilo fueron unidos en C-8 y en C-6 respectivamente, de acuerdo a las interacciones presentadas en el experimento NOESY. El pico observado en el experimento FAB⁺ a m/z 283 (40) de la pérdida del

fragmento C_4H_8 confirma la ubicación del grupo prenilo en C-8 (figura 19, espectro 12), por lo que la sustancia en cuestión fue caracterizada como la 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**83**), aislada previamente de *Mallotus philippensis* [126].

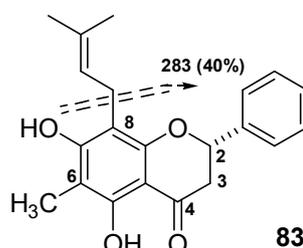
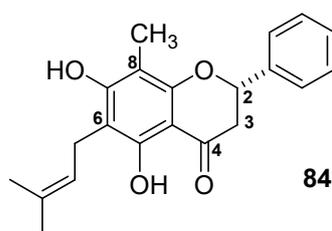


Figura 19. Fragmentaciones propuestas para **83**.

El compuesto **84**, aislado como un sólido amarillo cristalino (5×10^{-4} %) de pf. 210-211°C, mostró en sus espectros de RMN 1H y ^{13}C una multiplicidad igual a la presentada por el compuesto **83** (ver parte experimental), indicando que se trataba de una metil-prenilflavanona regioisomérica. En su EM-FAB⁺ muestra la fragmentación característica, $[M+1]^+$ 339 (90), 338 (100), $([M+H]^+ - C_4H_8)$ 283 (100), de una flavanona sustituida con un grupo prenilo en C-6. Por lo tanto, la sustancia en cuestión corresponde a la 5,7-dihidroxi-8-metil-6-prenilflavanona (**84**) [127].



El compuesto **85**, ópticamente activo ($[\alpha]_D^{25} -40$ (c 0.1, $CHCl_3$)), fue obtenido como un sólido amarillo. La fórmula molecular $C_{22}H_{24}O_5$ se dedujo del análisis de los experimentos EM-FAB⁺, RMN ^{13}C y ^{13}C DEPT. El espectro de IR (espectro 13) y RMN 1H (espectro 14) y ^{13}C (espectro 15) registraron señales esperadas para una metil-prenilflavanona con un grupo *p*-metoxilo en el anillo B. El grupo prenilo se colocó en C-8 de acuerdo a la correlación HMBC 2J observada entre H-1" a y H-1" b [δ 3.31 (*d*, $J = 7.2$ Hz, 2H) con C-8 (figura 20). Por lo tanto, el grupo metilo (δ_H 1.94; δ_C 7.6) se encuentra unido a C-6 ya que se observa la correlación entre los hidrógenos del metilo con C-6 y C-5.

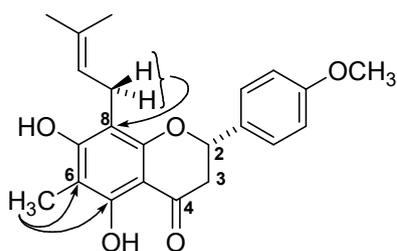


Figura 20. Correlación HMBC selectas de **85**.

La configuración absoluta en C-2 fue establecida como *S*, de acuerdo al efecto Cotton positivo observado en 344 nm (θ +2.91) y al efecto Cotton negativo en 292 nm (θ -17.97), en su espectro de dicroísmo circular (figura 21) [153]. Por lo tanto, la estructura del nuevo compuesto **85** fue establecida como (2*S*)-4'-*O*-metil-6-metil-8-prenilnaringenina. Previamente había sido aislado el 4'-*O*-desmetil derivado de *E. texana* [92].

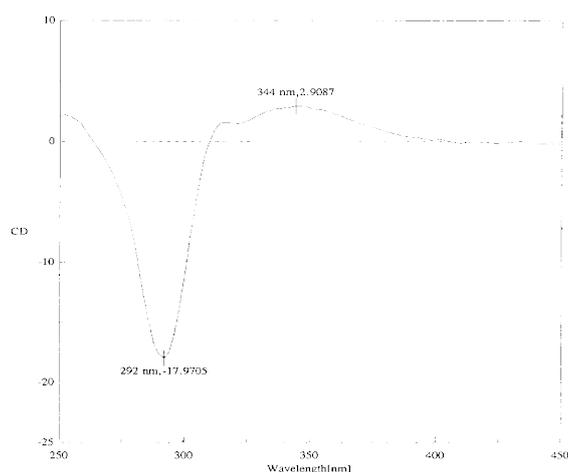


Figura 21. Dicroísmo circular de **85**.

Los compuestos **86** y **87** aislados de las hojas fueron caracterizados mediante los procedimientos convencionales y sus estructuras confirmadas por comparación directa con los datos informados en la literatura [129, 134].

El compuesto **88** se obtuvo como un sólido blanco cristalino (1.01% respecto a material vegetal seco) de pf. 214-215 °C. En su espectro de IR (espectro 16) se observan bandas ν_{\max} correspondientes a los grupos carbonilo (1722 cm^{-1} y 1695 cm^{-1}) de éster (1250 cm^{-1}) y de ácido carboxílico (3514 cm^{-1}). En el espectro de RMN ^1H (espectro 17) se observan señales

características asignables a un triterpeno pentacíclico. Una señal en δ 5.24 (*t*, $J = 4.0$ Hz, 1 H) correspondiente al protón vinílico H-12, otra señal en δ 4.49 (*dd*, $J = 7.5$ y 9, 1H) atribuible a un protón axial geminal a un acetato, asignada al protón H-3. En δ 2.82 (*dd*, $J = 4.5$ y 14 Hz, 1H) aparece la señal del protón alílico de la posición 18 del triterpeno. En el espectro de masas se observa un ión molecular de m/z 498, correspondiente a la fórmula $C_{32}H_{50}O_4$ y un pico base de m/z 248 (espectro 18), característicos de los triterpenos con insaturación en Δ^{12} (figura 22), formado a partir de una fragmentación retro Diels-Alder del anillo C [154].

Los datos descritos establecen el esqueleto de oleanano y mediante la comparación de los datos obtenidos con los informados en la literatura se concluyó que la sustancia en cuestión es el ácido 3 β -*O*-acetiloleanólico (**88**) [130].

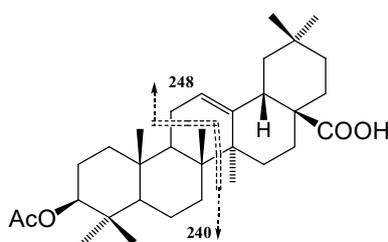
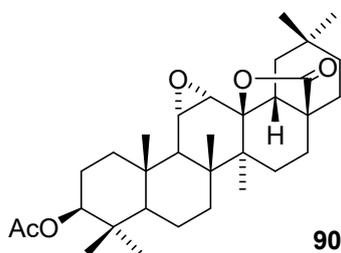


Figura 22. Principal fragmentación de triterpenos con insaturación en Δ^{12} .

El compuesto **90** se obtuvo como un sólido blanco cristalino (0.0082%), en cuyo espectro de IR (espectro 19) aparecen bandas de carbonilo (ν_{\max} 1719 cm^{-1}), epóxido (ν_{\max} 868 cm^{-1}), y una banda intensa en 1755 cm^{-1} , que indica la presencia de una γ -lactona [128]. El espectro de RMN ^1H (espectro 20) presenta las señales características de un triterpeno con esqueleto de oleanano. A campo alto se observan siete señales simples (21H) de metilos unidos a carbonos cuaternarios, una señal doble de doble en δ 4.05 ($J = 11$ y 5.5 Hz, 1H) correspondiente a un protón geminal a un acetato, asignada al protón axial H-3; dos señales en δ 3.02 (*dd*, $J = 5.4$ y 2.4 Hz, 1H) y δ 3.0 (*d*, $J = 2.4$ Hz, 1H) de hidrógenos geminales a oxígeno, las cuales muestran acoplamiento entre sí y que fueron asignados a los protones 11 y 12 respectivamente. Por otro lado, el patrón de fragmentación observado en el espectro de masas (IE, espectro 21) (512, M^+ ; 277, 263, 248, 217, 205, 204 (100), 203, 189 y 175) presentó una notable semejanza con los espectros descritos para diversas epoxi- γ -lactonas triterpénicas de estructuras relacionadas (espectro 20) [155]. Las

características físicas y propiedades espectroscópicas de esta sustancia son idénticas con las informadas anteriormente para la 3 β -O-acetil-11 α ,12 α -epoxi-oleanan-28,13 β -ólida [128].



6.2.2. Estudio químico de *E. subcoriacea*

El estudio químico se efectuó con base a la actividad antioxidante, empleando quercetina ($CI_{50} = 16.6 \pm 3.5 \mu M$) y *tert*-butilhidroxitolueno (BHT, $CI_{50} = 17.3 \pm 1.8 \mu M$) como referencias de sustancias bioactivas.

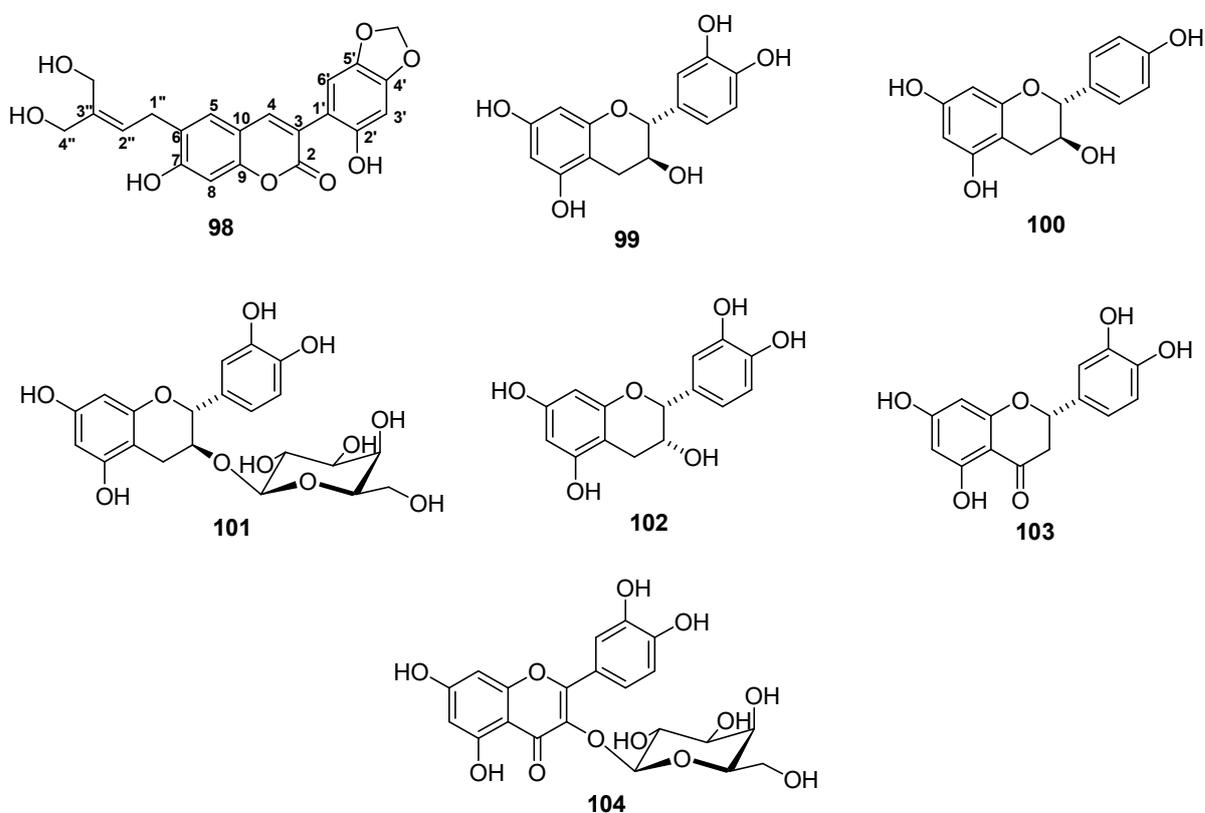


Figura 23. Compuestos aislados de *E. subcoriacea*.

El análisis químico biodirigido del extracto metanólico de la corteza permitió el aislamiento del nuevo producto natural 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxfenil)-6-(3"-hidroximetil-4"-hidroxibut-2"-enil)-7-hidroxycumarina, denominado trivialmente subcoriacina (**98**), junto con los compuestos conocidos catequina (**99**), (+)-afzelequina (**100**) y (+)-3-*O*-β-D-galactopiranosido de (+)-catequina (**101**) como constituyentes bioactivos, así como los compuestos conocidos inactivos **83-84**, **88-89**, **91-92** y **98** (figura 23).

El fraccionamiento del extracto metanólico de las ramas permitió la obtención de los constituyentes bioactivos **98**, **101**, (-)-epicatequina (**102**), eriodictiol (**103**), así como el aislamiento de **88**, **92** y **98**. El compuesto bioactivo 3-*O*-β-D-galactopiranosido de quercetina (**104**) fue obtenido mediante el análisis del extracto metanólico de las hojas junto con **101**.

La identificación de los compuestos conocidos se efectuó al comparar sus propiedades físicas y espectroscópicas con las reportadas en literatura, y en algunos casos, al comparar por CCF con muestras auténticas obtenidas previamente en nuestro laboratorio. El análisis detallado de las propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas del nuevo compuesto permitió establecer la estructura **98** y el cual se describe a continuación.

El compuesto **98** se obtuvo como un sólido amarillo (1.2 % respecto a material vegetal seco) pf. 230-235 °C (CH₂Cl₂:MeOH) y se le asignó la fórmula molecular C₂₁H₁₈O₈ de acuerdo al pico observado a *m/z* 399.1078 en su espectro de masas (FAB⁺) de alta resolución. Su espectro de IR (espectro 22) mostró bandas atribuibles a los grupos hidroxilo (3387 cm⁻¹), lactona (1693 cm⁻¹) y aromáticos (1615 cm⁻¹). Los máximos de absorción mostrados en su espectro de UV (λ_{max} 348, 270 y 210 nm, espectro 23) sugieren que **98** posee el esqueleto base de una 3-arilcumarina [156]. En la región aromática de su espectro de RMN ¹H (tabla 9, espectro 24) se aprecian tres señales simples (1H cada una) [δ 7.82, 7.36 y 6.73] correspondientes a H-4, H-5 y H-8 respectivamente (fragmento A), las cuales se asignaron de acuerdo con sus formas resonantes que se muestran en la figura 15. Estas asignaciones sugieren que la 3-arilcumarina se encuentra 6,7-disustituida [157]. Adicionalmente, se observan tres singuletes en δ 5.88 (2H), 6.45 (1H) y 6.76 (1H) correspondientes a un grupo dioximetileno y dos protones aromáticos asignados a H-3' y H-6' del grupo arilo (figura 24).

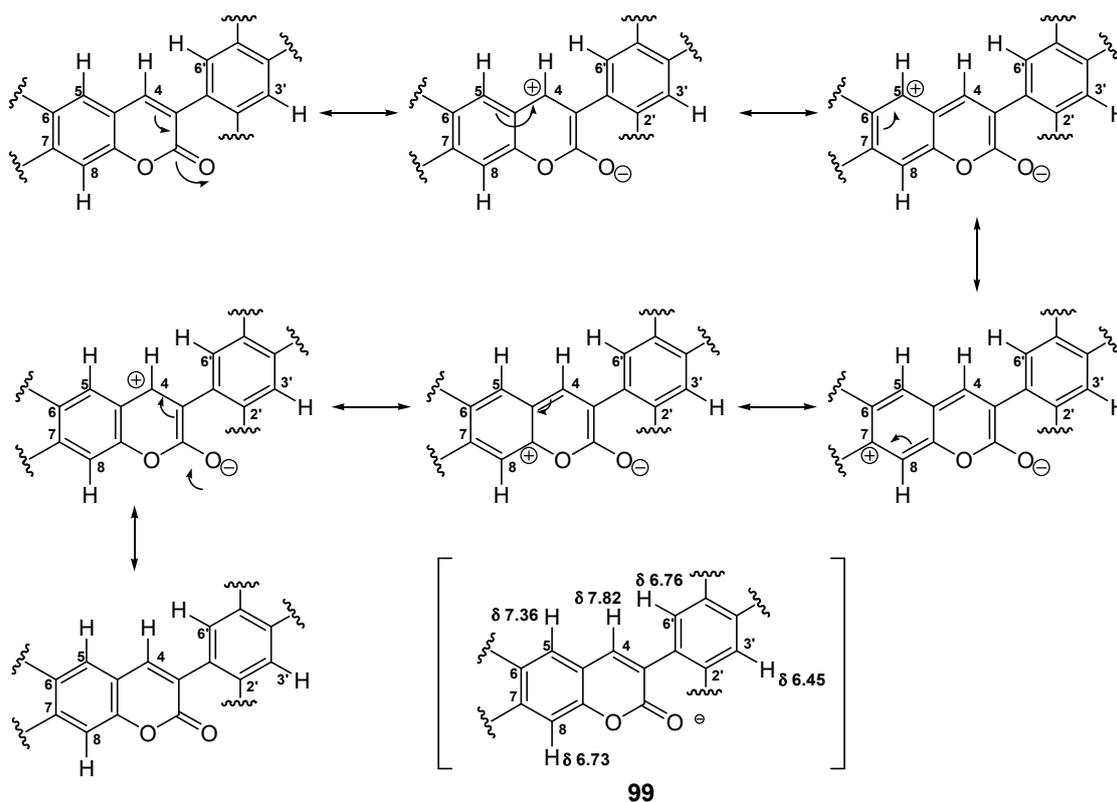


Figura 24. Estructuras resonantes de **98** (fragmento A) que explica las asignaciones establecidas en el espectro de RMN ^1H .

Así mismo, un sistema AB_2X [un triplete de dobletes en $\delta 5.76$ (2H, $J = 0.5$ y 7.5 Hz) que se acopla con dos dobletes en $\delta 3.49$ (2H, $J = 7.5$ Hz) y $\delta 4.14$ (2H, $J = 0.5$ Hz)], junto con un singulete en $\delta 4.29$ (2H), mostrado en su espectro de RMN ^1H , revelan la presencia de un fragmento de 3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enilo en la estructura de **98** (fragmento B, figura 25).

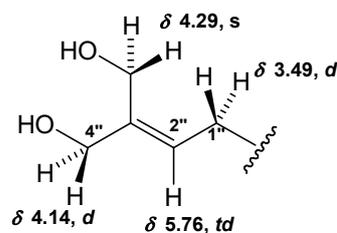


Figura 25. Fragmento de 4'',5''-dihidroxiprenilo en **98** (fragmento B).

El espectro de RMN ^{13}C (tabla 7, espectro 25), mostró nueve resonancias correspondientes al núcleo de la cumarina, así como otras doce resonancias atribuibles a un anillo aromático, un grupo dioximetileno, un metileno sp^3 , dos oximetilenos y dos carbonos olefínicos, de acuerdo con los fragmentos estructurales A y B anteriormente descritos. El análisis de los experimentos HSQC, NOESY y HMBC permitió establecer todas las asignaciones espectroscópicas y la conectividad molecular. El grupo dioximetileno (δ_{H} 5.88, δ_{C} 102.5) fue ubicado entre C-4' y C-5' con base a la correlación HMBC 3J observada con δ 142.1 (C-4') y δ 149.7 (C-5'), que a su vez correlacionaron con δ 6.76 (H-6') y δ 6.45 (H-3') (figura 26).

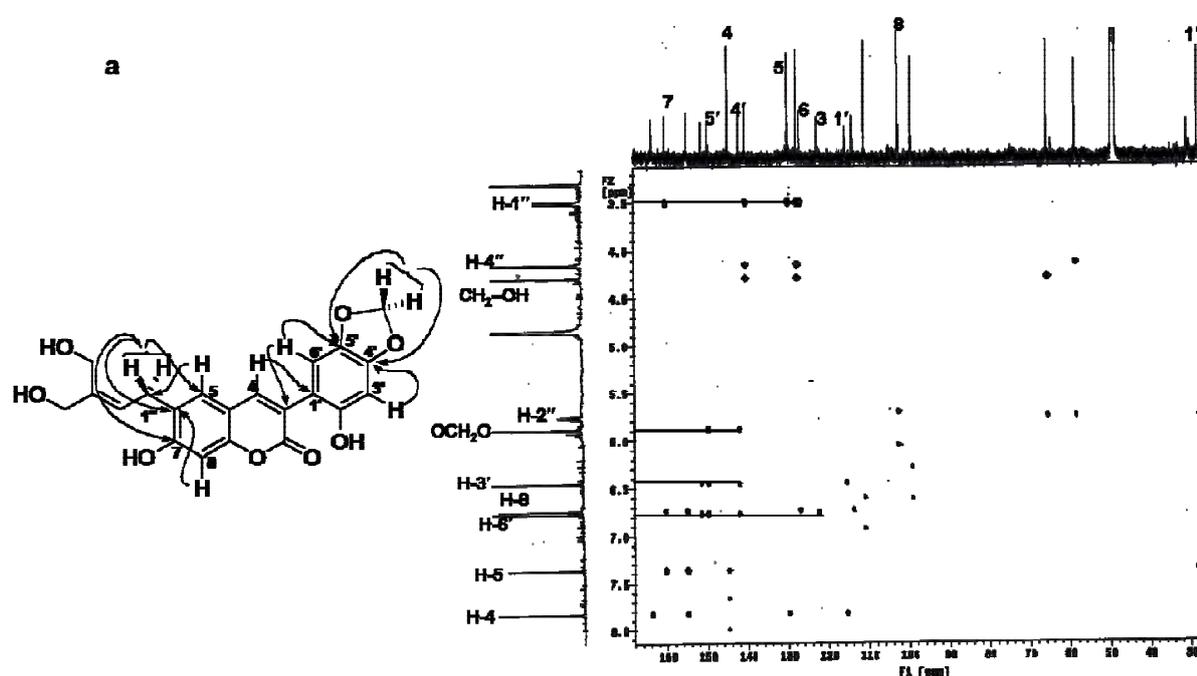


Figura 26. Interacciones HMBC selectas para 98.

Por otro lado, las interacciones NOESY entre los protones H-4 (δ 7.82) y H-6' (figura 27), y las correlaciones 3J de H-4 con C-1' (δ 115.5), y H-6' con C-3 (δ 122.4) observadas en el espectro HMBC, confirmaron que el grupo arilo se encuentra en C-3. Las correlaciones 2J , 3J de H-1'' (δ 3.49) con C-6 (δ 126.9), C-5 (δ 129.8) y C-7 (δ 160.3) respectivamente, y la correlación 3J de H-8 (δ 6.73) con C-6 mostradas en el espectro HMBC, junto con las interacciones NOESY de H-1'' con H-5 infieren que el grupo 3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enilo se encuentra unido a C-6.

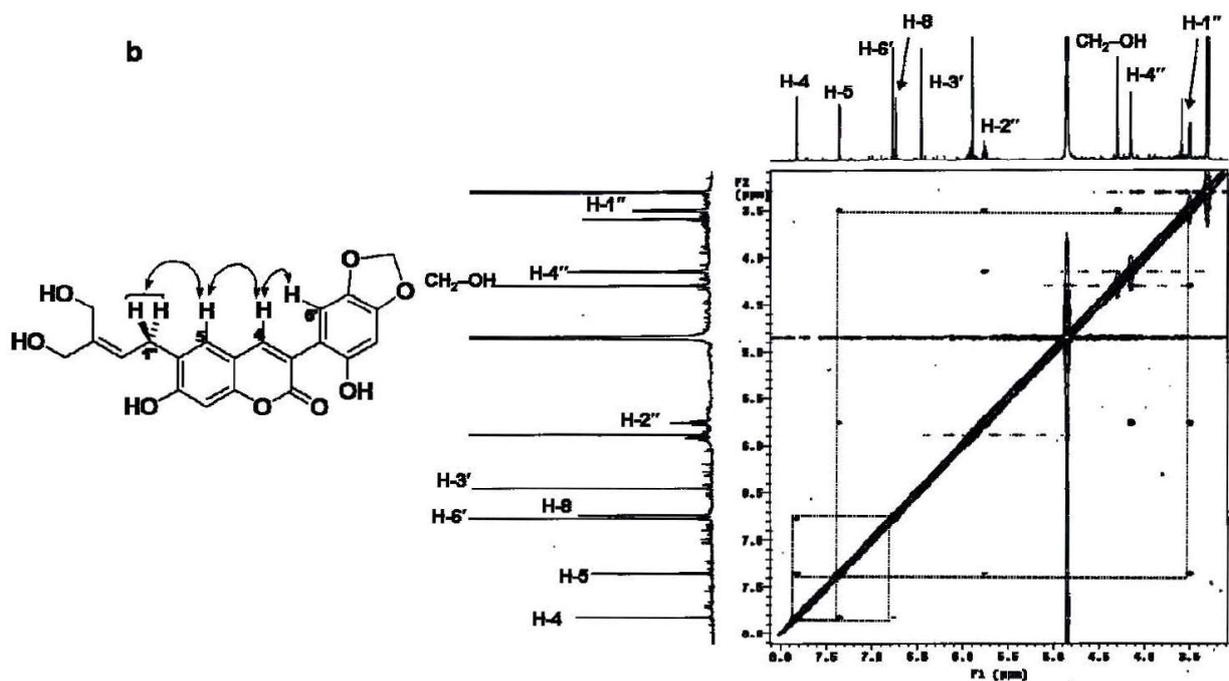
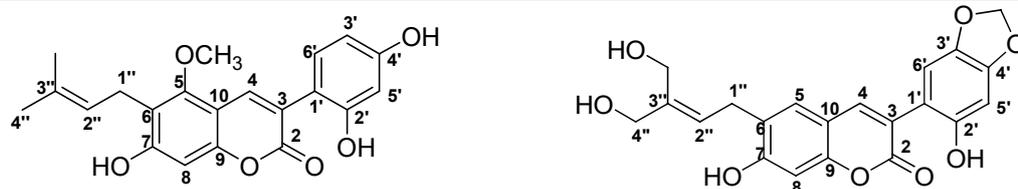


Figura 27. Interacciones NOESY relevantes para **98**.

Estas asignaciones espectroscópicas confirman la estructura de la subcoriacina como 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxifenil)-6-(3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enil)-7-hidroxicumarina (**98**) la cual representa un nuevo producto natural. A continuación se presentan todas las asignaciones de hidrógeno y carbono, incluyendo, para fines comparativos, las correspondientes a la glicicumarina (**105**).

El número de 3-arilcumarinas con un grupo prenilo en C-6 informadas en la literatura es relativamente reducido, y algunos trabajos han demostrado que son intermediarios importantes en la biosíntesis de cumestanos (figura 28) [158-159]. Interesantemente, Burns y colaboradores [160] previamente reportaron la presencia de 9-metoxi-2,3-metilendioxicumestano en la corteza de *E. polystachya*. Este es el primer informe del aislamiento de una 6-(3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enil)-3-arilcumarina de especies de *Eysenhardtia* lo que apoya la secuencia biogenética previa.

Tabla 7. Datos de RMN ^{13}C y ^1H para glicicumarina (**105**) [157] y **98** (CD_3OD), J en paréntesis.



Carbono	δ_{C}^a	$\delta_{\text{H}} (J \text{ en Hz})$	δ_{C}^*	$\delta_{\text{H}} (J \text{ en Hz})^*$
C-2	163.8		163.7	
C-3	121.9		122.4	
C-4	139.3	7.99 (<i>s</i>)	144.8	7.82 (<i>s</i>)
C-5	157.1		129.8	7.36 (<i>s</i>)
C-6	120.7		126.9	
C-7	161.3		160.3	
C-8	99.0	6.60 (<i>s</i>)	102.4	6.73 (<i>s</i>)
C-9	154.8		154.9	
C-10	108.3		113.7	
C-1'	115.5		115.5	
C-2'	157.3		151.4	
C-3'	104.0	6.38 (<i>d</i> , 2.5)	99.12	6.45 (<i>s</i>)
C-4'	159.9		142.1	
C-5'	108.2	6.33 (<i>dd</i> , 9.5, 2.5)	149.7	
C-6'	132.7	7.16 (<i>d</i> , 9.5)	110.8	6.76 (<i>s</i>)
C-1''	18.0	3.36 (<i>d</i> , 5.6)	28.3	3.49 (<i>d</i> , 7.5)
C-2''	123.9	5.21 (<i>t</i> , 5.6)	127.6	5.76 (<i>td</i> , 7.5, 0.5)
C-3''	132.4		140.4	
C-4''	23.6	1.68 (<i>s</i>)	65.5	4.14 (<i>d</i> , 0.5)
$\text{CH}_2\text{-OH}''$			58.4	4.29 (<i>s</i>)
OCH_2O			102.5	5.88 (<i>s</i>)
OCH_3	63.6	3.83 (<i>s</i>)		
CH_3	25.9	1.79 (<i>s</i>)		

El disolvente utilizado en ambos casos fue CD_3OD ; ^{13}C (100 MHz) y ^1H (400 MHz);
 *Asignaciones establecidas con base a los experimentos COSY, HSQC, NOESY y HMBC

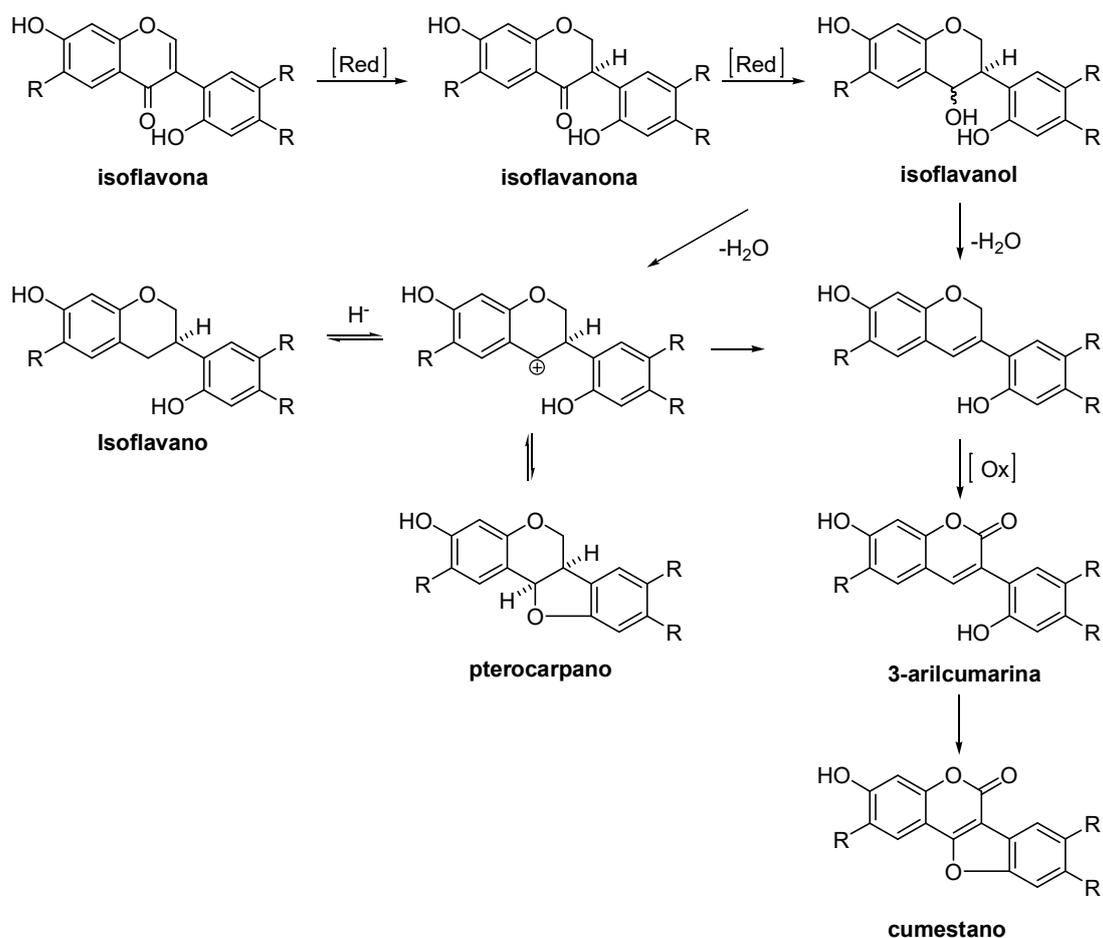


Figura 28. Biosíntesis de pterocarpanos, isoflavanos y cumestanos

6.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos puros

La actividad antioxidante de los compuestos puros se ponderó mediante tres ensayos: a) la actividad lipoprotectora en homogenado pancreático contra el daño inducido por el inductor de radicales peroxilo HAAP, b) la actividad reductora del radical DFPH y, c) el efecto de los constituyentes bioactivos sobre el nivel de glutatión reducido (GSH) en el homogenado, a concentraciones de 1, 3.1, 10, 31 y 100 μM y se determinó la CE_{50} en cada caso (tabla 8).

Los compuestos **80-89** y **91-97** aislados de *E. platycarpa* no mostraron actividad antioxidante con los ensayos empleados. La 3β -*O*-acetil- $11\alpha,12\alpha$ -epoxi-oleanan- $28,13\beta$ -ólida (**90**) desplegó actividad antioxidante en homogenado pancreático, sin embargo no mostró habilidad de reducir

radicales, ya que no fue activa en el ensayo con DFPH, sugiriendo un mecanismo de acción alterno responsable de la actividad. Los compuestos **99**, **101-104** desplegaron actividad lipoprotectora significativa, así como la habilidad de reducir el radical DFPH, sugiriendo que su actividad se enfocó a la reducción de los radicales formados a partir del HAAP durante la iniciación de la peroxidación. Los compuestos **98** y **100** desplegaron actividad antioxidante significativa comparada con la quercetina (usada como referencia) y desplegaron actividad marginal frente al radical DFPH sugiriendo un mecanismo de acción adicional para la actividad mostrada.

Por otro lado, el tratamiento del homogenado pancreático con HAAP (135 mM) a 37 °C por 2 h disminuyó significativamente el nivel de GSH comparado con el grupo sin tratamiento (tabla 8). El GSH es uno de los antioxidantes endógenos más importantes y es el principal donador de hidruro (H⁻) en la reducción de H₂O₂ a H₂O por la enzima glutatión peroxidasa. Diversos trabajos han demostrado que una disminución de los niveles de GSH incrementa la susceptibilidad de las células hacia la apoptosis [161]. Los compuestos **90-100** y **102** (a 30 μM) promovieron un incremento significativo del nivel de GSH (solos en el homogenado y junto con el HAAP), con respecto al grupo sin tratamiento y el tratado con el inductor (tabla 8). En este sentido, **101**, **103-104** y quercetina no mostraron efecto significativo sobre el GSH pancreático, sugiriendo una actividad selectiva relacionada con la estructura de cada compuesto.

El incremento favorecido por **90-100** y **102** indica que existe un mecanismo adicional importante en la actividad mostrada y no únicamente la capacidad de reducir algunos radicales formados al inicio y/o durante la peroxidación. En este sentido, se ha descrito que la glicicumarina (**105**), inhibe la actividad de la xantina oxidasa, enzima responsable de la formación de O₂⁻, demostrando que pueden existir diversos mecanismos adicionales en la actividad antioxidante de esta clase de compuestos [162]. Asimismo, diversos trabajos han destacado que la (-)-epicatequina (**102**), la cual incrementó el nivel de GSH en nuestro bioensayo *in vitro*, fortalece al sistema antioxidante endógeno de ratas diabéticas, relacionado principalmente al incremento del nivel de GSH en hígado y riñón [163]. Adicionalmente, el ácido oleanólico ha mostrado actividad antioxidante relacionada con el incremento del nivel de GSH y α-tocoferol en aorta de rata [164].

Tabla 8. Actividad antioxidante de **90** y los compuestos aislados de *E. subcoriacea*.

Compuesto	AOA (CE ₅₀) ^a	DFPH (CE ₅₀) ^b	GSH ($\mu\text{g por mg proteína}^{-1}$)	
			Sin tratamiento (0.89 \pm 0.15)	APPH (0.31 \pm 0.06*)
90	21.2 \pm 2.2	>100	1.35 \pm 0.18*	1.13 \pm 0.17*
98	9.11 \pm 1.1	51.2 \pm 2.3	0.99 \pm 0.05*	0.92 \pm 0.05*
99	7.0 \pm 0.5	8.1 \pm 0.3	1.04 \pm 0.08*	1.01 \pm 0.14*
100	11.2 \pm 0.3	71.2 \pm 1.3	1.15 \pm 0.02*	1.01 \pm 0.02*
101	11.2 \pm 0.2	11.3 \pm 1.3	0.89 \pm 0.07	0.87 \pm 0.08
102	11.4 \pm 0.3	10.1 \pm 2.5	1.02 \pm 0.03*	1.09 \pm 0.24*
103	37.1 \pm 0.7	32.5 \pm 1.2	0.87 \pm 0.01	0.85 \pm 0.02
104	7.3 \pm 0.6	16.8 \pm 2.3	0.86 \pm 0.09	0.85 \pm 0.06
Quercetina	18.1 \pm 1.1	14.3 \pm 1.1	0.88 \pm 0.01	0.86 \pm 0.02

Cada valor representa la media \pm el error estándar de la media (EEM) de la concentración necesaria para inhibir ^ala peroxidación de lípidos inducida por HAAP (AOA) y ^breducir el 50 % del radical DFPH en tres ensayos independientes *La comparación múltiple empleando la prueba de Tukey mostró diferencia significativa ($p < 0.001$) comparado con el grupo sin tratamiento (es decir, sin la aplicación de los compuestos).

6.2.4. Evaluación de la actividad hipoglucemiante en ratas diabetizadas con estreptozotocina

El ácido 3 β -*O*-acetiloleanólico (**88**), constituyente mayoritario de las ramas de *E. platycarpa* (1.01% a partir del extracto), fue evaluado como agente hipoglicemiante en ratas diabetizadas con estreptozotocina (STZ) a dosis de 3.1, 10 y 31 μM . La figura 29 muestra la variación de glucosa con respecto al tiempo. En las dosis de 3.1 y 10 μM se observa un incremento significativo en la variación de glucosa a las 3 h, el cual no fue revertido durante todo el periodo de estudio. La administración oral del producto a la dosis de 31 mg/kg no mostró efecto significativo en la variación de glucosa dentro las 5 h después de la administración. Sin embargo, a las 7 h desplegó una reducción significativa en la hiperglicemia ($-26.3 \pm 3.7\%$), comparado con el respectivo tiempo cero. En este sentido, se ha demostrado que el ácido oleanólico y algunos de sus derivado

inhiben la α -glucosidasa [149] y, por lo tanto, pueden retardar la absorción de glucosa en el intestino y así disminuir el pico hiperglucémico.

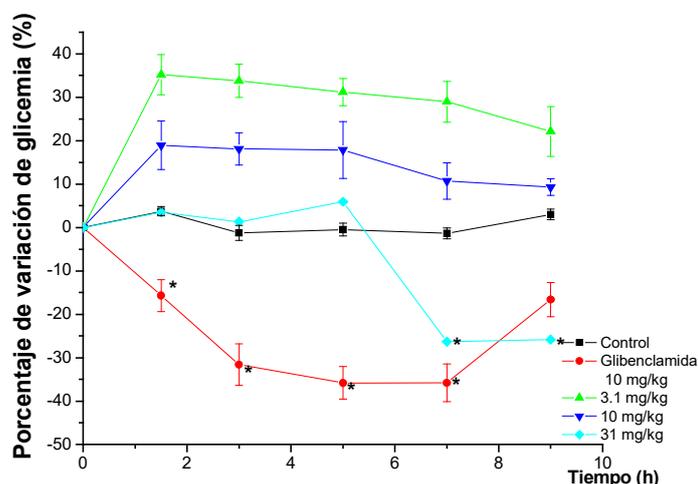


Figura 29. Efecto agudo del ácido 3 β -*O*-acetiloleanólico (**88**) en ratas diabetizadas con estreptozotocina. Los valores son expresados como la media del porcentaje de variación \pm el error estándar; n = 5 en triplicado para cada grupo; *estadísticamente significativo $p < 0.05$.

6.3. TERCERA PARTE

6.3.1. Síntesis por relevo de la 3 β -*O*-acetil-11 α ,12 α -epoxi-oleanan-28,13 β -ólida (**90**)

Con el objetivo de realizar la evaluación *in vivo* de **90**, se procedió a su síntesis a nivel preparativo a partir de ácido oleanólico. Esta síntesis se llevó a cabo mediante una serie de transformaciones químicas mostrada en la figura 30 y de acuerdo al protocolo previamente descrito para la obtención de la 11 α -hidroperoxi-diacetil-hederagenina [136].

El ácido oleanólico (**89**) fue acetilado para obtener el ácido 3 β -*O*-acetiloleanólico (**88**, 98%). La bromación de **88** permitió la obtención de 3 β -*O*-acetil-12 α -bromo-oleanólida (**106**, 97%). La deshidrobromación de **106** generó la Δ^{11} -3 β -*O*-acetil-oleanólida (**107**, 78%). Las propiedades físicas y espectroscópicas de **88**, **106** y **107** correspondieron a las informadas previamente [136].

El tratamiento de **107** con H₂O₂-ácido acético glacial (1:1), en CH₂Cl₂ y a temperatura ambiente por 48 h permitió la obtención de 3β-*O*-acetil-11α,12α-epoxi-oleanan-28,13β-ólida (**90**, 74%). El uso de CH₂Cl₂ en lugar de MeOH durante la obtención de **106** mejoró el rendimiento (de 63% a 97%), en comparación con lo previamente informado. Así, el rendimiento total de la secuencia de reacciones **89**→**88**→**106**→**107**→**90** fue de 54%, lo cual constituye una optimización de la síntesis, comparado al 28% obtenido previamente [136].

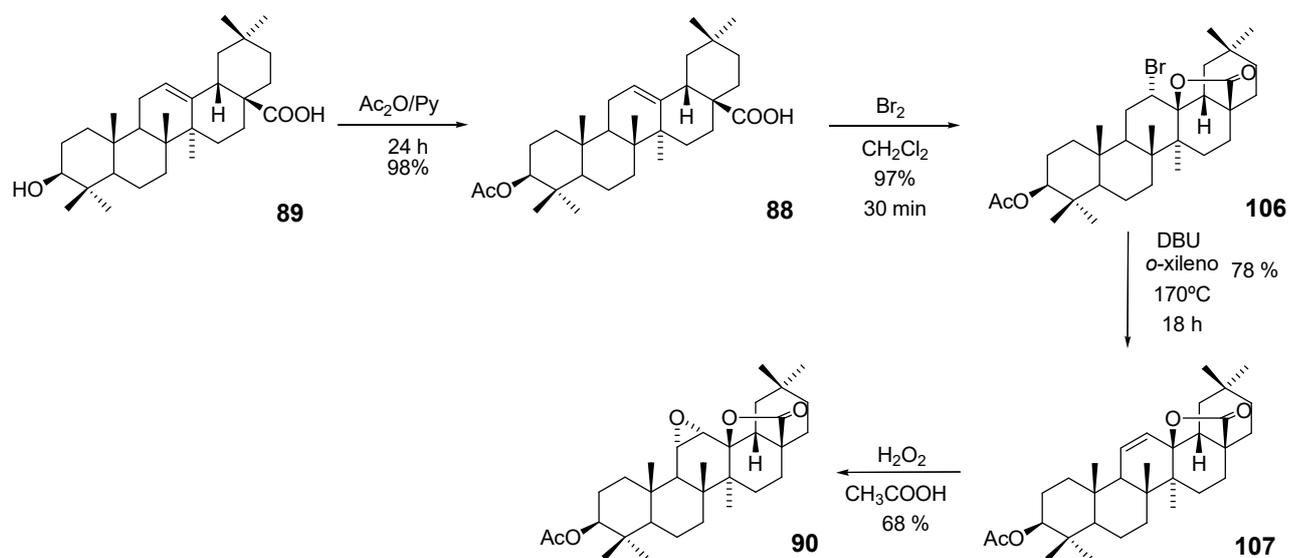


Figura 30. Síntesis por relevo de 3β-*O*-acetil-11α,12α-epoxi-oleanan-28,13β-ólida (**90**).

6.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante de **90** y **98** en un modelo de diabetes experimental

La actividad protectora de los compuestos **90** y **98** se evaluó contra el daño inducido por la estreptozotocina (**108**, STZ) en ratas normales. Los compuestos fueron administrados a una dosis de 100 mg/kg durante 5 días en cada caso. Después del quinto día se evaluaron: a) los niveles de glucosa en plasma, b) los productos de peroxidación como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB); la actividad de las enzimas antioxidantes c) superóxido dismutasa (SOD), d) glutatión peroxidasa (GSH) y, e) catalasa (Cat), de acuerdo al protocolo descrito en la parte experimental.

La administración de **90** a ratas normales durante 5 días disminuyó significativamente los niveles de glucosa sanguínea (4.53 ± 0.82 mM) comparado con el grupo control sin tratamiento (6.1 ± 0.25 mM) (figura 31), estableciendo un efecto hipoglicemiante para **90**. En este sentido, ha sido demostrado que algunos derivados del ácido oleanólico (**89**) pueden inhibir la α -glucosidasa, enzima responsable de hidrolizar los polisacáridos para su absorción intestinal [149]. Interesantemente, de igual manera, determinamos que el ácido 3-*O*-acetileanólico (**88**) posee actividad hipoglicemiante con un mecanismo de acción extrapancreático cuando se comparó con la glibenclamida.

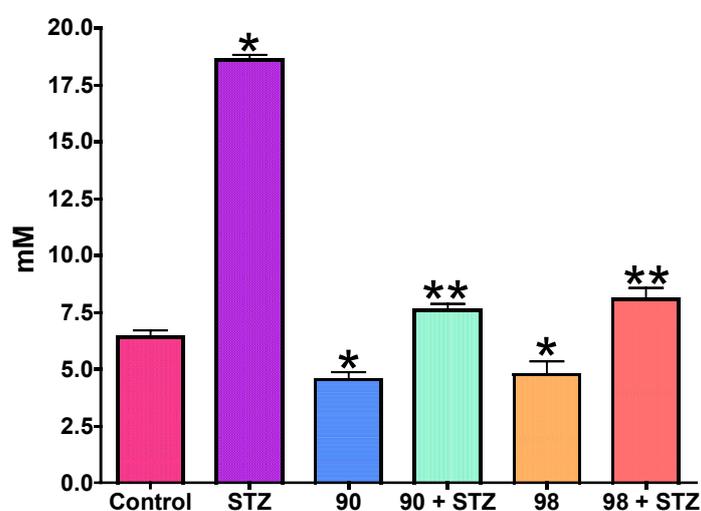
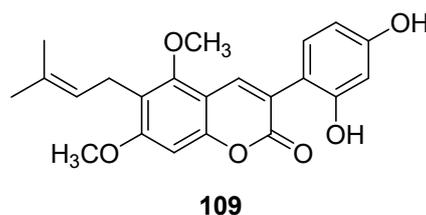
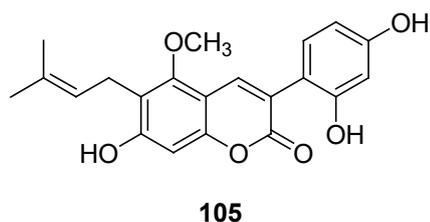


Figura 31. Efecto de **90** y **98** en la concentración de glucosa. Cada barra es la media \pm el error estándar, para $n = 6$; * $p < 0.001$ y ** $p < 0.001$ comparado con el grupo sin tratamiento y el tratado con STZ, respectivamente.

El compuesto **98** mostró un efecto hipoglicemiante significativo ($p < 0.05$) a 100 mg/kg en un periodo de 5 días de administración. Mae y colaboradores [165] han demostrado que la glicumarina (**105**) y la glicirina (**109**) son agonistas del factor de transcripción PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*; o receptor activado por proliferadores peroxisomales). Este receptor se encuentra ampliamente distribuido, pero su presencia es destacada principalmente en el tejido adiposo y en menor proporción en hígado, tejido muscular y otros. El receptor activado favorece la formación del tejido adiposo a partir de glucosa e incrementa la sensibilidad hacia la insulina [166]. En este sentido, el PPAR- γ activado por las tiazolidendionas favorece la disminución de los triglicéridos en sangre y el incremento en la utilización de la glucosa por el músculo esquelético en los pacientes diabéticos resistentes a la insulina [165].



El tratamiento con STZ (**108**, 50 mg/kg) produjo un incremento significativo (18.6 ± 0.89 mM) del nivel de glucosa sanguínea (figura 31), junto con el aumento de las SRATB en páncreas (medido como nmol MDA mg proteína⁻¹, figura 32) 5 días después de su administración.

El efecto diabotogénico de la STZ se ha podido explicar de la siguiente manera: 1) la STZ entra a las islotes pancreáticos mediante un transportador de glucosa (GLUT2), 2) Dentro de las células se descompone espontáneamente formando especies carbamoylantes y alquilantes, las cuales reaccionan principalmente con el ADN y las proteínas [167], y 3) se ha reportado que la STZ produce altos niveles de óxido nítrico (NO) inhibiendo el ciclo de Krebs, y sustancialmente disminuye el consumo de oxígeno en la mitocondria. Esta acumulación de oxígeno incrementa la actividad de la xantina oxidasa produciendo O₂^{•-}. Como un resultado de la alta producción de O₂^{•-} se forma H₂O₂ y [•]OH lo que contribuye al daño en el ADN celular (figura 33) [168].

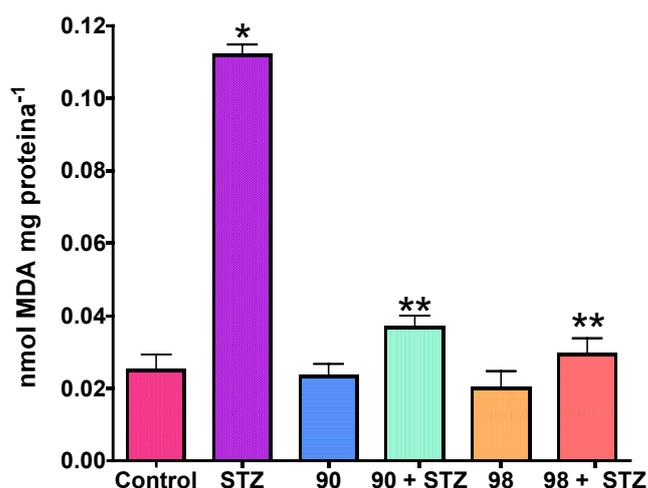


Figura 32. Efecto de **90** y **98** en los niveles de SRATB en páncreas. Cada barra es la media \pm el error estándar, para $n = 6$; * $p < 0.001$ y ** $p < 0.001$ comparado con el grupo sin tratamiento y el tratado con STZ, respectivamente.

El incremento de las SRATB, confirma el hecho de que un estrés oxidativo antecede a la hiperglicemia inducida por la STZ.

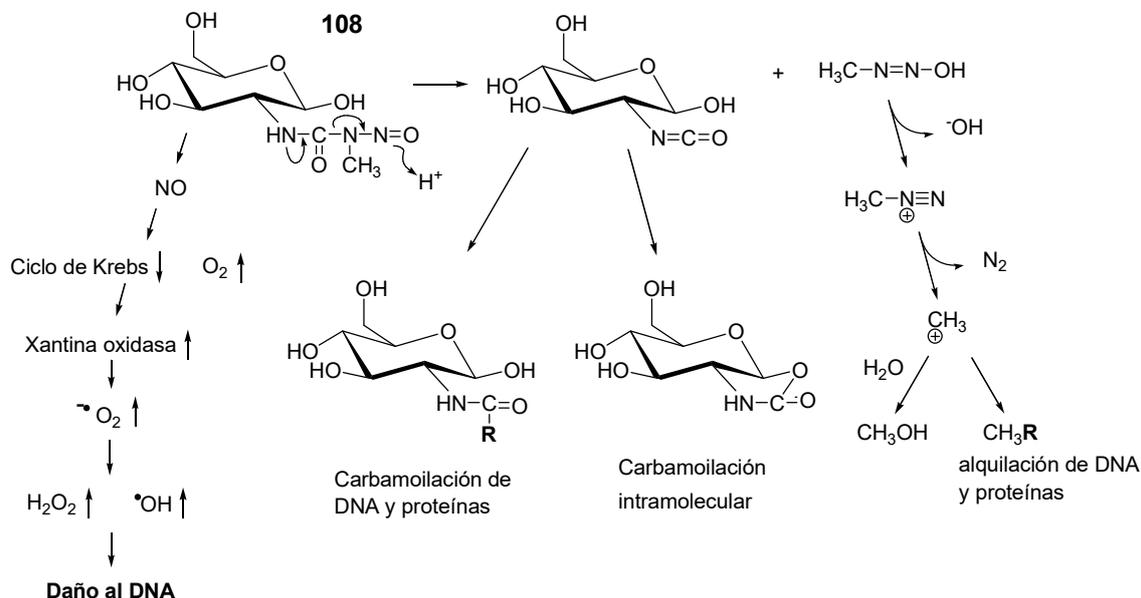


Figura 33. Descomposición espontánea de la STZ en las células β para formar especies carbamoilantes y alquilantes.

Como un resultado del efecto de la STZ, las células pancreáticas sufren destrucción por necrosis. En este sentido se ha sugerido que el páncreas es mas susceptible al daño oxidativo, comparado con otros órganos como hígado y riñón, debido a que expresa una menor capacidad del sistema antioxidante enzimático [122].

Los compuestos **90** y **98** (en cada caso) fueron administrados al mismo tiempo que una dosis de STZ y diariamente por 4 días después de la inducción de la diabetes. El tratamiento con **90** redujo significativamente los niveles de glucosa sanguínea (figura 21) y de SRATB en páncreas (figura 22) inducido por la STZ; este mismo efecto se presentó con **98**, demostrando una actividad protectora por estos compuestos adicional a su efecto hipoglicemiante. Este efecto puede correlacionar con la actividad antioxidante *in vitro* desplegada en el homogenado pancreático. Soto et al. [82] demostró que el efecto protector antioxidante de la silimarina (**36**) contra el daño pancreático inducido por la aloxana, está relacionado con el fortalecimiento del sistema antioxidante endógeno.

Adicionalmente al aumento de los niveles de glucosa y SRATB, la administración de la STZ produjo un incremento significativo en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSHPx), mientras que la actividad de la catalasa (Cat) no presentó variación significativa, comparado con el grupo sin tratamiento 5 días después de su administración.

El sistema GSH, SOD, GSHPx y Cat representa la defensa antioxidante endógena mas importante contra el daño inducido por las ERO [26]. La SOD protege a los tejidos contra el deterioro provocado por radicales de oxígeno, catalizando la remoción de $O_2^{\cdot-}$ [2], el cual daña las membranas celulares y las estructuras biológicas por diversos mecanismos. Las enzimas GSHPx y Cat son las responsables de la desintoxicación de cantidades significativas de H_2O_2 (figura 34). Estudios previos han descrito el incremento de la actividad enzimática en diversos órganos en pacientes diabéticos, posiblemente como un mecanismo de defensa contra el incremento en la producción de radicales libres a causa de los persistentes estados crónicos de hiperglicemia [5].

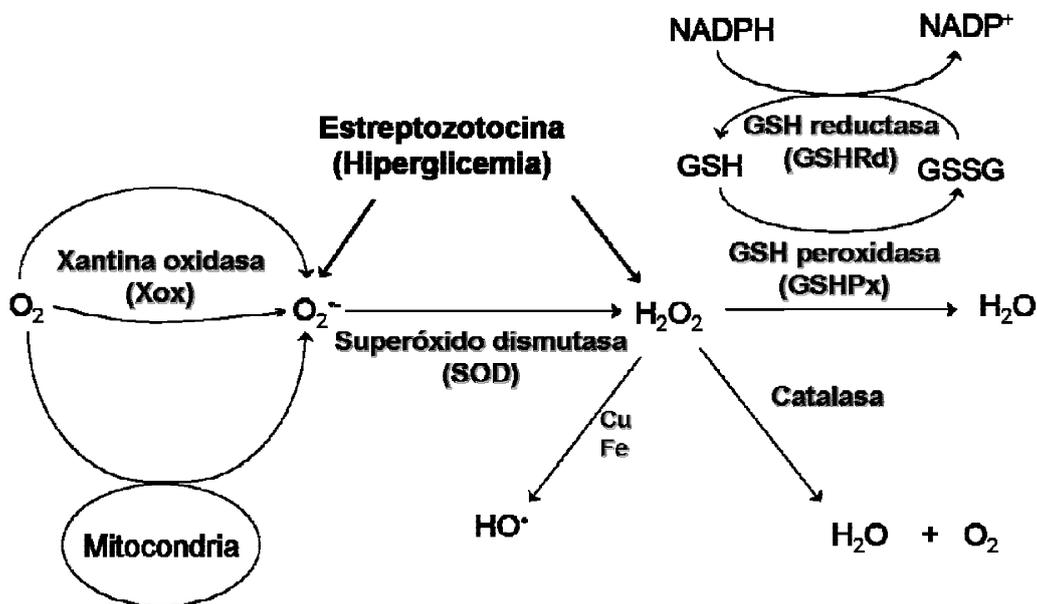


Figura 34. Sistema antioxidante endógeno.

El incremento observado en la actividad de la SOD (figura 25) establece que una alta producción de $O_2^{\cdot-}$ ocurre previo a la hiperglicemia. Este incremento en la actividad de SOD

produce una alta concentración de H_2O_2 que a su vez induce un incremento de la GSHPx (figura 26). Sin embargo, se ha propuesto que el $O_2^{\cdot-}$ es un inhibidor de la Cat pero no de la GSHPx [169]. Por lo tanto, cuando las ratas normales fueron tratadas con STZ, mostraron un incremento de la actividad de la GSHPx y SOD, pero no de la Cat (figura 37).

La administración de **90** a ratas normales no mostró efecto significativo sobre la actividad de la SOD comparado con el grupo sin tratamiento (figura 35), sin embargo, su administración junto con la STZ disminuyó significativamente la actividad de esa enzima. Por otro lado, **98** incrementó la actividad enzimática de SOD en ratas normales y tratadas con estreptozotocina, durante el periodo de estudio.

Así mismo, los compuestos **90** y **98**, incrementaron significativamente la actividad de la GSHPx en ratas normales y en tratadas con la STZ (figura 36). Este efecto favorece que el H_2O_2 que produce la SOD sea reducido a H_2O y por lo tanto el daño celular no ocurre. Este efecto fue más remarcado con la administración de **90** en ambos tratamientos.

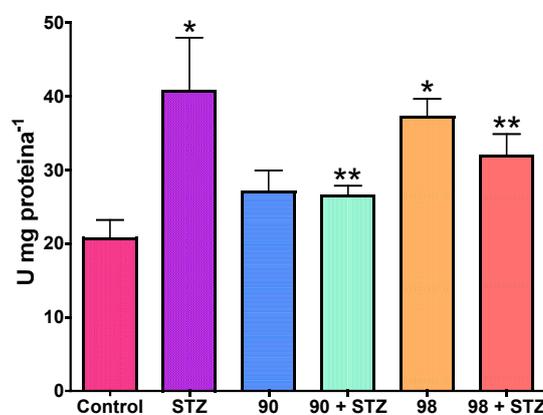


Figura 35. Efecto de **90** y **98** en la actividad de la SOD (U por mg de proteína). Cada barra es la media \pm el error estándar, para $n = 6$; * $p < 0.01$ y ** $p < 0.05$ comparado con el grupo sin tratamiento y el tratado con STZ, respectivamente.

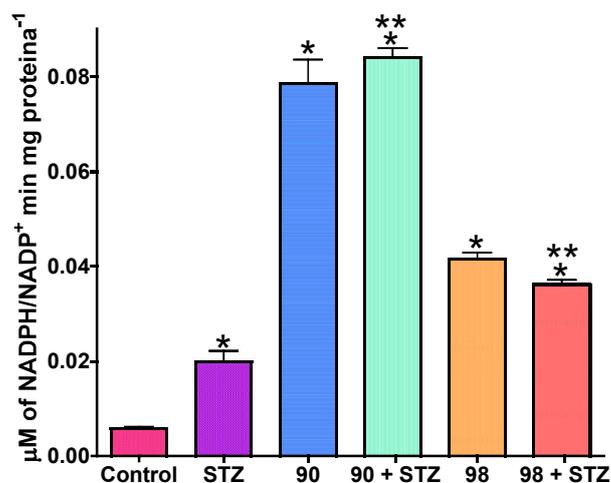


Figura 36. Efecto de **90** y **98** en la actividad de la GSHPx (μM de NADPH oxidado a NADP^+ por min por mg de proteína). Cada barra es la media \pm el error estándar, para $n = 6$; $*p < 0.001$ y $**p < 0.001$ comparado con el grupo sin tratamiento y el tratado con STZ, respectivamente.

El compuesto **90** no mostró efecto sobre la actividad de Cat en ratas normales (figura 37), sin embargo, en ratas tratadas indujo un incremento significativo en su actividad. La cumarina **98**, incrementó la actividad de la Cat en ratas normales y en las ratas tratadas con STZ.

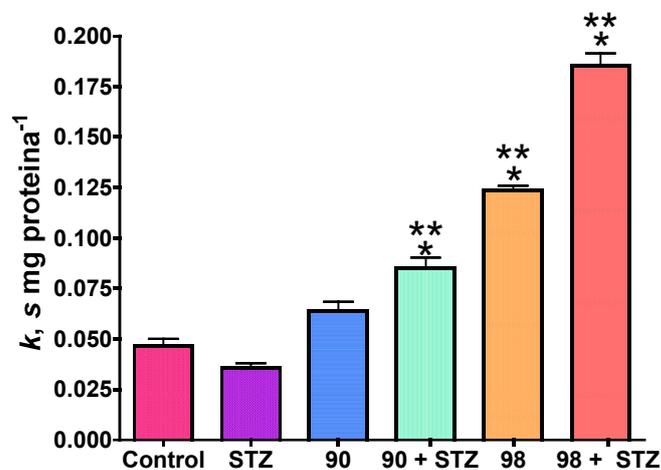


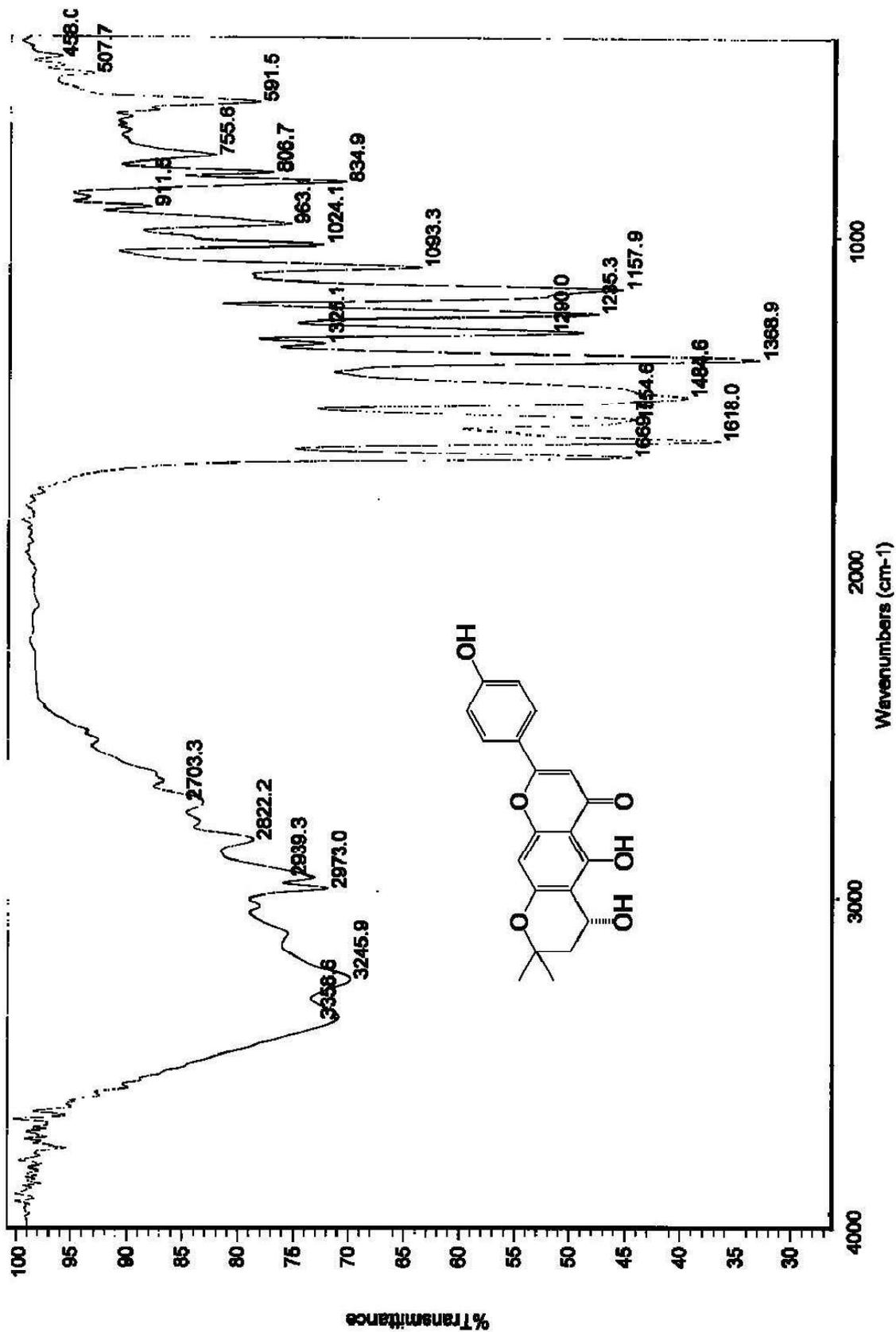
Figura 37. Efecto de **90** y **98** en la actividad de la Cat (k , constante de velocidad de primer orden, por segundo por mg de proteína). Cada barra es la media \pm el error estándar, para $n = 6$; $*p < 0.001$ y $**p < 0.001$ comparado con el grupo control sin tratamiento y el tratado con STZ, respectivamente.

Los resultados demuestran que el efecto protector atribuido a **90** y **98** fue el resultado de una actividad antioxidante sinérgica, es decir **90** incrementó los niveles de GSH y la actividad de GSHPx y Cat, mientras que **98** desplegó actividad sobre el radical DFPH y sobre las tres enzimas antioxidantes, además de favorecer un incremento en el GSH pancreático. Este efecto protegió contra la toxicidad inducida por la STZ. Además, se estableció la correlación entre el efecto protector en el homogenado pancreático y en el modelo de diabetes experimental.

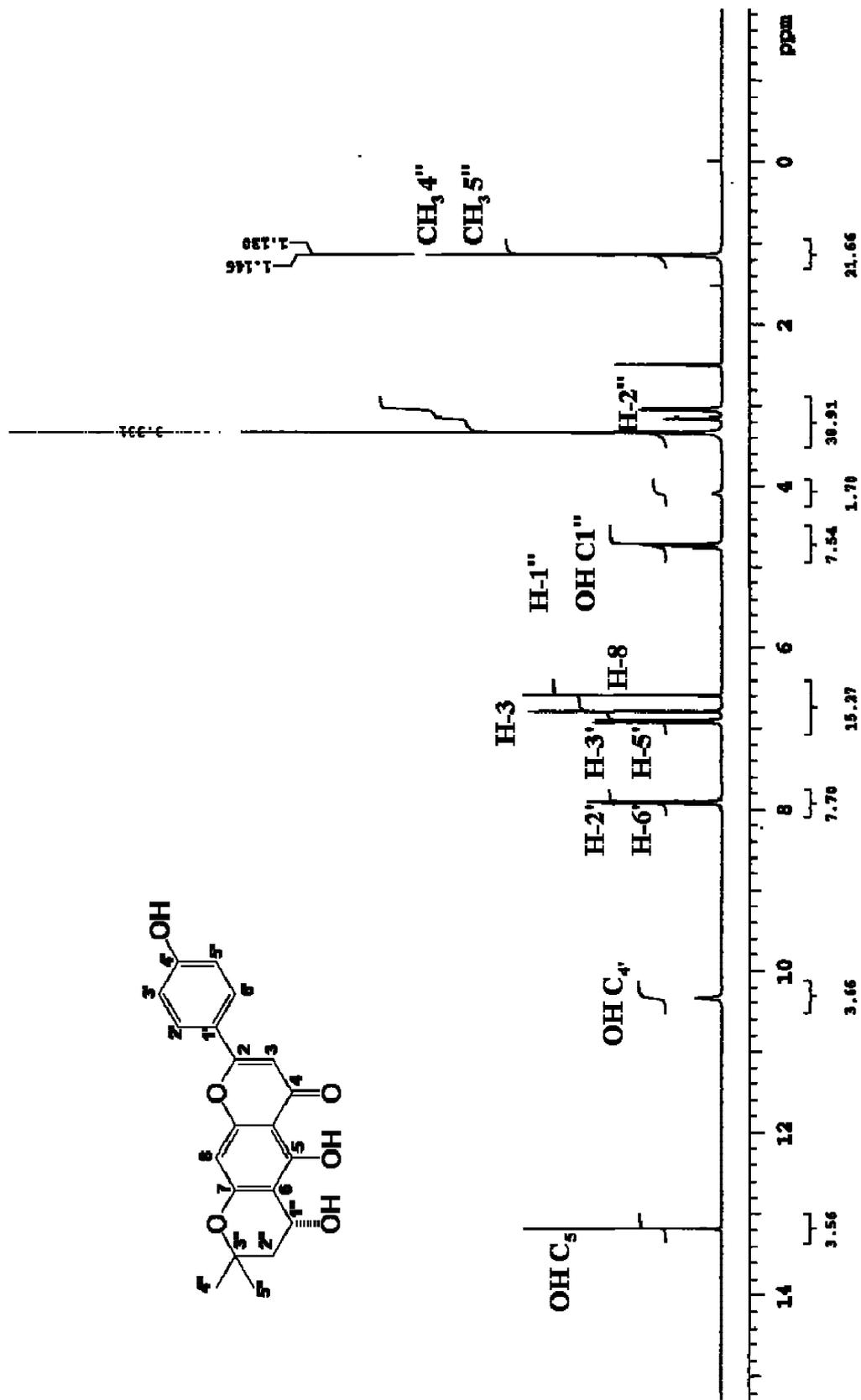
7. CONCLUSIONES

- Considerando que el método analítico de la evaluación *in vitro* proporciona un ambiente de estrés oxidativo, se estableció la actividad antioxidativa de los extractos obtenidos de las especies del género *Eysenhardtia*, la cual, en primera instancia, correlacionó con la capacidad reductora del radical DFPH. Adicionalmente, se determinó la actividad prooxidante de los extractos obtenidos de las especies del género *Senna*, sugiriendo un efecto tóxico a estas plantas.
- El estudio biodirigido de las fracciones bioactivas de los extractos orgánicos de *E. subcoriacea* permitió aislar, identificar y caracterizar a un nuevo producto natural, la 3-(2'-hidroxi-[4',5'-metilendioxfenil)-6-(3"-hidroximetil-4"-hidroxibut-2"-enil)-7-hidroxicumarina (**98**), junto con los compuestos conocidos catequina (**99**), (+)-afzelequina (**100**) y (+)-3-O-β-D-galactopiranosido de (+)-catequina (**101**) (-)-epicatequina (**102**), eriodictiol (**103**) y 3-O-β-D-galactopiranosido de quercetina (**104**), como constituyentes bioactivos.
- La evaluación de la actividad antioxidante realizada a los metabolitos aislados de *E. platycarpa* permitió determinar la actividad antiperoxidativa de 3β-O-acetil-11α,12α-epoxioleanan-28,13β-ólida (**90**), la cual no redujo al radical DFPH. Adicionalmente, la actividad correlacionó con el incremento de los niveles de glutatión pancreático, indicando que posiblemente su efecto lo ejerce en el ciclo del glutatión. Así mismo, algunos compuestos fenólicos incrementaron los niveles de glutatión pancreático (**90-100** y **102**) sugiriendo un mecanismo adicional para estos compuestos.
- Se obtuvo convenientemente la 3β-O-acetil-11α,12α-epoxioleanan-28,13β-ólida mediante la síntesis por relevo a partir de ácido oleanólico con un rendimiento total de 54 % mejor que el informado en la literatura (28 %).
- La evaluación de la actividad antihiper glucémica y antioxidante *in vivo* permitió establecer la bioactividad de la epoxilactona triperpénica aislada de *E. platycarpa* y de la hidroxiprenilfenilcumarina aislada de la corteza y ramas de *E. subcoriacea*, las cuales disminuyeron los niveles de glucosa e incrementaron la capacidad del sistema antioxidante endógeno (GPx, Cat y SOD).
- El tratamiento de la diabetes con compuestos con actividad antioxidativa, es decir como reductores de radicales y/o inductores del sistema antioxidante endógeno, resulta una

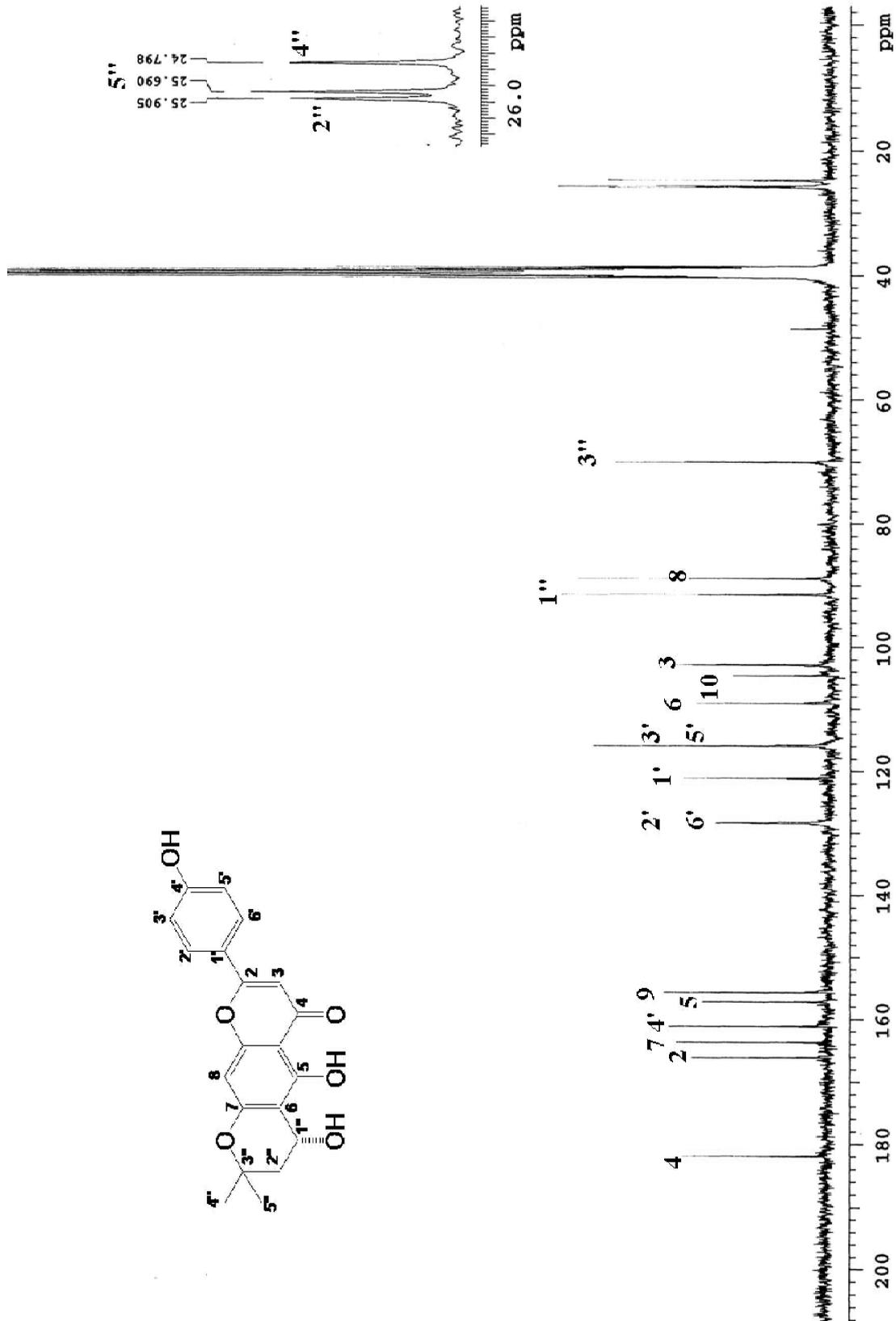
alternativa viable en el tratamiento de la enfermedad. Así mismo, existen informes que destacan la inducción de diversos factores de transcripción involucrados en la regeneración de la función pancreática por parte de productos naturales [166], por lo que resulta conveniente efectuar el análisis en modelo de regeneración, es decir ratas diabetizadas y la administración durante periodos de 30 y/o 45 días.



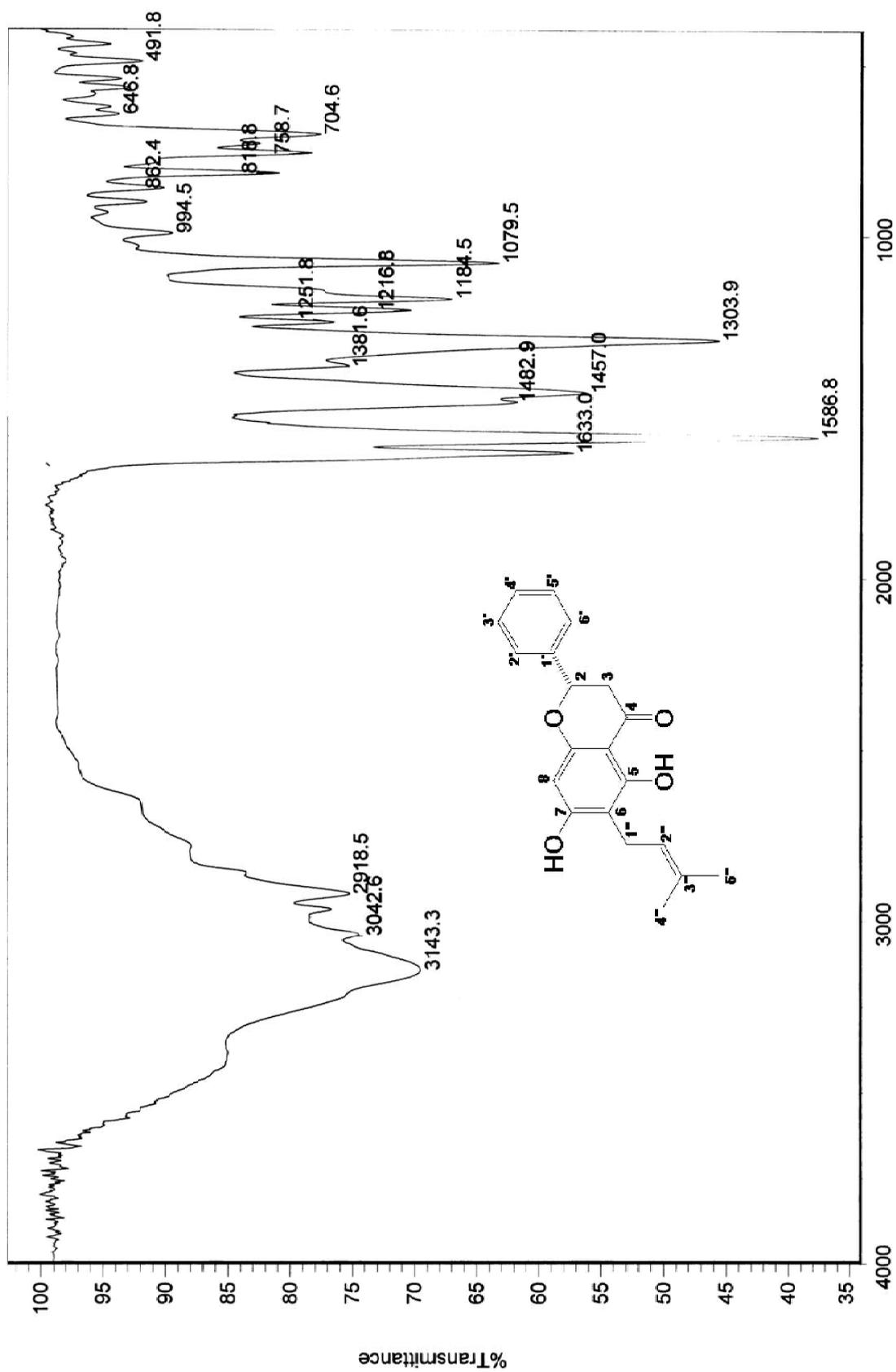
Espectro 1. IR (KBr, ν_{\max}) de la (1''R)-5,4',1''-trihidroxi-6,7-(3'',3''-dimetilcroman)-flavona (80).



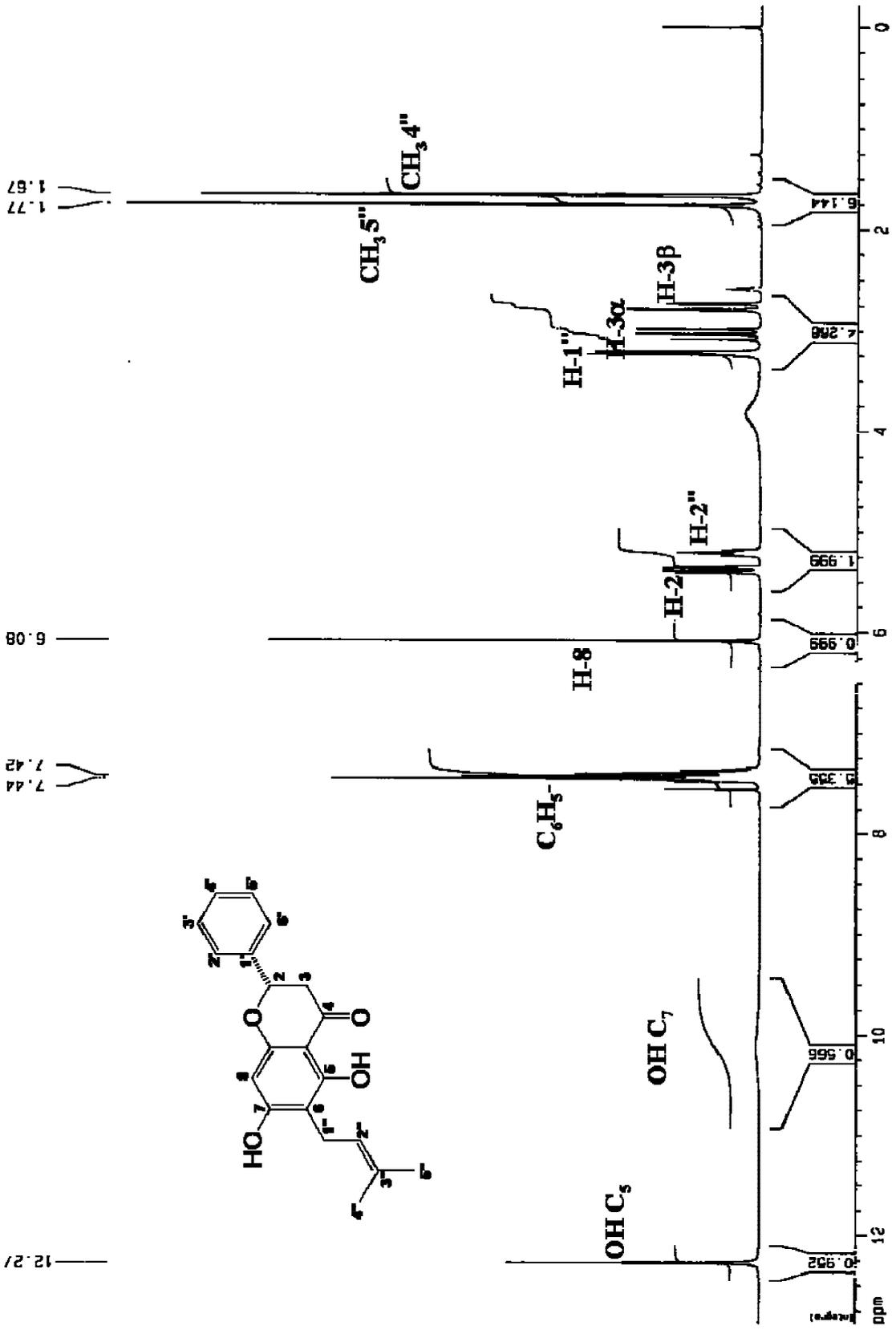
Espectro 2. RMN ¹H (500 MHz, DMSO, TMS) de la (1'*R*)-5,4',1''-trihidroxi-6,7-(3'',3''-dimetilcroman)-flavona (80).



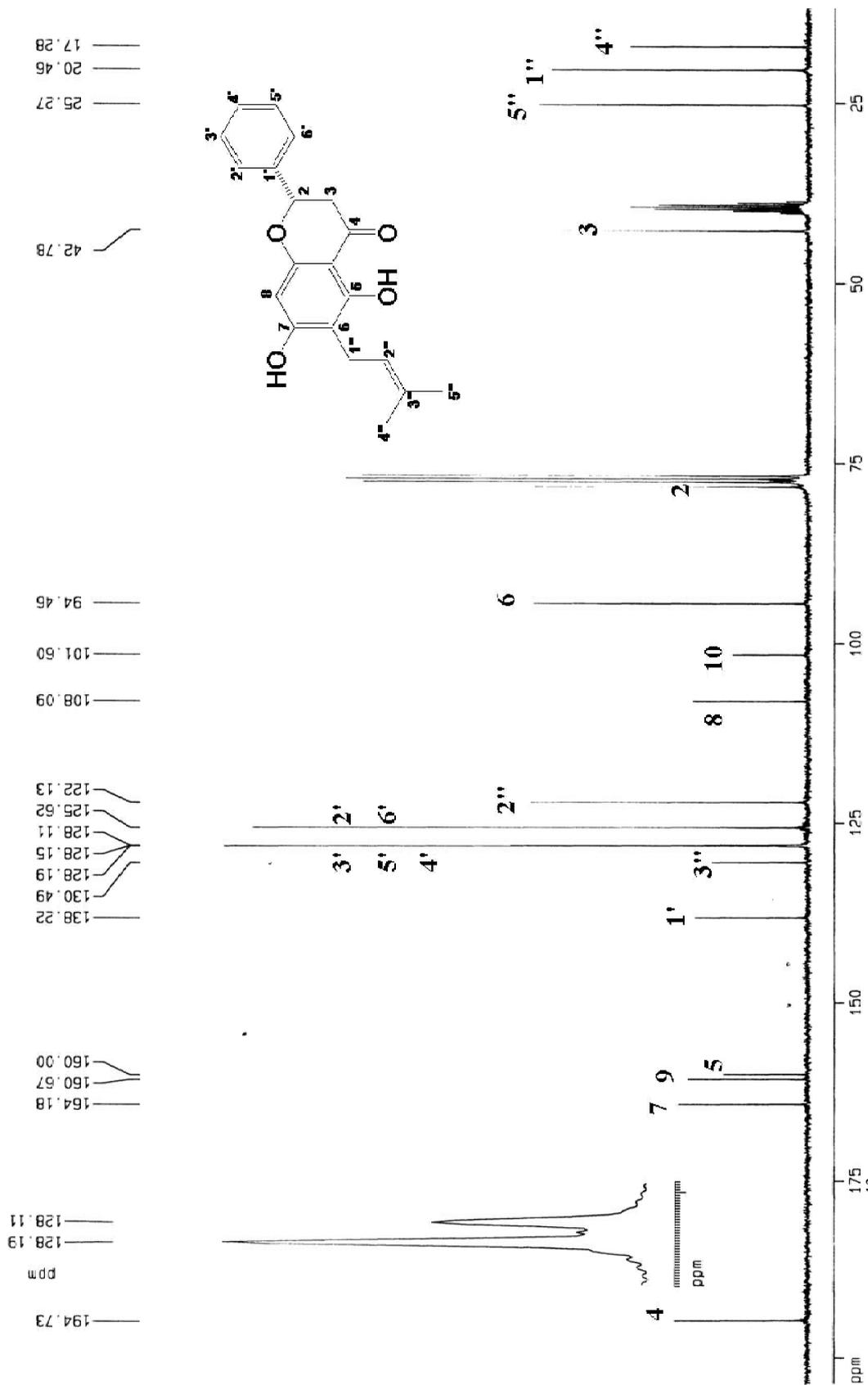
Espectro 3. RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO, TMS) de la (1''R)-5,4',1''-trihidroxi-6,7-(3'',3''-dimetilcroman)-flavona (**80**).



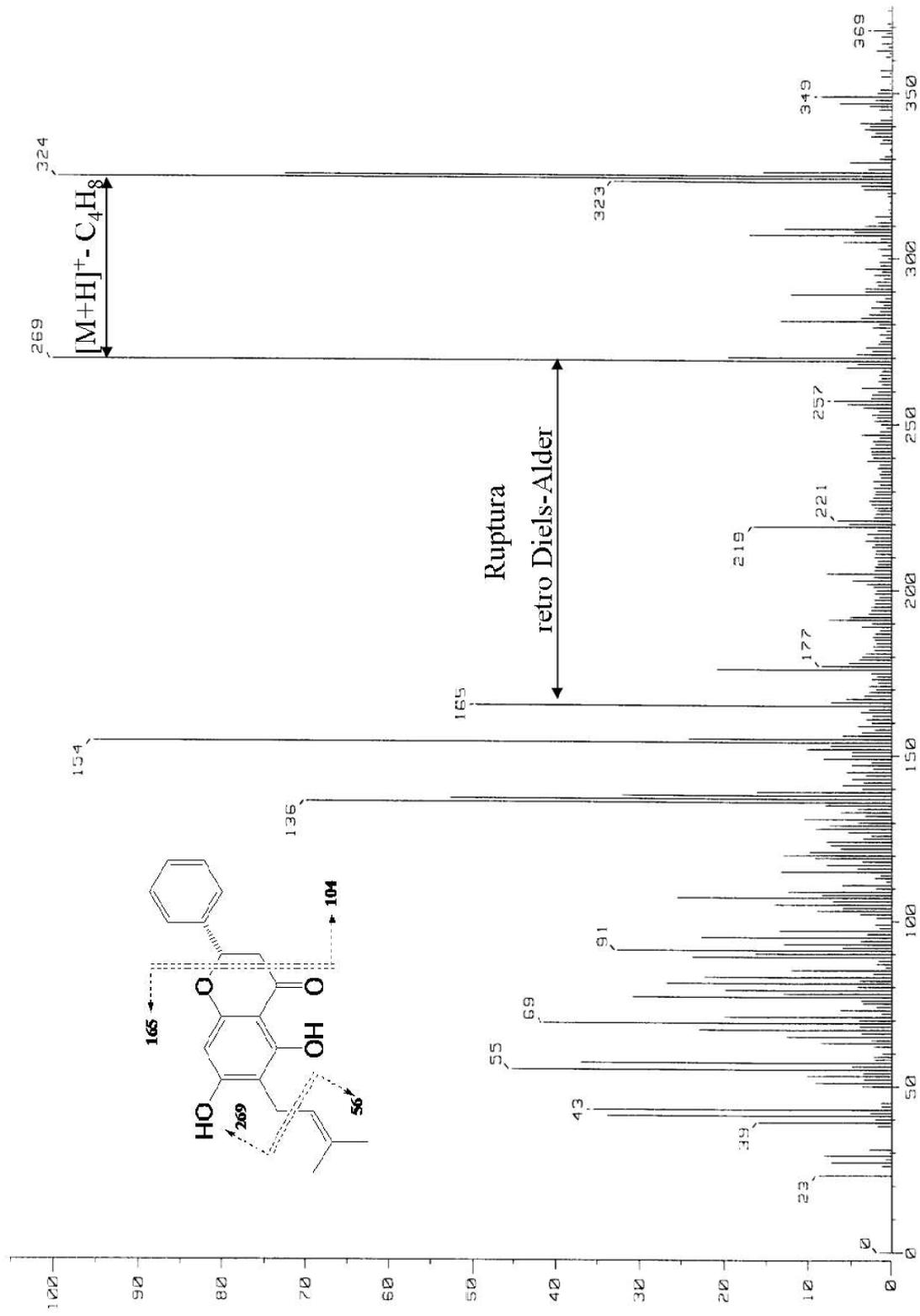
Espectro 4. IR (KBr, ν_{\max}) de la 5,7-dihidroxi-6-prenilflavona (**81**).



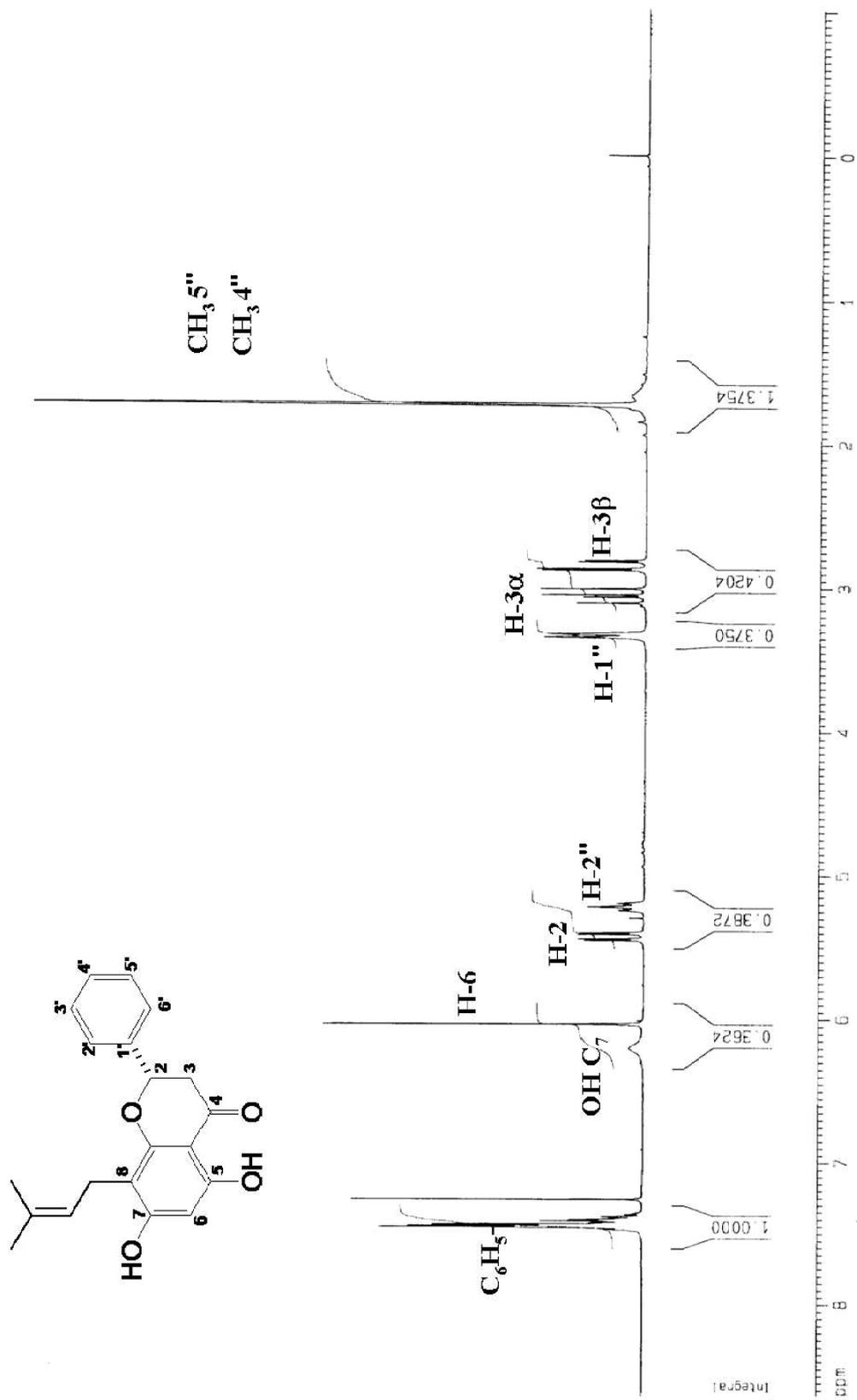
Espectro 5. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃-DMSO, TMS) de la 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (81).



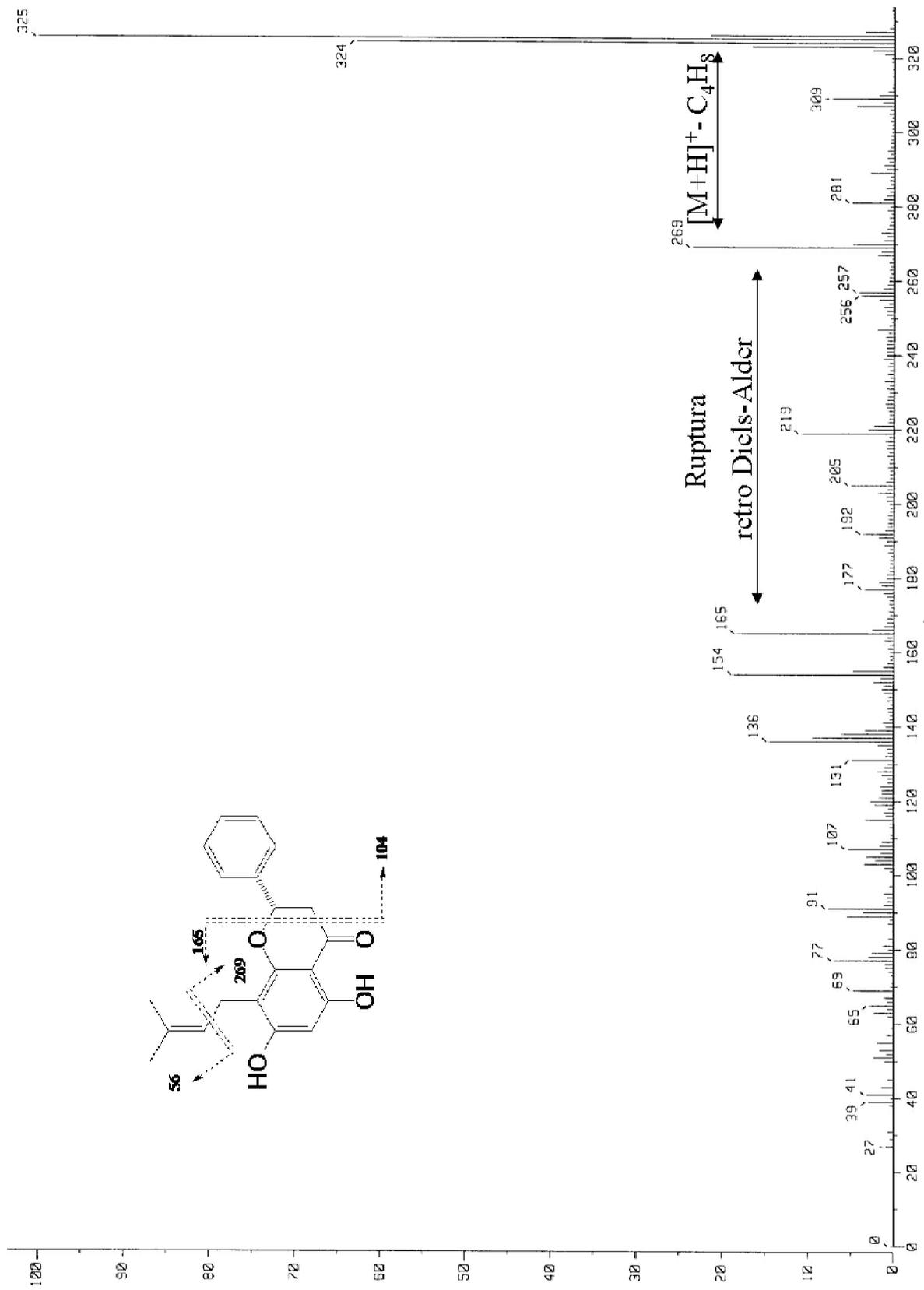
Espectro 6. RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-DMSO}$, TMS) de la 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (**81**).



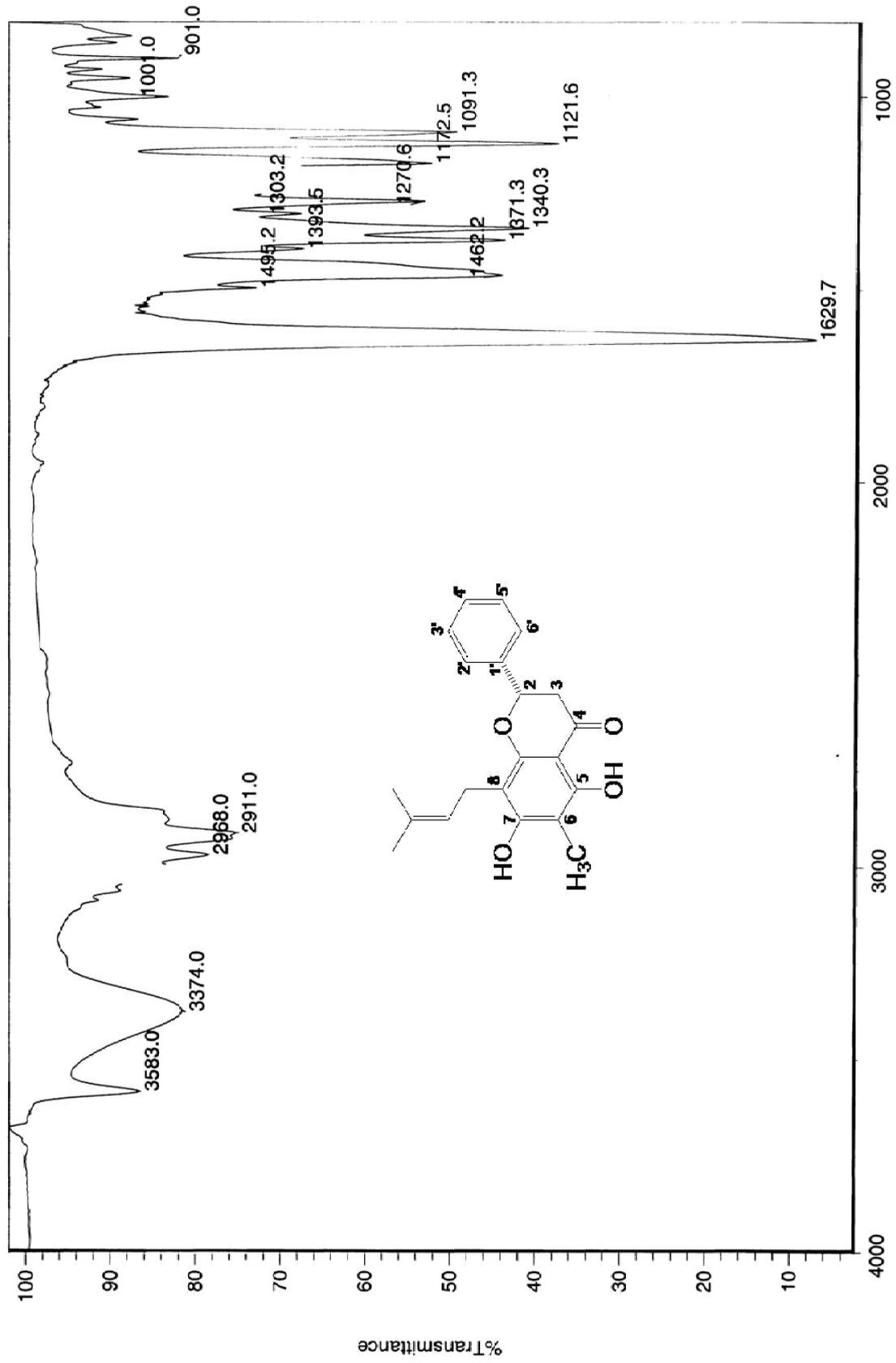
Espectro 7.EM (FAB⁺, v_{max}) de la 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (81).



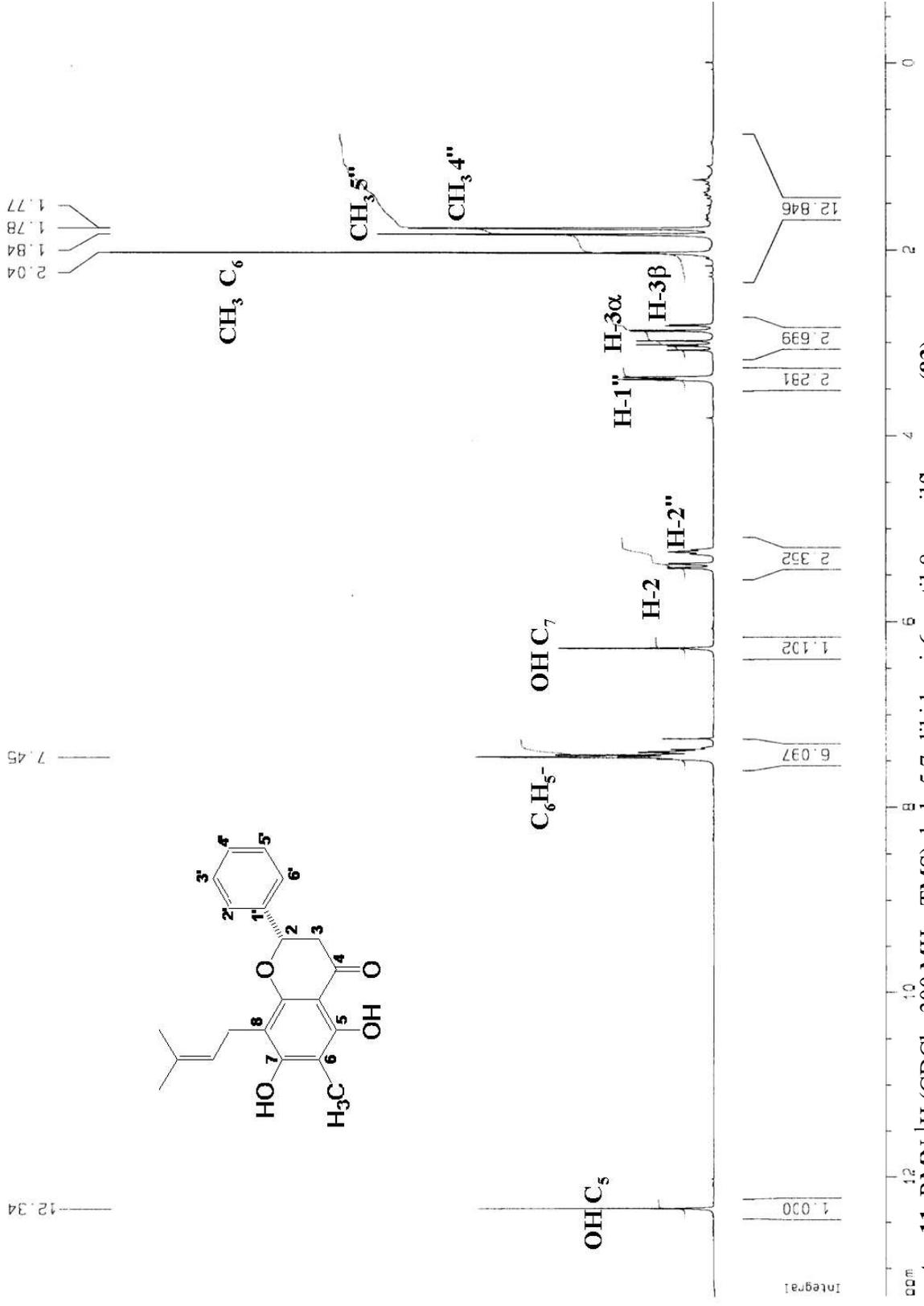
Espectro 8. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) de la glabranina (**82**).



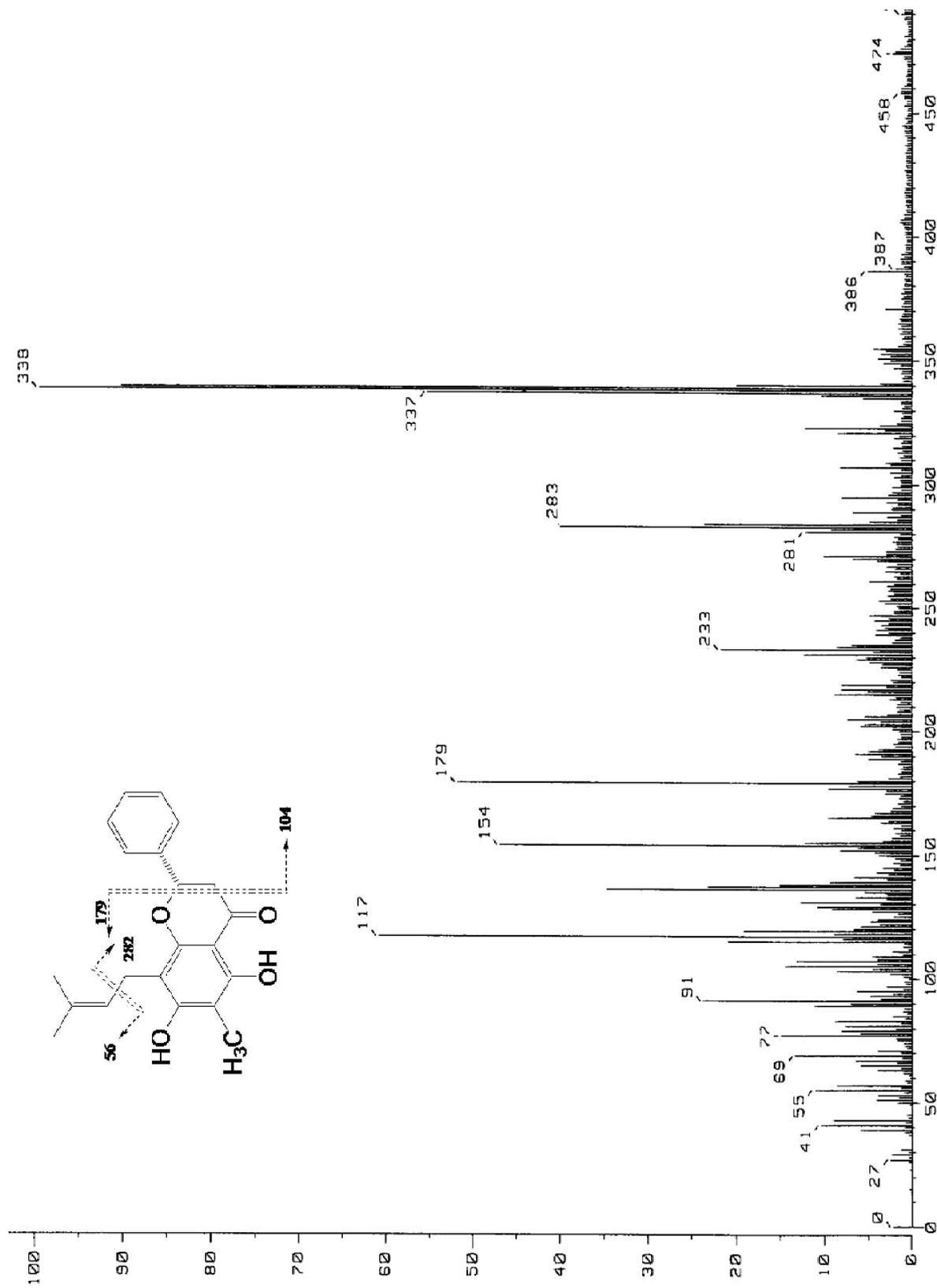
Espectro 9. EM (FAB⁺, v_{max}) de la glabranina (**82**).



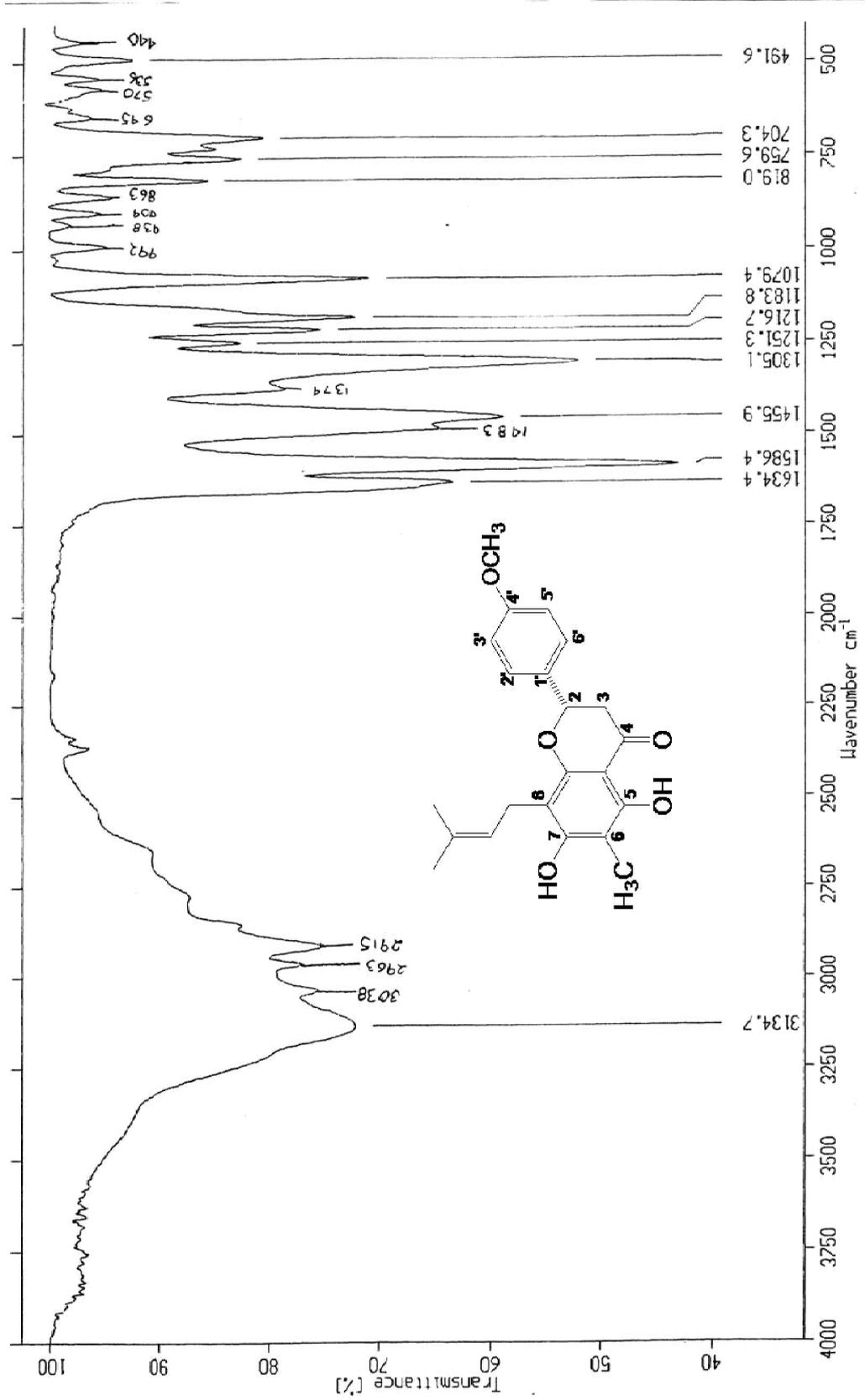
Espectro 10. IR (CHCl₃) ν_{\max} de la 5,7,8-trihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**83**).



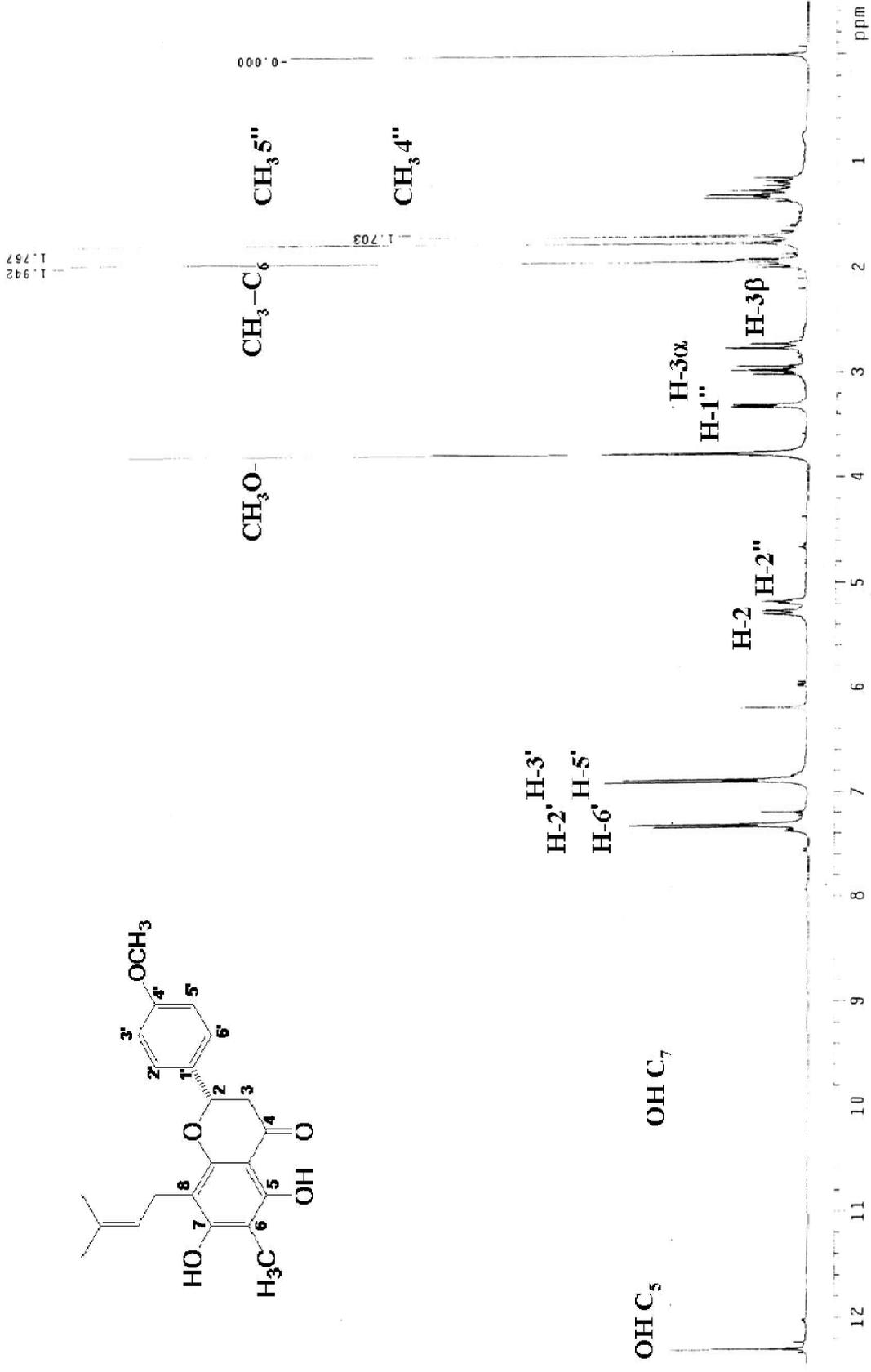
Espectro 11. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz, TMS) de la 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (**83**).



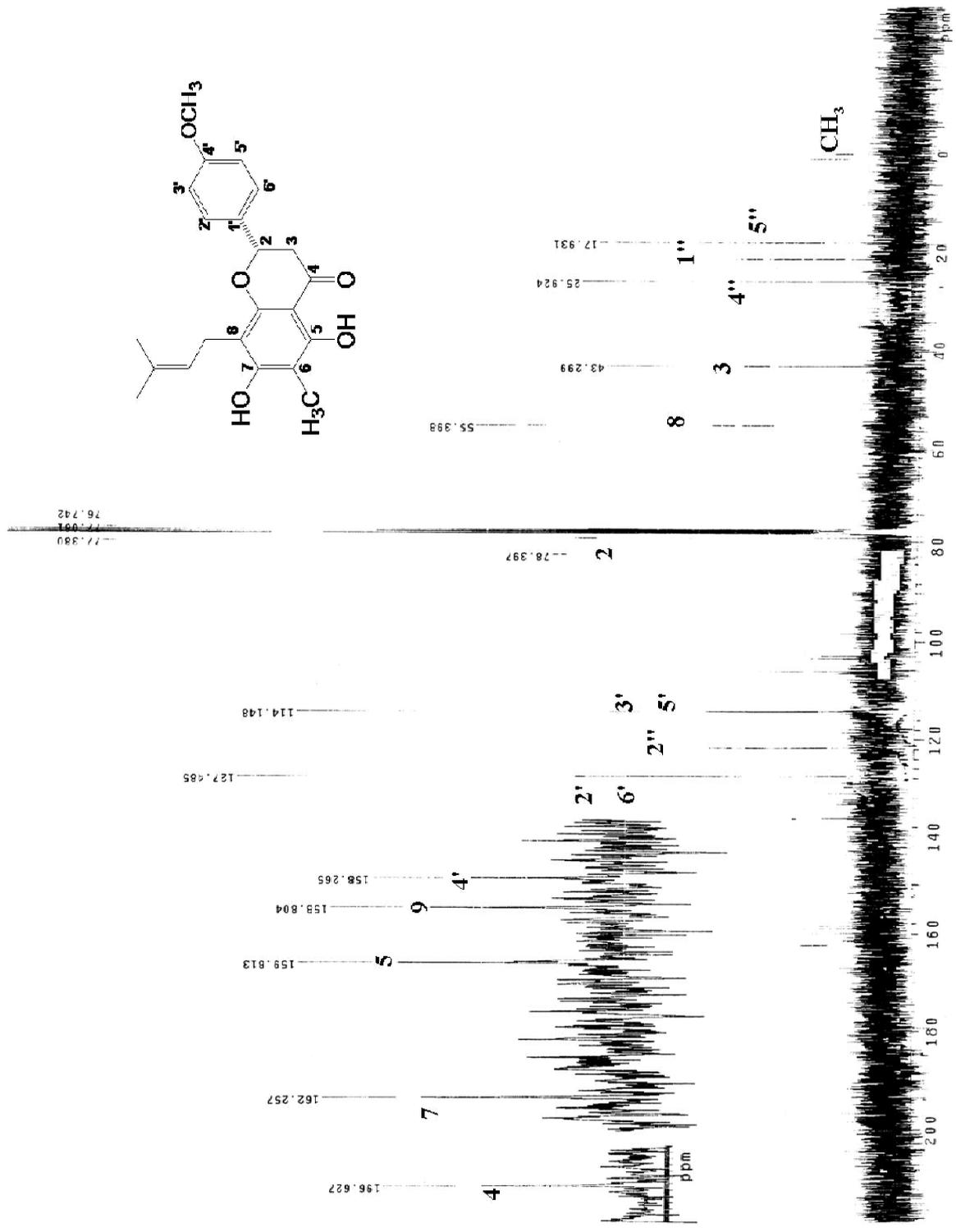
Espectro 12. EM (FAB⁺, V_{max}) de la 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (83).



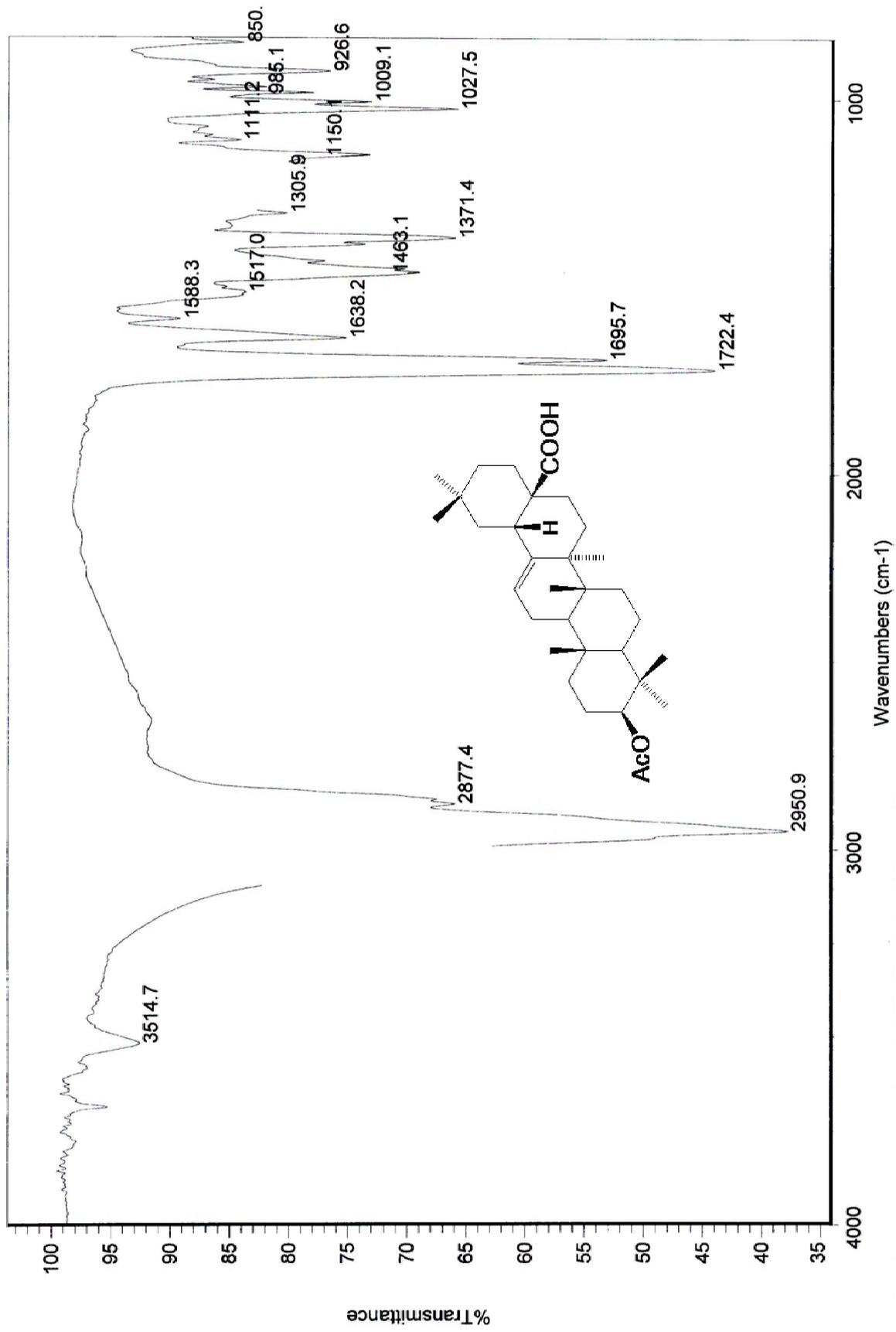
Espectro 13.IR (KBr, ν_{\max} cm⁻¹) de la (2S)-4'-O-metil-6-metil-8-prenilnaringina (85).



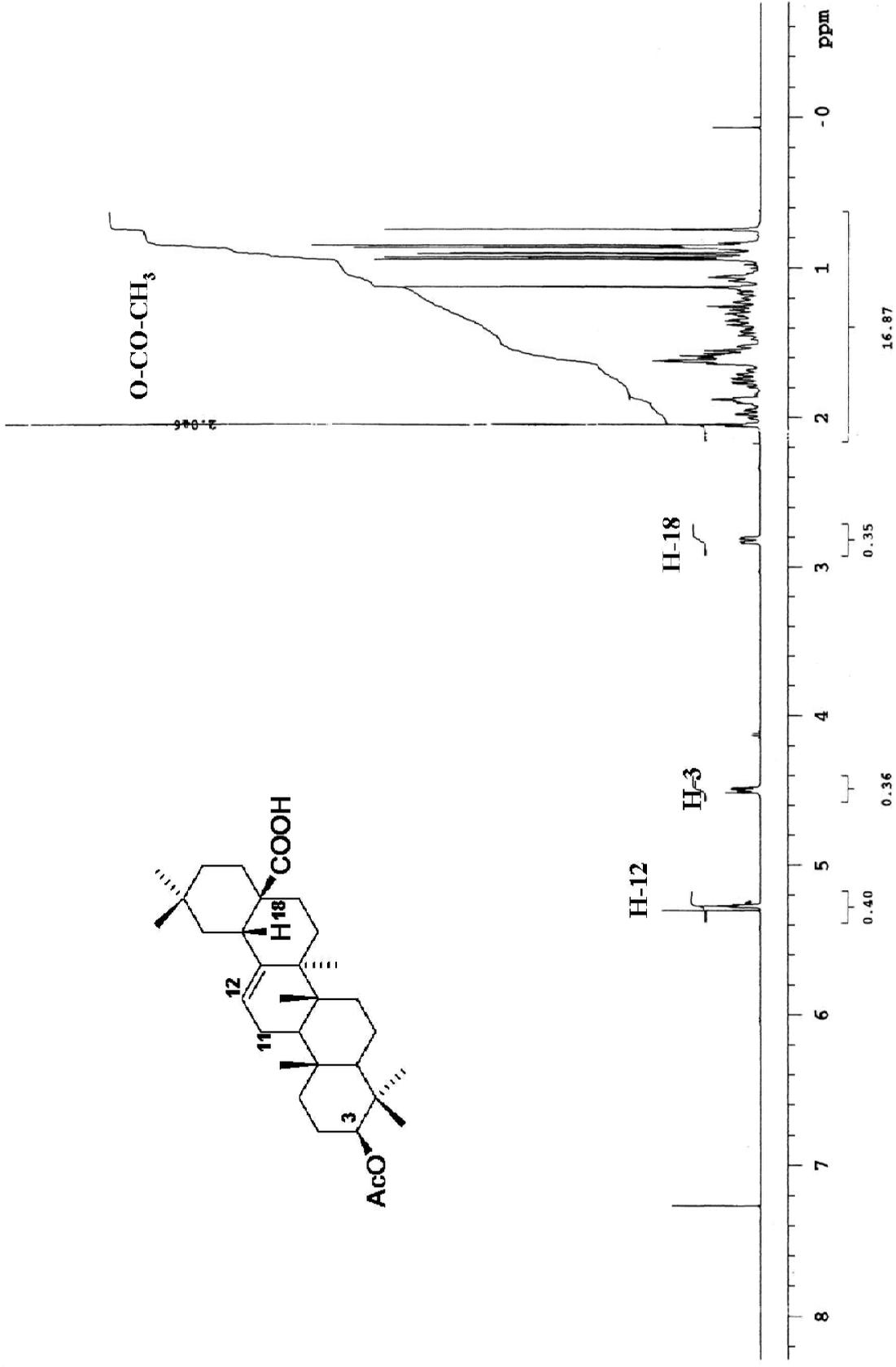
Espectro 14. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, TMS) de la (2S)- 4'-O-metil-6-metil-8-prenilnarigenina (85).



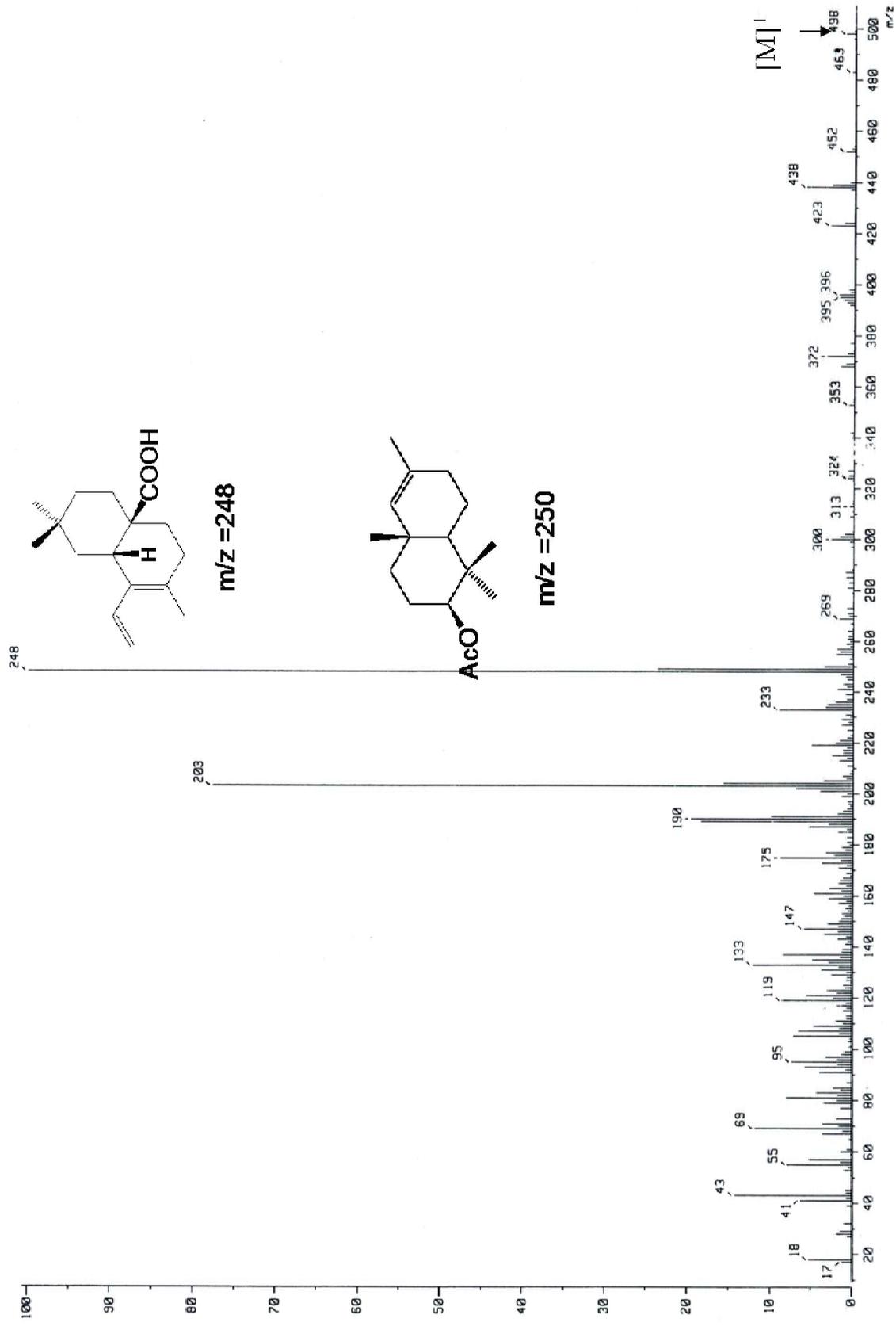
Espectro 15. RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5,7-dihidroxi-6-metil-4'-metoxi-8-prenilflavanona (85).



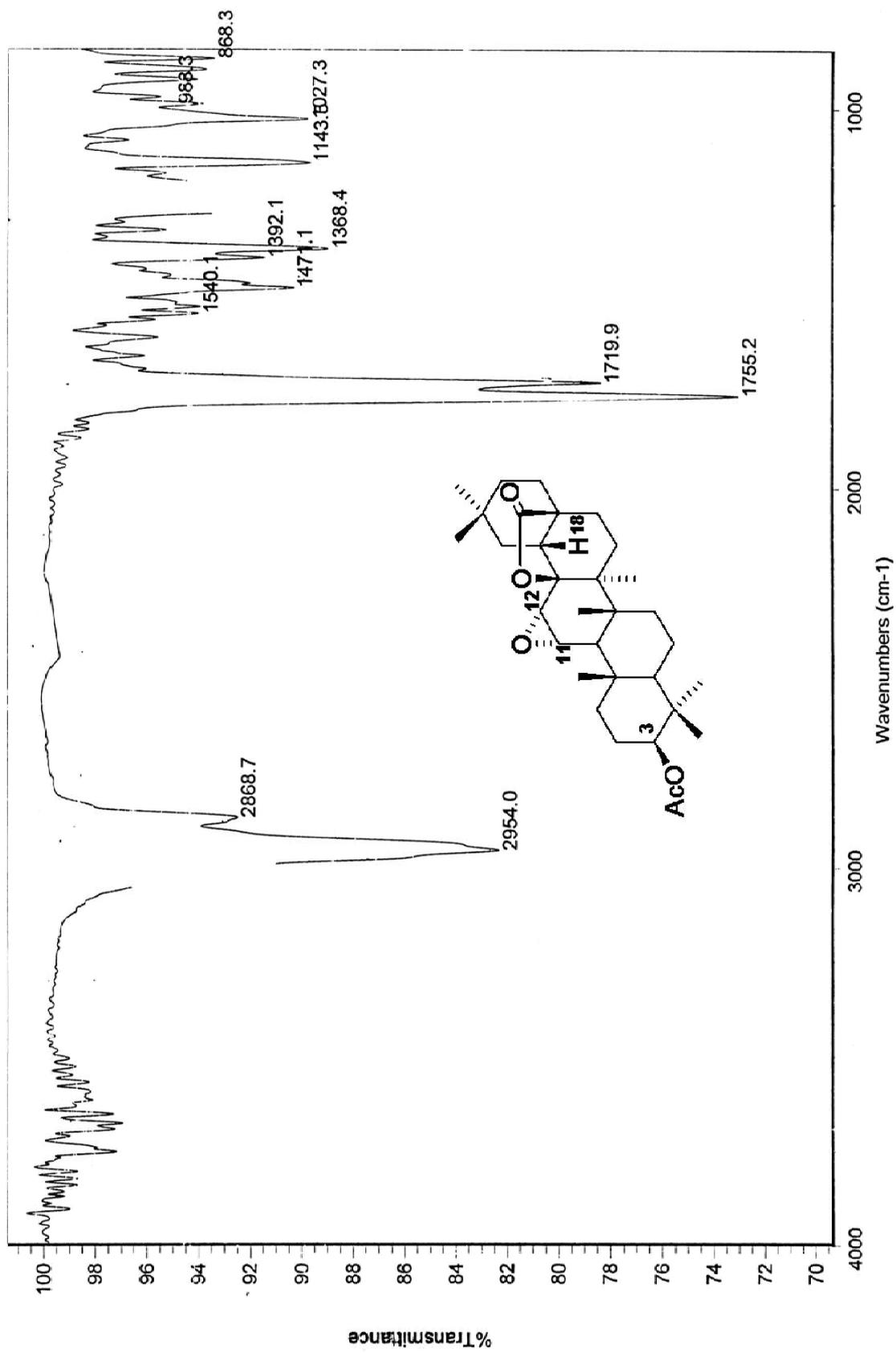
Espectro 16. IR (CHCl₃, ν_{max}) del ácido 3β-O-acetilooleanólico (88).



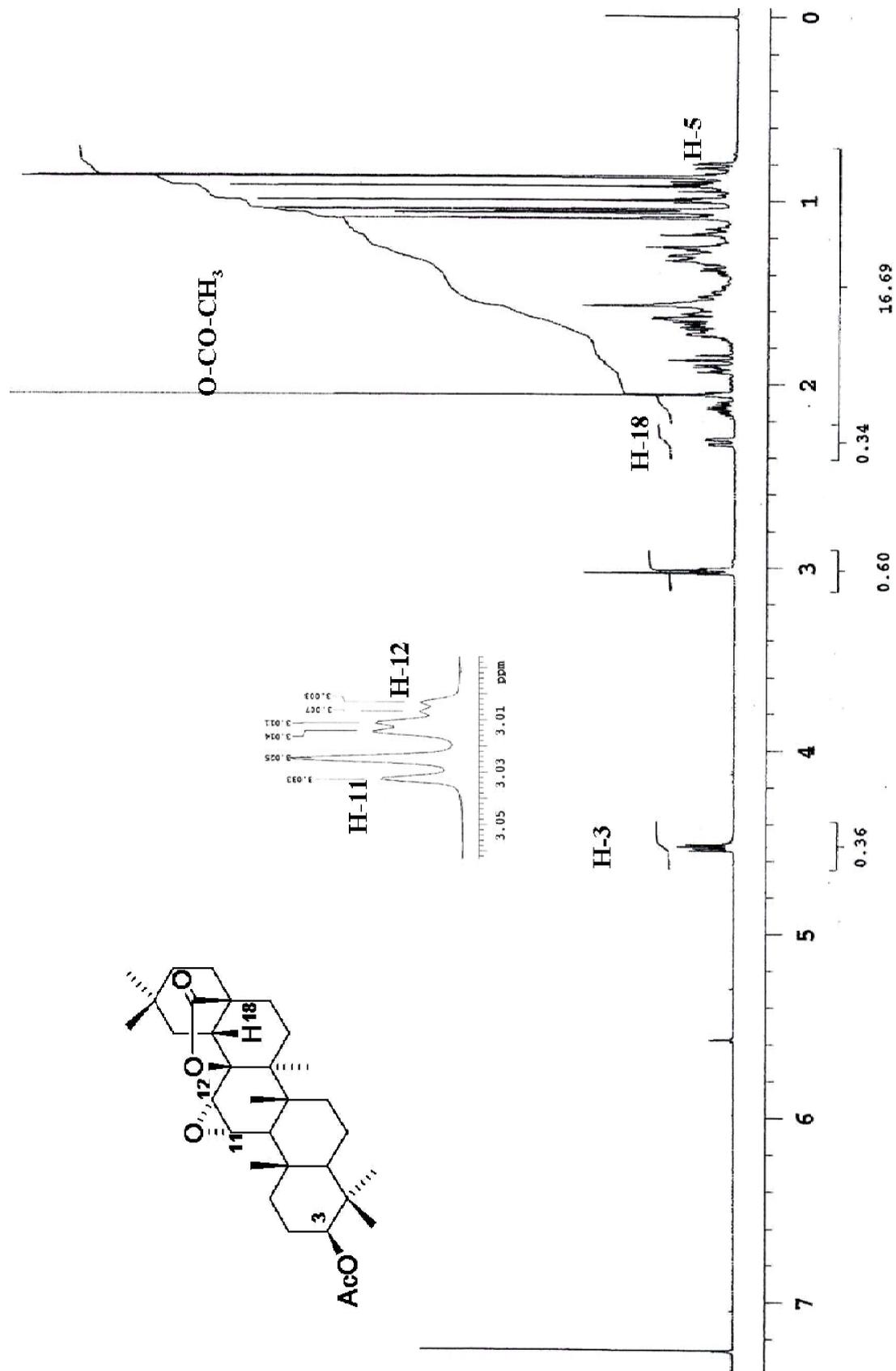
Espectro 17. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) del ácido 3β-O-acetiloleanólico (88).



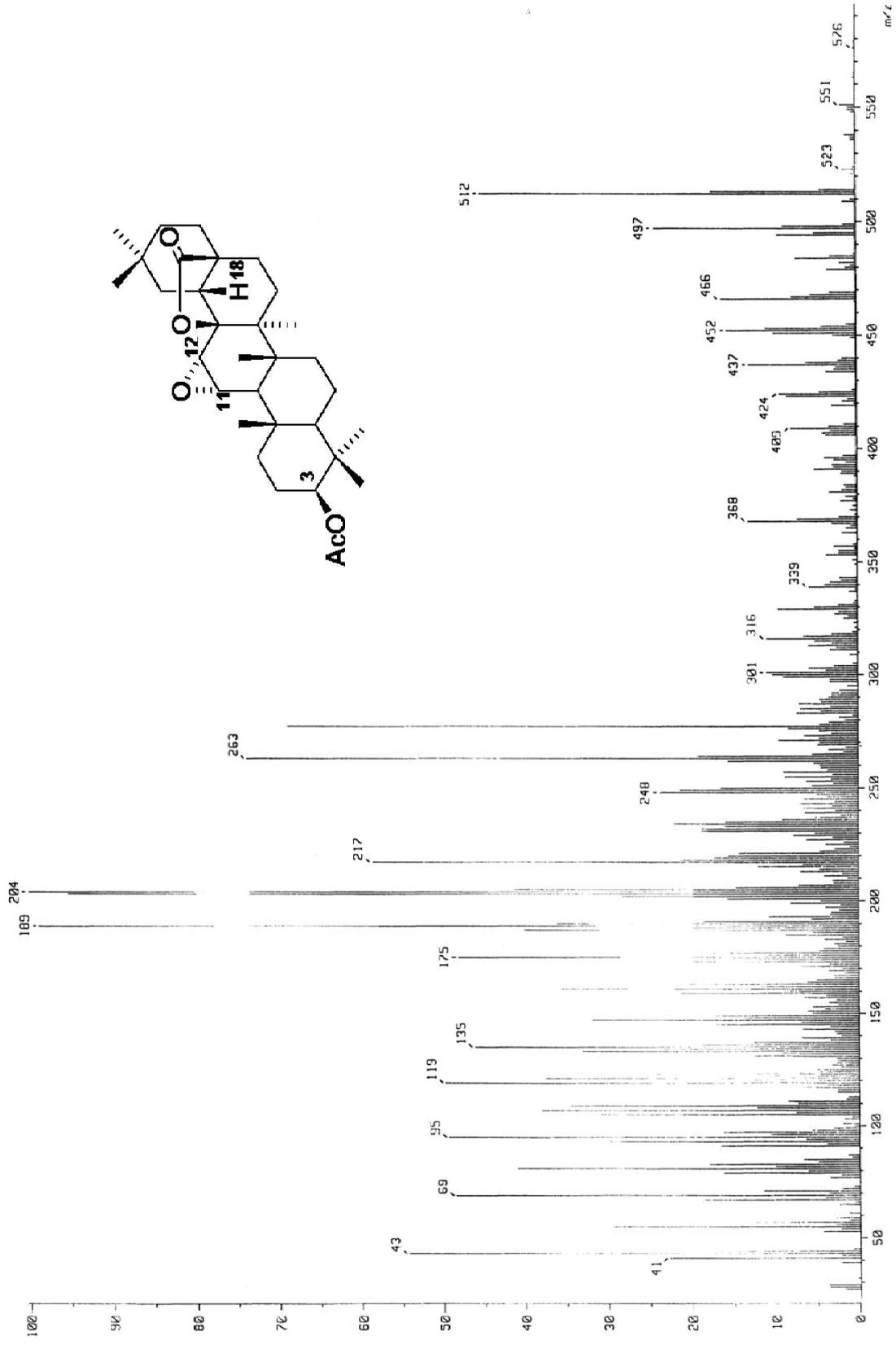
Espectro 18. EM (IE, v_{max}) del ácido 3β-O-acetiloleanólico (88).



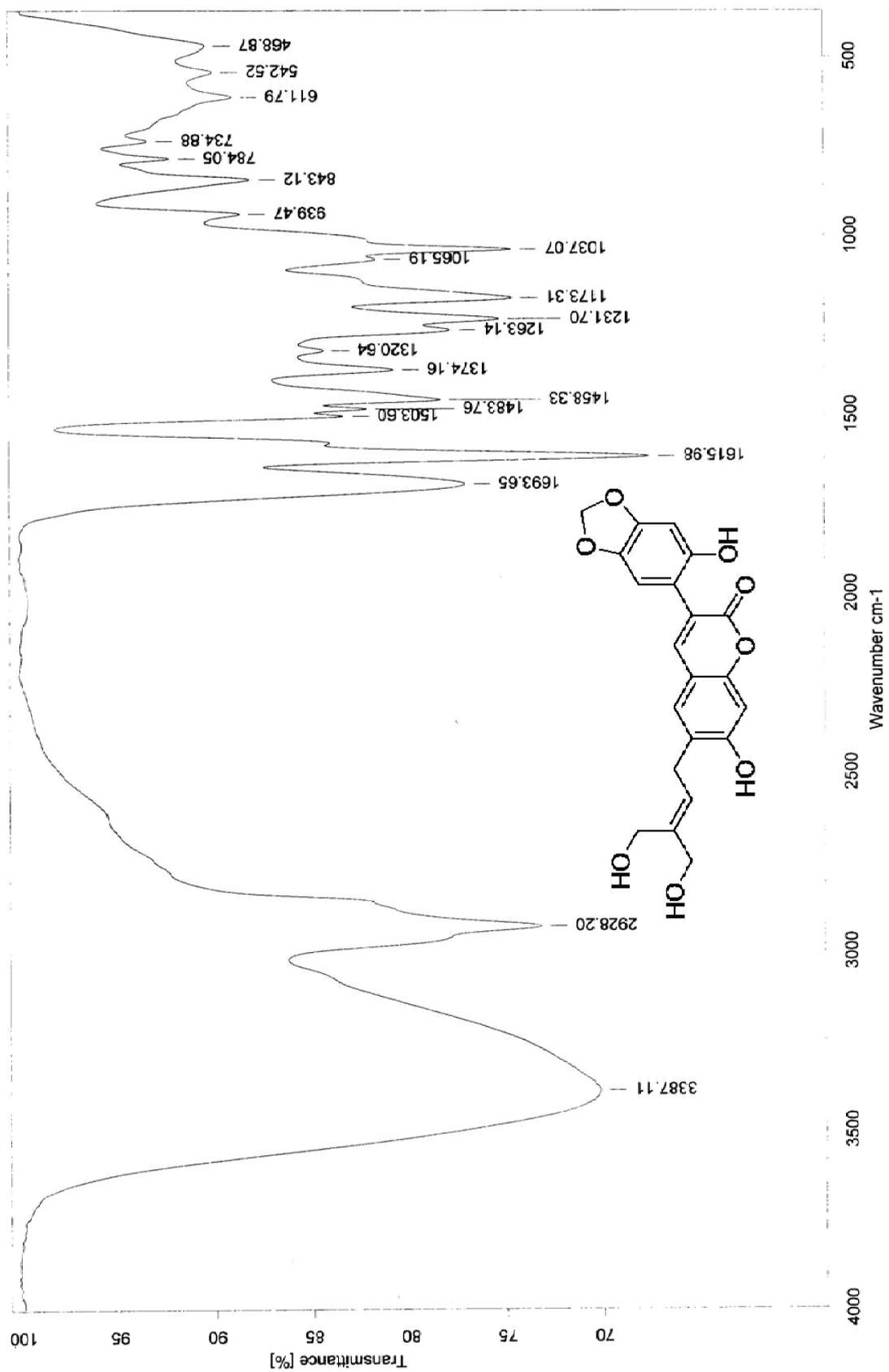
Espectro 19. IR (CHCl_3 , ν_{max}) de 3β-O-acetil-11α,12α-epoxi-oleanan-28,13β-ólida (**90**).



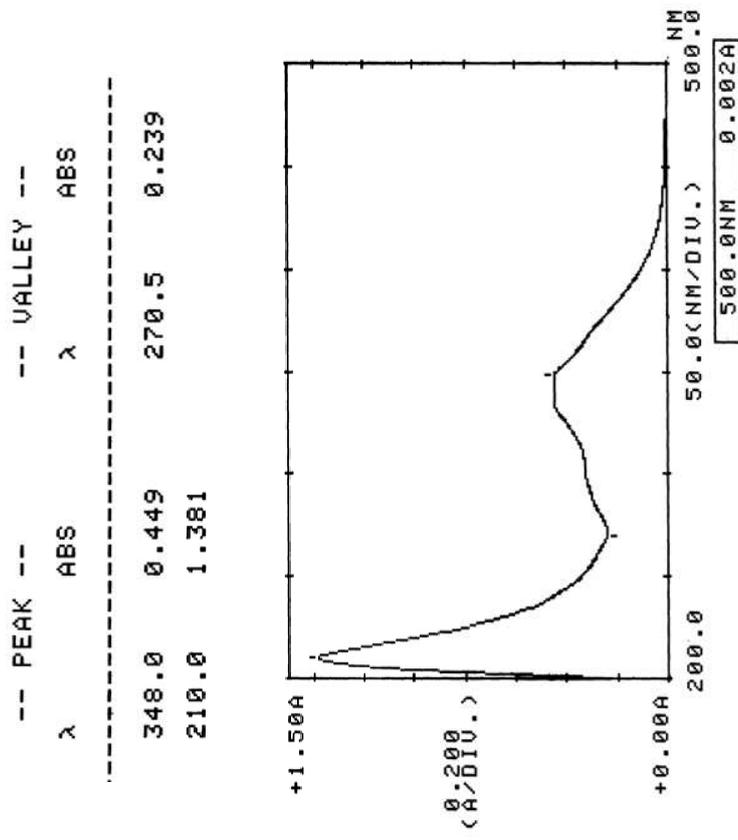
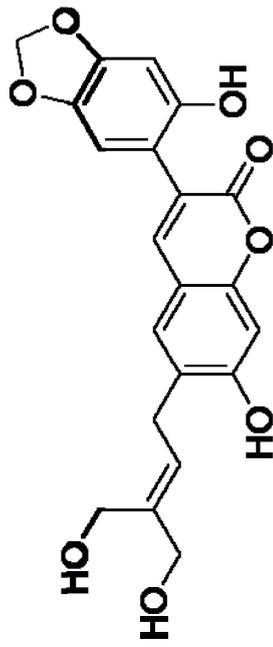
Espectro 20. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) de 3β-O-acetil-11α,12α-epoxi-oleanan-28,13β-ólida (90).



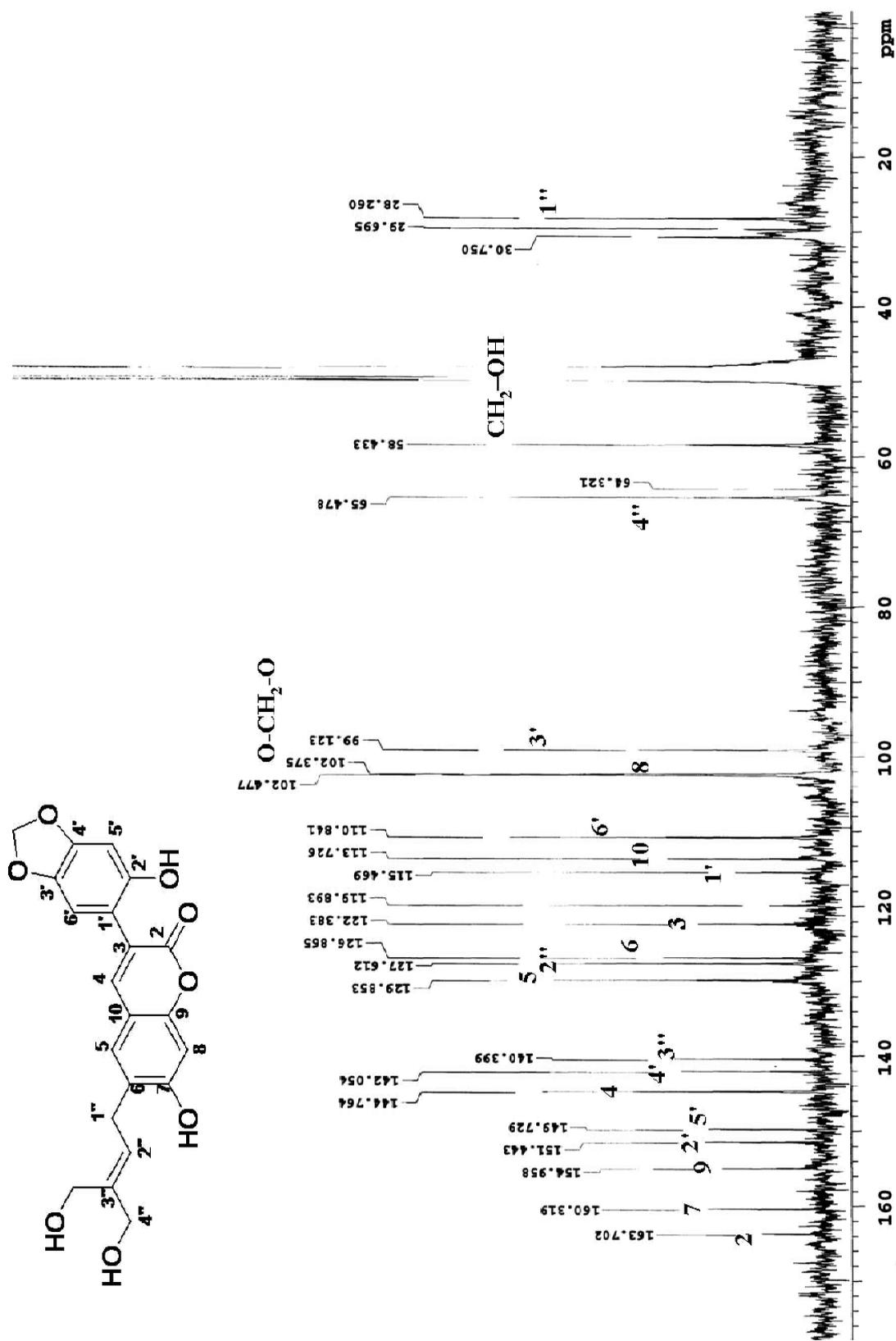
Espectro 21. EM (IE, v_{max}) de 3β-*O*-acetil-11α,12α-epoxi-oleanan-28,13β-ólida (90).



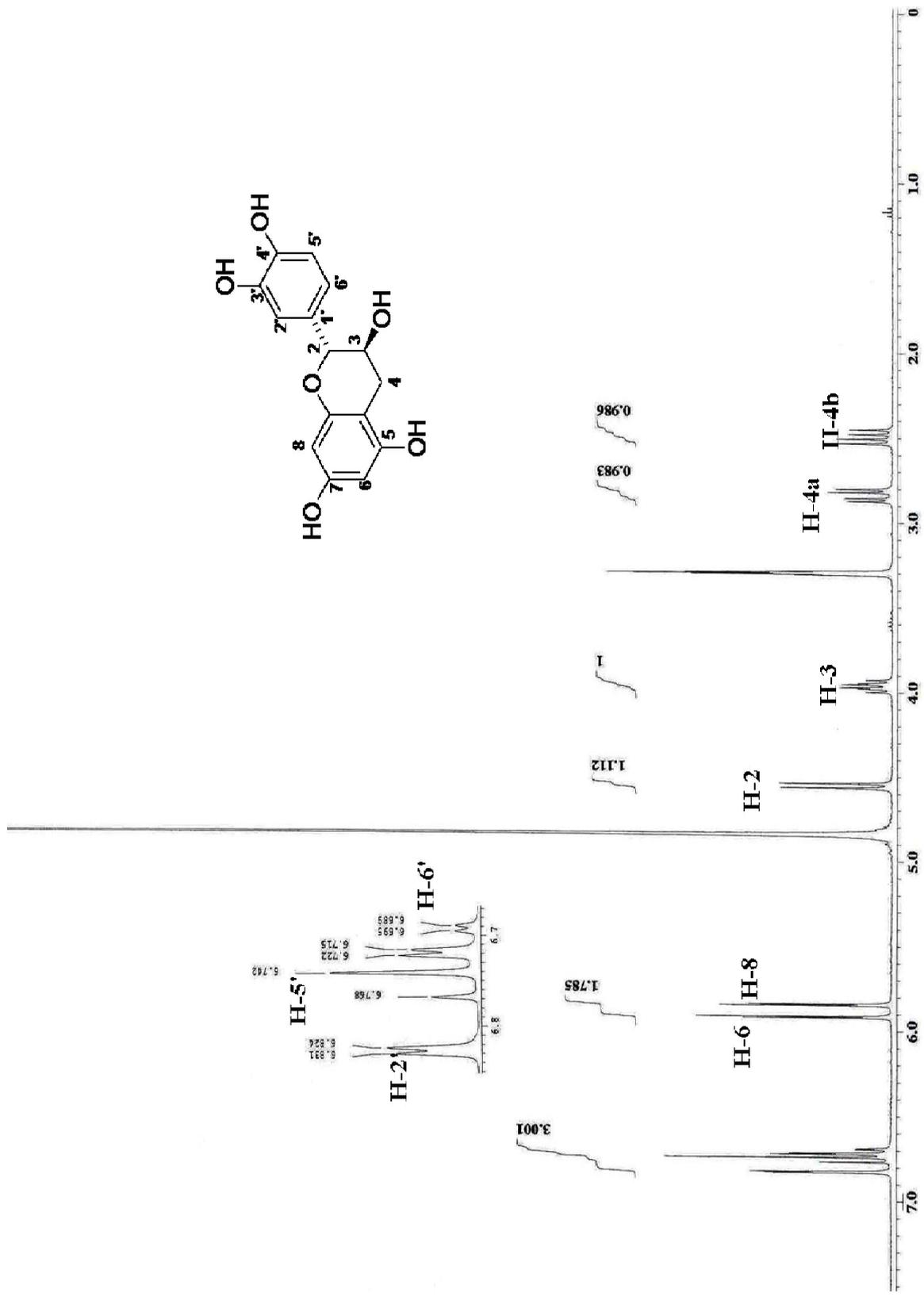
Espectro 22. IR (KBr, ν_{\max}) de 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxi-feni)-6-(3''-hidroxi-metil-4''-hidroxi-but-2''-enil)-7-hidroxi-cumarina (98).



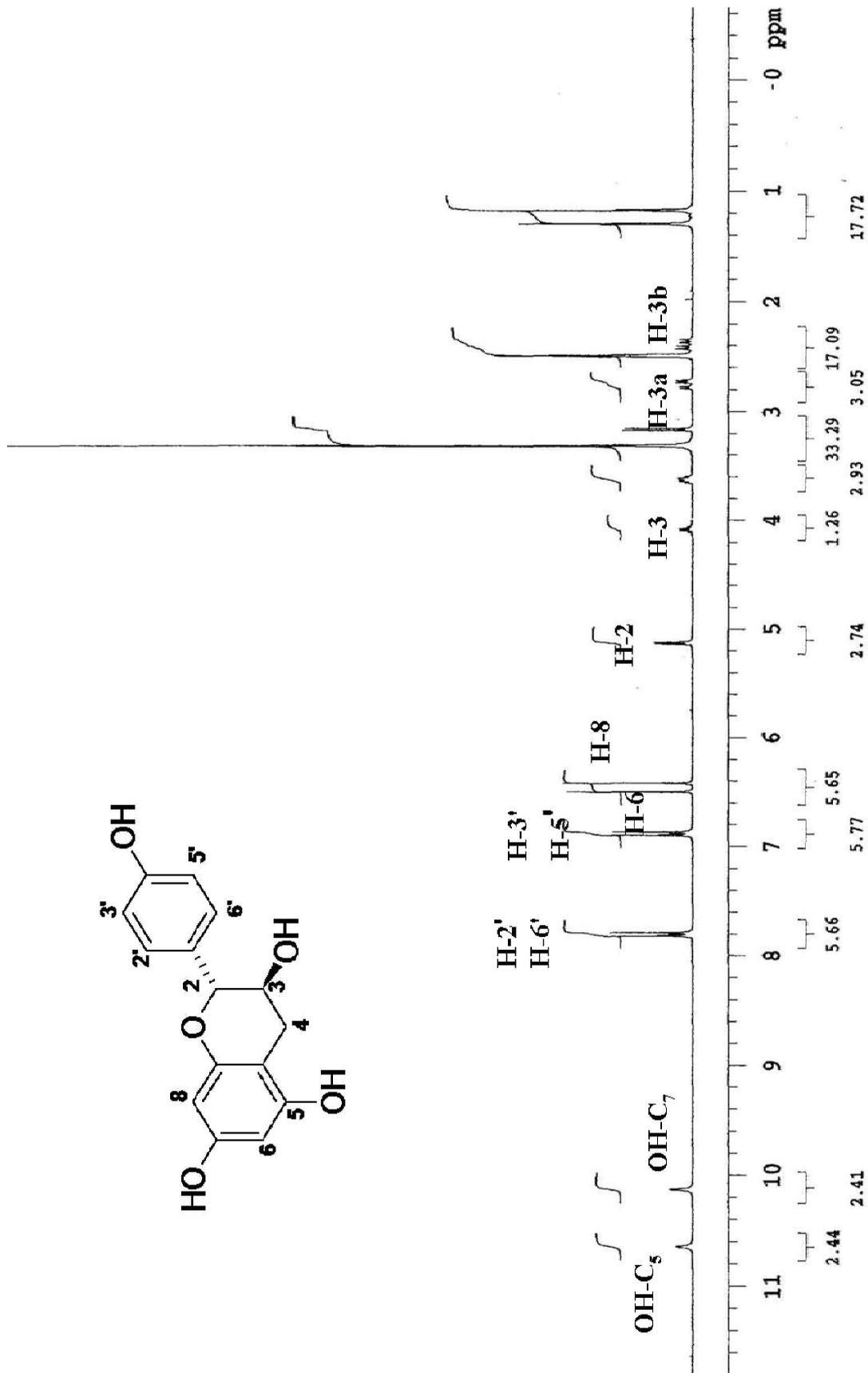
Espectro 23. UV (MeOH) de 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxiifenil)-6-(3''-hidroximetil-4''-hidroxibut-2''-enil)-7-hidroxicumarina (**98**).



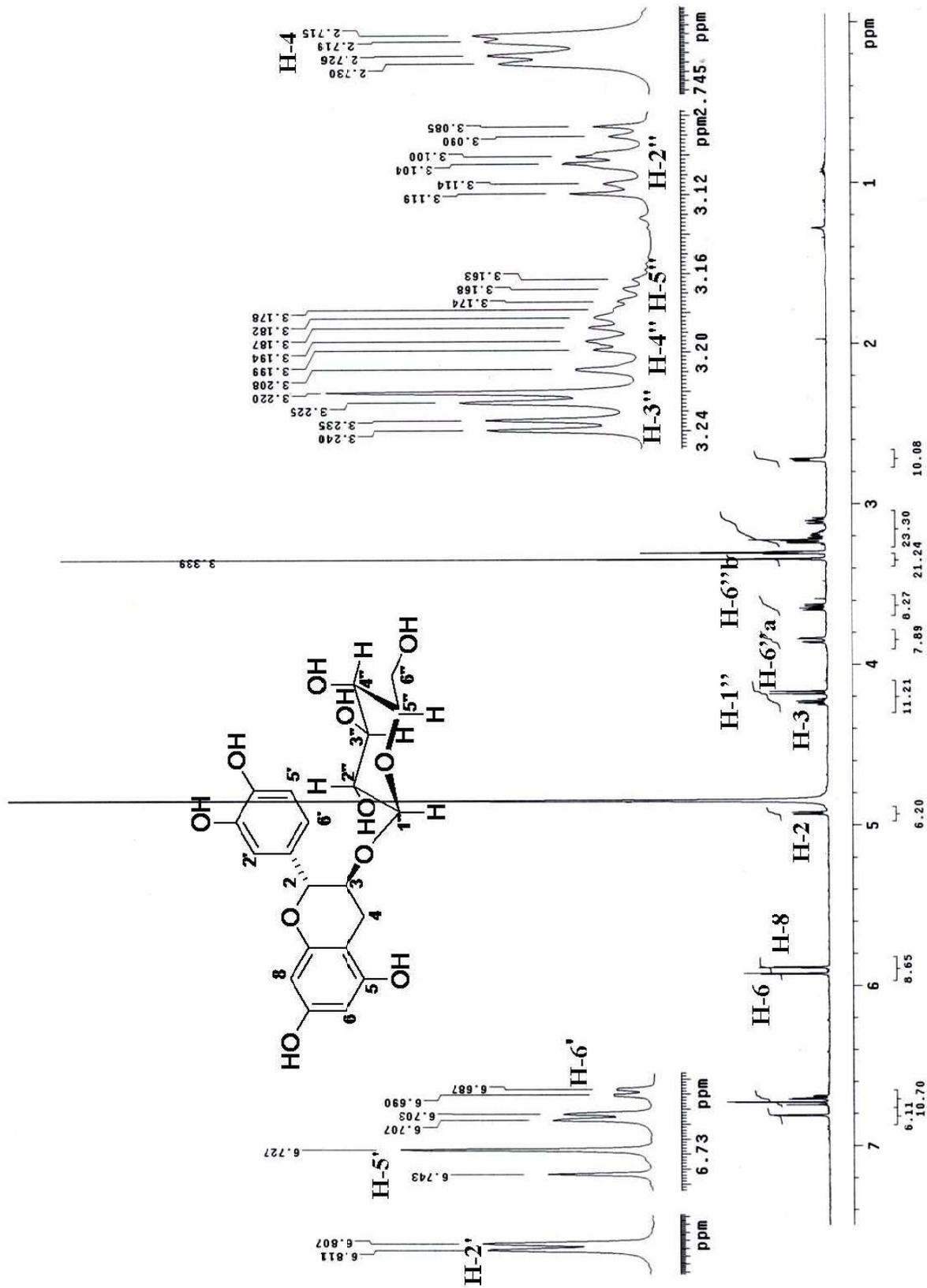
Espectro 25. RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD, TMS) de 3-(2'-hidroxi-4',5'-metilendioxiifenil)-6-(3''-hidroxiimetil-4''-hidroxiabut-2''-enil)-7-hidroxiumarina (98).



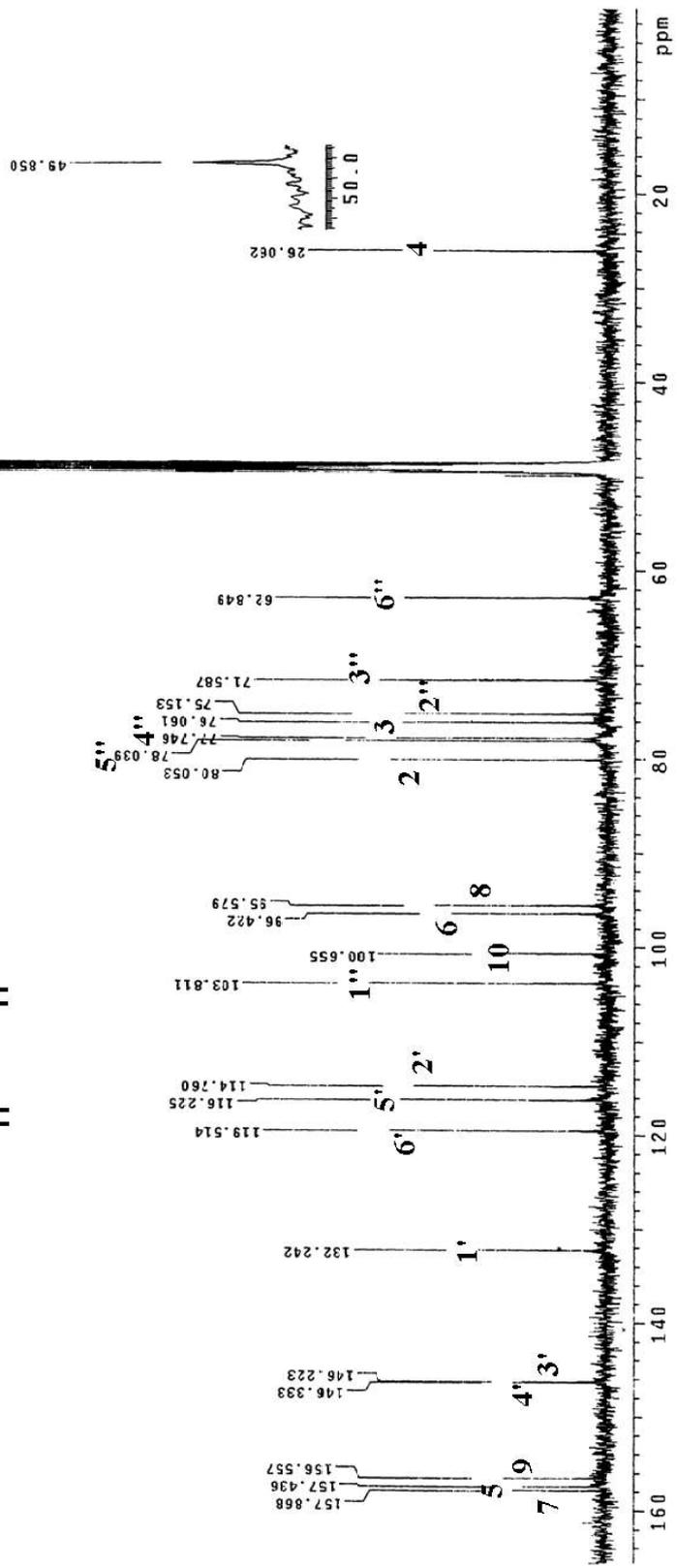
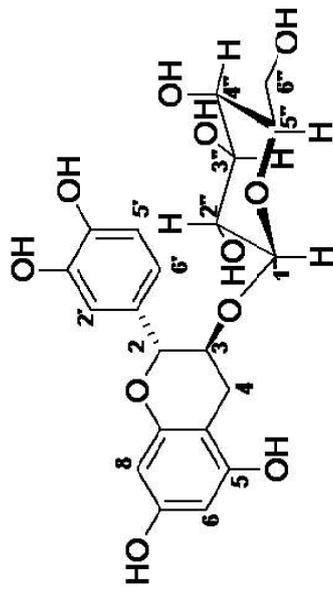
Espectro 26. RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , TMS) de (+)-catequina (99).



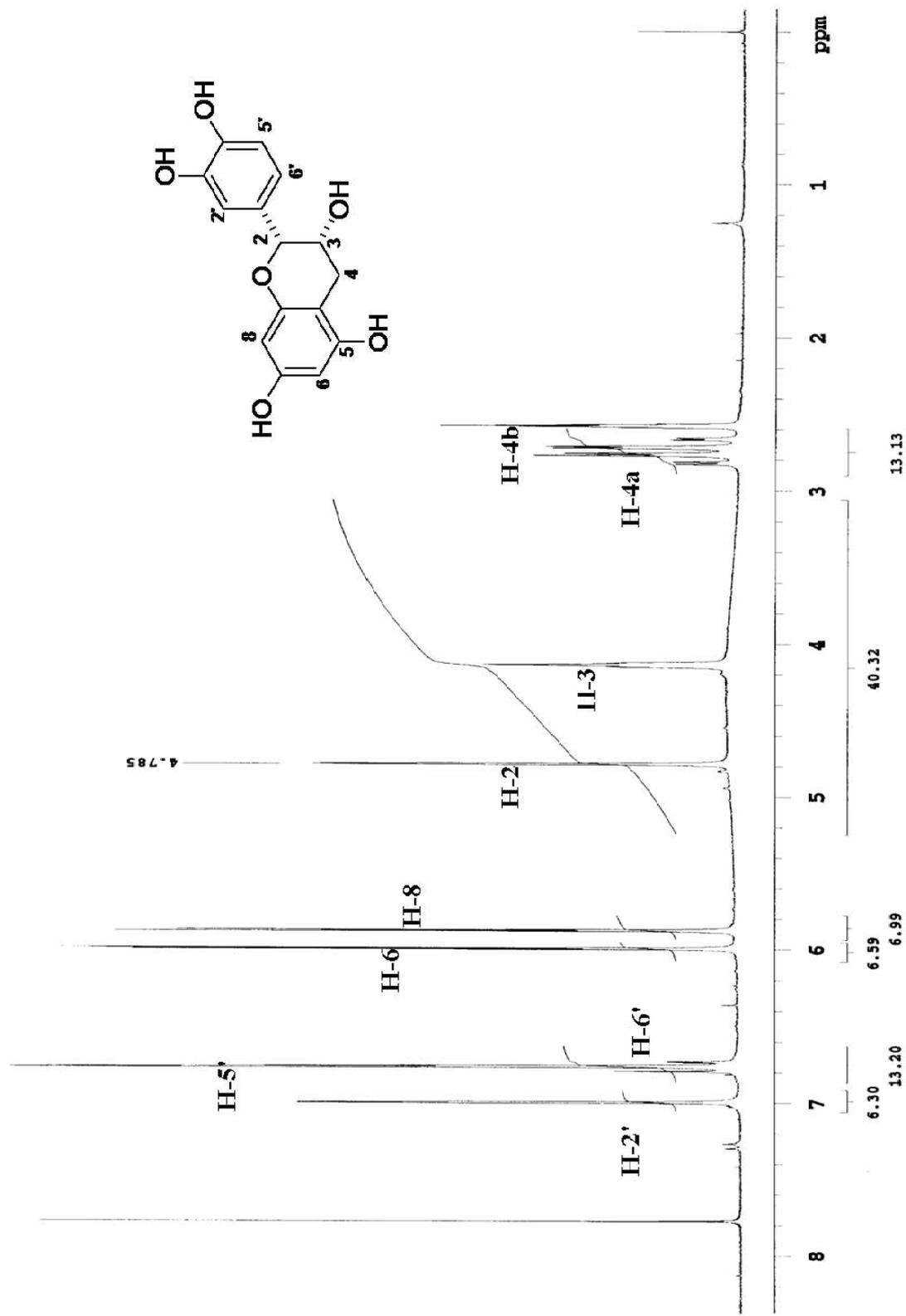
Espectro 27. RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, TMS) de (+)-afzelequina (100).



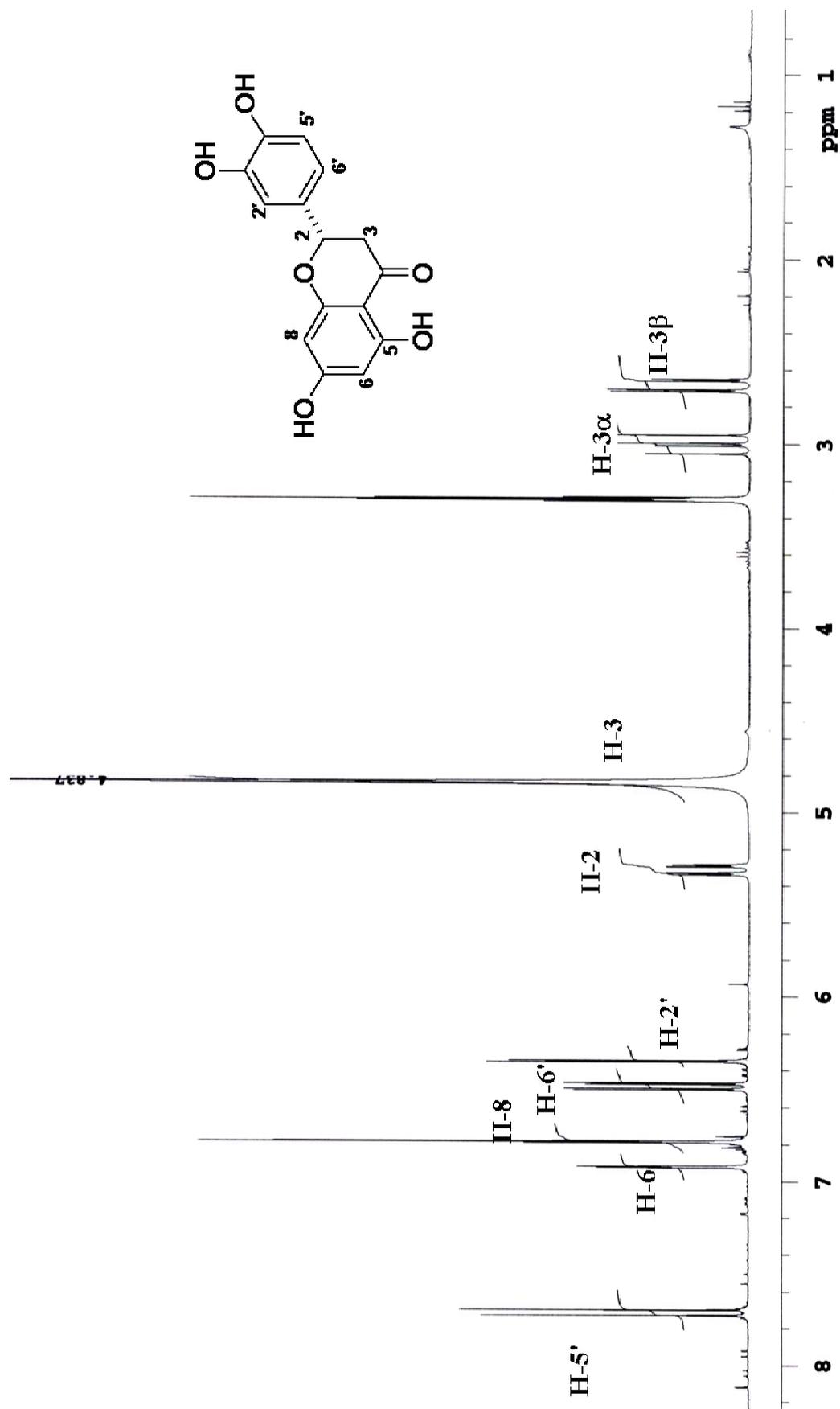
Espectro 28. RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD, TMS) de 3-O-β-D-galactopiranosido de la catequina (101).



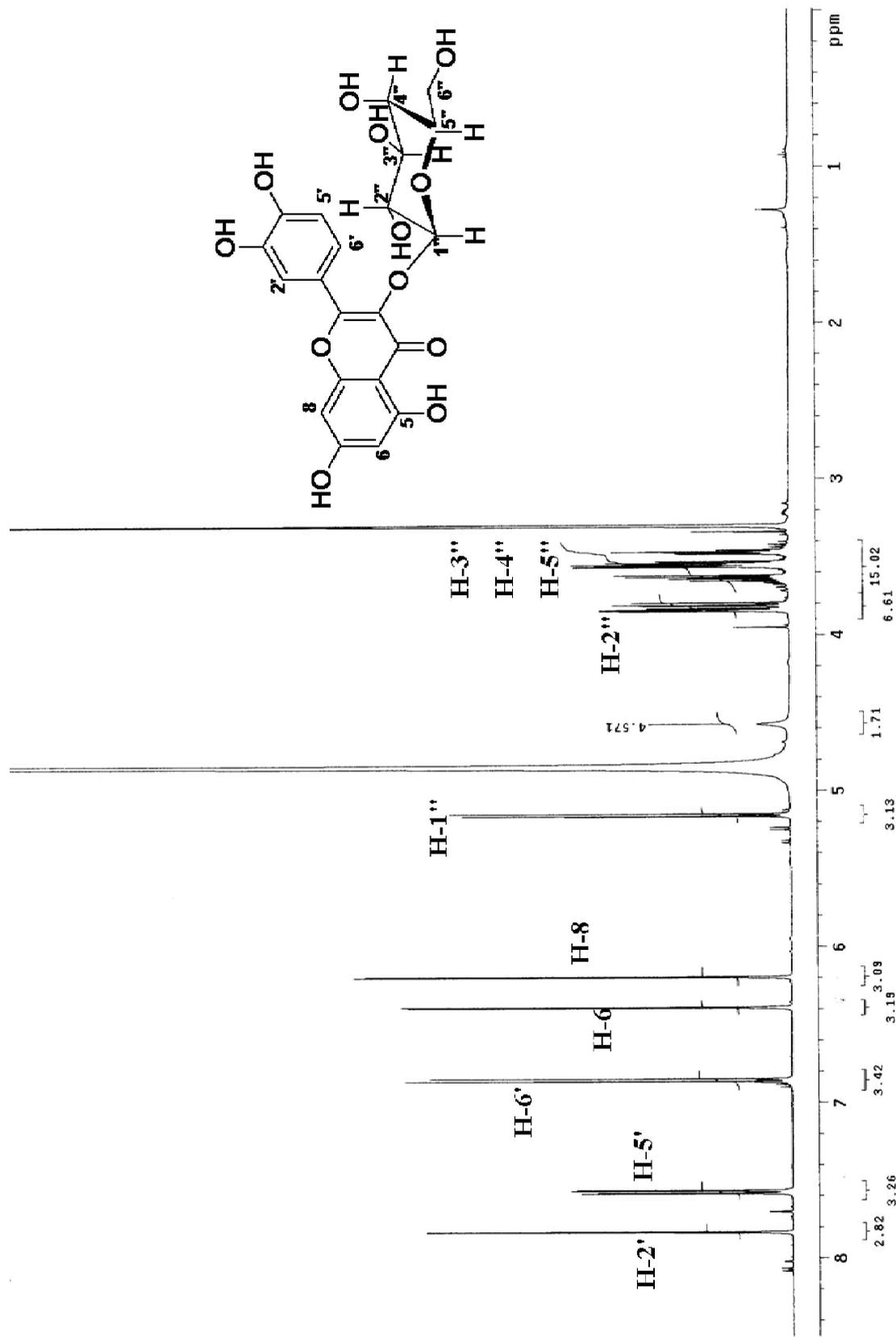
Espectro 29. RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , TMS) 3-O- β -D-galactopiranosido de la catequina (101).



Espectro 30. RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, TMS) de (-)-epicatequina (102).



Espectro 31. RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , TMS) de (-)-eriodictiol (103).



Espectro 32. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , TMS) de 3-O-β-D-galactopiranosido de la quercetina (**104**).

Evaluación del efecto de 90 y 98 sobre la actividad enzimática antioxidante en un modelo de diabetes experimental

CATALASA ($k\ s^{-1}\ mg^{-1}\ proteina$)

Rata	Control	STZ (50 mg/kg)	90 (100 mg/kg)	90 + STZ (100 mg/kg)	98 (100 mg/kg)	98 + STZ (100 mg/kg)
1	0.045890	0.0407	0.085600	0.101300	0.127300	0.161300
2	0.042100	0.0390	0.060200	0.081100	0.122300	0.174500
3	0.036100	0.0379	0.062200	0.068900	0.127700	0.183500
4	0.041100	0.0385	0.065100	0.098200	0.120800	0.196400
5	0.056300	0.0313	0.052100	0.073700	0.114900	0.198300
6	0.057800	0.0283	0.057700	0.086300	0.128900	0.197700
Media	0.0466	0.036	0.0638	0.0849	0.1237	0.1853
Desviación estándar	0.008727	0.004946	0.01155	0.01299	0.005363	0.01511
Error estándar	0.003563	0.002019	0.004714	0.005303	0.002189	0.006169

GLUTATION PEROXIDASA ($\mu\ mol\ NADPH/NADP^+\ min^{-1}\ mg^{-1}\ proteina$)

Rata	Control	STZ (50 mg/kg)	90 (100 mg/kg)	90 + STZ (100 mg/kg)	98 (100 mg/kg)	98 + STZ (100 mg/kg)
1	0.006800	0.0186	0.061000	0.082300	0.043500	0.038100
2	0.005000	0.0261	0.077900	0.086700	0.044600	0.037400
3	0.005300	0.0242	0.089900	0.078800	0.036000	0.037800
4	0.003900	0.0153	0.070800	0.079100	0.043600	0.036500
5	0.006000	0.0231	0.077500	0.085000	0.042200	0.035300
6	0.007100	0.0125	0.094400	0.091800	0.039500	0.031500
Media	0.0057	0.0199	0.0786	0.0839	0.0416	0.0361
Desviación estándar	0.001196	0.005381	0.01224	0.004961	0.003248	0.002471
Error estándar	0.0004881	0.002197	0.004999	0.002025	0.001326	0.001009

SUPERÓXIDO DISMUTASA CI₅₀^a

Rata	Control	STZ (50 mg/kg)	90 (100 mg/kg)	90 + STZ (100 mg/kg)	98 (100 mg/kg)	98 + STZ (100 mg/kg)
1	15.936	66.649	26.699	26.108	35.867	27.598
2	23.656	41.704	25.627	29.466	40.401	24.353
3	32.071	52.053	18.896	27.566	32.084	33.469
4	17.114	41.593	24.565	20.165	41.067	33.24
5	17.219	20.423	26.159	25.038	44.892	44.928
6	18.138	21.988	40.275	30.085	28.490	27.784
Media	20.69	40.74	27.04	26.40	37.13	31.90
Desviación estándar	6.201	17.69	7.078	3.610	6.134	7.299
Error estándar	2.532	7.223	2.890	1.474	2.504	2.980

^a Cantidad de SOD que inhibe la reducción de NBT al 50%

CONTROL

Muestra	PBS pH 7.4	Alicuota	mg prot./ml	Abs	% inhibición	Unidades	U totales	Actividad
1	4.3	0.5	7.997	0.037	740.909	14.818	127.436	15.936
2	6.4	0.5	8.756	0.040	809.091	16.182	207.127	23.656
3	9.1	0.5	9.441	0.041	831.818	16.636	302.782	32.071
4	5.9	0.5	9.590	0.035	695.455	13.909	164.127	17.114
5	5.9	0.5	9.843	0.036	718.182	14.364	169.491	17.219
6	6.1	0.5	10.273	0.038	763.636	15.273	186.327	18.138
Bco/Bco				0.004				

STREPTOZOTOCINA

Muestra	PBS pH 7.4	Alicuota	mg prot./ml	Abs	% inhibición	Unidades	U totales	Actividad
1	4	0.5	4.779	0.092	1990.909	39.818	318.545	66.649
2	4.5	0.5	4.865	0.054	1127.273	22.545	202.909	41.704
3	5	0.5	5.030	0.062	1309.091	26.182	261.818	52.053
4	4.7	0.5	4.890	0.052	1081.818	21.636	203.382	41.593
5	5.1	0.5	6.039	0.031	604.545	12.091	123.327	20.423
6	5.3	0.5	7.801	0.040	809.091	16.182	171.527	21.988
Bco/Bco			5.567	0.004				

EPOXILACTONA TRITERPENICA (90) SIN STZ

Muestra	PBS pH 7.4	Alicuota	mg prot./ml	Abs	% inhibición	Unidades	U totales	Actividad
1	5.3	0.5	8.337	0.023	1050.000	21.000	222.600	26.699
2	5.2	0.5	9.795	0.026	1206.750	24.135	251.004	25.627
3	4.1	0.5	10.024	0.025	1155.000	23.100	189.420	18.896
4	5.3	0.5	9.774	0.025	1132.500	22.650	240.090	24.565
5	4.8	0.5	9.909	0.029	1350.000	27.000	259.200	26.159
6	6	0.5	7.896	0.029	1325.000	26.500	318.000	40.275
Bco/Bco			9.289	0.002	0.000			27.037

EPOXILACTONA TRITERPENICA (90) CON STZ

Muestra	PBS pH 7.4	Alicuota	mg prot./ml	Abs	% inhibición	Unidades	U totales	Actividad
1	5.1	0.5	7.423	0.021	950.000	19.000	193.800	26.108
2	5	0.5	7.512	0.024	1106.750	22.135	221.350	29.466
3	4.7	0.5	9.889	0.031	1450.000	29.000	272.600	27.566
4	5.2	0.5	10.650	0.023	1032.500	20.650	214.760	20.165
5	4.9	0.5	9.785	0.027	1250.000	25.000	245.000	25.038
6	6.3	0.5	9.884	0.026	1180.000	23.600	297.360	30.085
Bco/Bco			9.191	0.002	0.000			26.405

3-ARIL-6-PRENILCUMARINA (98) SIN STZ

Muestra	PBS pH 7.4	Alicuota	mg prot./ml	Abs	% inhibición	Unidades	U totales	Actividad
1	3.8	0.5	9.868	0.170	2328.571	46.571	353.943	35.867
2	4.3	0.5	10.096	0.173	2371.429	47.429	407.886	40.401
3	3.7	0.5	10.412	0.165	2257.143	45.143	334.057	32.084
4	4.4	0.5	10.286	0.175	2400.000	48.000	422.400	41.067
5	5	0.5	10.374	0.170	2328.571	46.571	465.714	44.892
6	3.7	0.5	10.241	0.145	1971.429	39.429	291.771	28.490
Bco/Bco			10.213	0.007	2276.190			37.133

3-ARIL-6-PRENILCUMARINA (98) CON STZ

Muestra	PBS pH 7.4	Alicuota	mg prot./ml	Abs	% inhibición	Unidades	U totales	Actividad
1	7.1	0.5	9.261	0.050	900.000	18.000	255.600	27.598
2	3.5	0.5	9.009	0.083	1567.000	31.340	219.380	24.353
3	4.6	0.5	8.730	0.084	1588.000	31.760	292.192	33.469
4	4.6	0.5	7.567	0.073	1367.000	27.340	251.528	33.240
5	5.9	0.5	7.984	0.081	1520.000	30.400	358.720	44.928
6	4.4	0.5	9.464	0.080	1494.000	29.880	262.944	27.784
Bco/Bco			8.669	0.005	0.000			31.895

8. REFERENCIAS

1. Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **1999**, *48*, 1-9.
2. Jay, D.; Hitomi, H.; Griendling, K. K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Rad. Biol. Med.* **2006**, *40*, 183-192.
3. Rice-Evans, C. K.; Burdon, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lip. Res.* **1993**, *32*, 71-110.
4. James, A. M.; Murphy, M. P. How mitochondrial damage affects cell function. *J. Biom. Sci.* **2002**, *9*, 475-487.
5. Martin-Gallan, P.; Carrascosa, A.; Gussinye, M.; Dominguez, C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Rad. Biol. & Med.* **2003**, *34*, 1563-1574.
6. Rendell, M. S.; Kirchain, W. R. Pharmacotherapy of type 2 Diabetes Mellitus. *Ann. Pharmacother.* **2000**, *34*, 878-895.
7. Triggiani, V.; Resta, F.; Guastamacchia, E.; Sabba, C.; Licchelli, B.; Ghiyasaldin, S.; Tafaro, E. Role of antioxidants, essential fatty acids, carnitine, vitamins, phytochemicals and trace elements in the treatment of diabetes mellitus and its chronic complications. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2006**, *6*, 77-93.
8. Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *99*, 325-348.
9. Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México. Botas, México, 1959, pp 469-470.
10. Alarcón-Aguilar, F. J.; Román-Ramos, R.; Pérez-Gutiérrez, S.; Aguilar-Contreras, A.; Contreras-Weber, C. C.; Flores-Saenz, J. L. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *61*, 101-110.
11. Alvarez, L.; Rios, M. Y.; Esquivel, C.; Chávez, M. I.; Delgado, G.; Aguilar, M. I.; Villarreal, M. L.; Navarro, V. Cytotoxic isoflavans from *Eysenhardtia polystachya*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 767-770.
12. Alvarez, L.; Delgado, G. C- and O-Glycosyl- α -hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 681-687.

13. Aguilar, C. A.; Xolalpa, M. S. La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. *Ciencia* **2002**, *53*, 24-35
14. Swantson-Flatt S. K.; Day, C.; Bailey, C. J.; Flatt, P. R. Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice. *Acta Diabetol. Lat.* **1989**, *26*, 51-55.
15. Latha M.; Par, L. Preventive effects of *Cassia auriculata* L. flowers on brain lipid peroxidation in rats treated with streptozotocin. *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, *243*, 23-28.
16. Manonmania, G.; Bhavapriya, V.; Kalpana, S.; Govindasamy, S.; Apparanthamb, T. Antioxidant activity of *Cassia fistula* (Linn.) flowers in alloxan induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 39-42.
17. Giugliano, D.; Paolisso, G.; Ceriello, A. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* **1996**, *19*, 257-263.
18. Hernández-Avila, M.; Olaíz, F. G. La diabetes y el mexicano: un reto para la salud pública. *Ciencia* **2002**, *5*, 8-17.
19. Landeros, O. E. El panorama epidemiológico de la diabetes mellitus. *Rev. Mex. Enf. Car.* **2000**, *8*, 56-59.
20. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **2004**, *27*, S5-S10.
21. Robertson, R. P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 42351-42354.
22. Robertson, R. P.; Harmon, J. S. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet β cell. *Free Rad. Biol. Med.* **2006**, *41*, 177-184.
23. Wolff, S. P.; Dean, R. T. Glucose autoxidation and protein modification. *Biochem. J.* **1987**, *245*, 243-250.
24. Boullier, A.; Bird, D. A.; Chang, M. K.; Dennis, E. A.; Friedman, P.; Gillot-Taylor, K.; Horkko, S.; Palinski, W.; Quehenberger, O.; Shaw, P.; Steinberg, D.; Terpstra, V.; Witztum, J. L. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann. N Y Acad. Sci.* **2001**, *947*, 214-222.
25. Turko, I. V.; Marcondes, S.; Murad, F. Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2001**, *281*, H2289-2294.

26. Schultz J. J.; Harris, A. K.; Rychly, D. J.; Ergul, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiov. Diabetol.* **2005**, *4*, 1-11.
27. Lenzen, S.; Drinkgern, J.; Tiedge, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues, *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 463-466.
28. Kakkar, R.; Mantha, S. V.; Radhi, J.; Prasad K.; Kalra, J. Antioxidant defense system in diabetic kidney: A time course study. *Life Sci.* **1997**, *60*, 667-679.
29. Del Guerra, S.; Grupillo, S.; Masini, M.; Lupi, R.; Bugliani, M.; Torri, S.; Boggi, U.; Del Chiaro, M.; Vistoli, F.; Mosca, F.; Del Prato, S.; Marchetti, P. Gliclazide protects human islet beta-cells from apoptosis induced by intermittent high glucose. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2007**, *23*, 234-238.
30. Krauss, H.; Koźlik, J.; Grzymisławski, M.; Sosnowski, P.; Mikrut, K.; Piątek, J.; Paluszak, J. The influence of glimepiride on the oxidative state of rats with streptozotocin-induced hyperglycemia *Med. Sci. Monit.* **2003**, *9*, BR389-393.
31. Gumieniczek, A. Effect of the new thiazolidinedione-pioglitazone on the development of oxidative stress in liver and kidney of diabetic rabbits. *Life Sci.* **2003**, *74*, 553-562.
32. Tsubouchi, H.; Inoguchi, T.; Inuo, M.; Kakimoto, M.; Sonta, T.; Sonoda, N.; Sasaki, S.; Kobayashi, K.; Sumimoto, H.; Nawata, H. Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic β -cell line, MIN6- a role of NAD(P)H oxidase in β -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *326*, 60-65.
33. Triggiani, V.; Resta, F.; Guastamacchia, E.; Sabba, C.; Licchelli, B.; Ghiyasaldin, S; Tafaro, E. Role of antioxidants, essential fatty acids, carnitine, vitamins, phytochemicals and trace elements in the treatment of diabetes mellitus and its chronic complications. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2006**, *6*, 77-93.
34. Liu, R. H.; Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 3479S-3485S.
35. Halliwell, B. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Curiosity, Cause, or Consequence? *Lancet* **1994**, *344*, 721-724.
36. Doyle, J. J.; Doyle, J. L.; Ballenger, J. A.; Dickson, E. E.; Kajita, T.; Ohashi, H. A. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: Taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *Am. J. Bot.* **1997**, *84*, 541-554.

37. Souza, M.; Delgado, A. Mexican Leguminosae: phytogeography, endemism and origins en Ramamoorthy, T. P.; Bye R.; Lot, A.; Fa, J. Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford Univesity Press. Ney York, 1993, pp. 459-511.
38. Sabu, M. C.; Kuttan, R. Antidiabetic activity of *Aegle marmelos* and its relationship with its antioxidant properties. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **2004**, *48*, 81-88.
39. Ramesh, B.; Pugalendi, K. V. Antioxidant role of umbelliferone in STZ-diabetic rats. *Life Sci.* **2006**, *79*, 306-310.
40. Anwar, M. M.; Meki, A. R. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp. Biochem. Physiol. A* **2003**, *135*, 347-539.
41. Augusti, K. T.; Sheela, C. G. Antiperoxide effect of S-allyl cysteine sulfoxide, an insulin secretagogue, in diabetic rats. *Experientia* **1996**, *52*, 115-120.
42. Can, A.; Akev, N.; Ozsoy, N.; Bolkent, S.; Arda, B. P. Yanardag, R.; Ohyar, A. Effect of *Aloe vera* leaf gel and pulp extracts on the liver in type-II diabetic rat models. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 694-698.
43. Kaleem, M.; Asif, M.; Ahmed, Q. U.; Bano, B. Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Med. J.* **2006**, *46*, 670-675.
44. Shih, C. C.; Wu, Y. W.; Lin, W. Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *Anoectochilus formosanus* in diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2002**, *29*, 684-688.
45. Yin, X.; Zhang, Y.; Yu, J.; Zhang, P.; Shen, J.; Qiu, J.; Wu, H. The antioxidative effects of *Astragalus* Saponin I protect against development of early diabetic nephropathy. *J. Pharmacol. Sci.* **2006**, *101*, 166-173.
46. Uličná, O.; Vančová, O.; Božek, P.; Čársky, J.; Šebeková, K.; Boor, P.; Nakano, M.; Greksák, M. Rooibos tea (*Aspalantathus linearis*) partially prevents oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Physiol. Res.* **2006**, *55*, 157-164.
47. Pushparaj, P. N.; Huat, T. B. K.; Hong, T. Ch. The mechanism of hypoglycemic action of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in streptozotocin-diabetic rats. *Life Sci.* **2001**, *70*, 535-547.
48. Gupta, S.; Kataria, M.; Gupta, P. K.; Murganandan, S.; Yashroy, R. C. Protective role of extracts of neem seeds in diabetes caused by streptozotocin in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *90*, 185-189.

49. Damasceno, D.C.; Volpato, G. T.; Paranhos, C. I de M.; Aguilar, R.; Cunha, R. M. V. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions *Phytomedicine* **2004**, *11*, 196-201.
50. De Souza, E.; Zanatta, L., Seifriz, I.; Creczynski-Pasa, B. T; Geraldo, P. M.; Szpoganicz, B.; Mena, S. R. M. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 829-832.
51. Yokozawa, T.; Kim, H. Y.; Cho, E. J.; Choi, J. S.; Chung, H. Y. Antioxidant effects of isorhamnetin 3,7-Di-O- β -D-glucopyranoside isolated from mustard leaf (*Brassica juncea*) in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5490-5495.
52. Roy, S.; Sehgal, R.; Padhy, B. M.; Kumar, V. L. Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *102*, 470-473.
53. Yadav, P.; Sarkar, S.; Bhatnagar, D. Action of *Capparis decidua* against alloxan-induced Oxidative stress and diabetes in rat tissues. *Pharmacol. Res.* **1997**, *36*, 221-228.
54. Singh, S. N.; Vats, P.; Suri, S.; Shyam, R.; Kumria, M. M. L.; S. Ranganathan, S.; K. Sridharan, K. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 269-277.
55. Sugiura, M.; Ohshima, M.; Ogawa, K.; Yano, M. Chronic administration of satsuma mandarin fruit (*Citrus unshiu* MARC.) improves oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat liver. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 588-591.
56. Venkateswaran, S.; Pari, L. Effect of *Coccinia indica* leaves on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *84*, 163-168.
57. Arun, N.; Nalini, N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum. Nut.* **2002**, *57*, 41-52.
58. Srinivasan, A.; Menon, V. P.; Viswanathan Periaswamy, V.; Rajasekaran, K. N. Protection of pancreatic β -cell by the potential antioxidant bis-o-hydroxycinnamoyl methane, analogue of natural curcuminoid in experimental diabetes. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2003**, *6*, 327-333.
59. Rao, T. P.; Sakaguchi, N.; Juneja, L. R.; Wada, E.; Yokozawa. T. Amla (*Emblca officinalis* Gaertn.) extracts reduce oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Med. Food* **2005**, *8*, 362-368

60. Ravi, K.; Ramachandran, B.; Subramanian S. Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1212-1217.
61. El-Missiry, M. A.; Gindy, A. M. Amelioration of alloxan induced diabetes mellitus and oxidative stress in rats by oil of *Eruca sativa* seeds. *Ann. Nutr. Metab.* **2000**, *44*, 97-100.
62. Ugochukwu, N. H.; Babady, N. E.; Cobourne, M.; Gasset, S. R. The effect of *Gongronema latifolium* extracts on serum lipid profile and oxidative stress in hepatocytes of diabetic rats. *J. Biosci.* **2003**, *28*, 1-5.
63. Ugochukwu, N. H.; Babady, N. E. Antihyperglycemic effect of aqueous and ethanolic extracts of *Gongronema latifolium* leaves on glucose and glycogen metabolism in livers of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* **2003**, *73*, 1925-1938.
64. Ananthan, R.; Baskar, C.; Narmatha Bai, V.; Pari, L.; Latha, M.; Ramkumar, K. M. Antidiabetic effect of *Gymnema montanum* leaves: effect on lipid peroxidation induced oxidative stress in experimental diabetes. *Pharmacol. Res.* **2003**, *48*, 551-556.
65. Fukuda, T.; Ito, H.; Yoshida, T. Effects of walnut polyphenol fraction on oxidative stress in type 2 diabetes mice. *Biofactors* **2004**, *21*, 251-253.
66. Prasad, K. Oxidative stress as a mechanism of diabetes in diabetic BB prone rats: Effect of secoisolariciresinol diglucoside (SDG). *Mol. Cell. Biochem.* **2000**, *209*, 89-96.
67. Da-Qing, J.; Gao, L. Jin-Sook, K.; Chul-Soon, Y.; Jung-Ae, K.; Keun, H. Preventive effects of *Laminaria japonica* aqueous extract on the oxidative stress and Xanthine oxidase activity in streptozotocin-induced diabetic rat liver. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1037-1040.
68. Luo, Q.; Cai, Y.; Yan, J.; Sun, M.; Corke, H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sci.* **2004**, *76*, 137-149.
69. Bartošiková L.; Nečas, J.; Suchý, V.; Kubínová, R.; Veselá, D.; Beneš, L.; Bartošik, T.; Illek, J.; Šalplachta, J.; Klusáková, J.; Bartošova, L.; Strnadová, V.; Fráňa, P.; Fráňová J. Monitoring of antioxidative effect of morine in alloxan-induced diabetes mellitus in the laboratory rat. *Acta Vet. Brno.* **2003**, *72*, 191-200.
70. Kamalakkannan, N.; Stanely, M. P. P. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of Rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *98*, 97-103.

71. Sathishsekar, D.; Subramanian, S. Beneficial effects of *Momordica charantia* seeds in the treatment of STZ-induced diabetes in experimental rats. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 978-983.
72. Kanter, M.; Coskun, O.; Korkmaz, A.; Oter, S. Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and β -Cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Anat. Rec. A* **2004**, *279A*, 685–691.
73. Al-Azzawie, H. F.; Mohamed-Saiel, S. A. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.* **2006**, *78*, 1371-1377.
74. Young, J. Y.; Ho, S. J.; Kyoo, S. Y.; Sook, H. E.; Soo, L. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol. Res.* **2000**, *42*, 361-371.
75. Venkateswaran, S.; Pari, L. Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* **2002**, *11*, 206-209.
76. Maritim, A.; Dene, B. A.; Sanders, R. A.; Watkins III, J. B. Effects of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats *J. Biochem. Mol. Tox.* **2003**, *17*, 193-199.
77. Vitor, R. F.; Mota-Filipe, H.; Teixeira, G.; Borges, C.; Rodrigues, A. I.; Teixeira, A.; Paulo, A. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *93*, 363-370.
78. Fu-Liang, X.; Xiao-Hui, S.; Lu, G.; Xiang-Liang, Y.; Hui-Bi, X. Puerarin protects rat pancreatic islets from damage by hydrogen peroxide. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *529*, 1–7.
79. Latha, M.; Pari, L. Modulatory effect of *Scoparia dulcis* in oxidative stress-induced lipid peroxidation in streptozotocin diabetic rats. *J. Med. Food* **2003**, *6*, 379-386.
80. Pari, L.; Latha, M. Protective role of *Scoparia dulcis* plant extract on brain antioxidant status and lipidperoxidation in STZ diabetic male Wistar rats. *BMC Comp. Alt. Med.* **2004**, *4*, 1-8.
81. Latha, M.; Pari, L.; Sitasawad, S.; Bhonde, R. *Scoparia dulcis*, a traditional antidiabetic plant, protects against streptozotocin induced oxidative stress and apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2004**, *18*, 261-272.
82. Soto, C.; Recoba, R.; Barrón, H.; Alvarez, C.; Favari, L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **2003**, *136*, 205-212.

83. Mainzen Prince, P. S.; Menon P. V.; Pari, L. Hypoglycaemic activity of *Syzigium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *61*, 1-7.
84. Osakabe, N.; Yamagishi, M.; Natsume, M.; Yasuda, A.; Osawa, T. Ingestion of proanthocyanidins derived from Cacao inhibits diabetes-induced cataract formation in rats. *Exp. Biol. Med.* **2004**, *229*, 33-39.
85. Quine, S. D.; Raghu, P. S. Effects of (–)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart. *Pharmacol. Rep.* **2005**, *57*, 610-615.
86. Amer, M.; El-Habibi, E.S.; El-Gendy, A. Effects of *Trifolium alexandrinum* extracts on streptozocin-induced diabetes in male rats. *Ann. Nutr. Metab.* **2004**, *48*, 343-347.
87. Genet, S.; Kale, R. K.; Baquer, N. Z. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: Effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Mol. Cell. Biochem.* **2002**, *236*, 7-12.
88. Iwai, K.; Onodera, A.; Matsue, H. Inhibitory effects of *Viburnum dilatatum* Thunb. (Gamazumi) on oxidation and hyperglycemia in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1002-1007.
89. Abdollahi, M.; Ranjbar, A.; Shadnia, S.; Nikfar, S.; Rezaiee, A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.* **2004**, *10*, RA144–RA147.
90. McVaugh, R. Flora Novo-Galiciana: A Descriptive Account of the Vascular Plants of Western. Leguminosae. Mexico. 1987, vol. 5: 1-786. The University of Michigan, Press: USA.
91. Dominguez, X. A.; Franco, F.; Díaz, Y. Mexican medicinal plants. XXXIV. Rotetoids and a fluorescent compounds from *Eysenhardtia polystachya*. *Rev. Latinoamer. Chim.* **1978**, *9*, 209-211.
92. Wächter, G. A.; Hoffman, J. J.; Furbacher, T.; Blake, M. E.; Timmermann, B. N. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1469-1471.
93. Marazzi, B.; Endress, P. K.; Paganucci De Queiroz, L.; Conti, E. Phylogenetic relationships within Senna (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: Patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectarines. *Amer. J. Bot.* **2006**, *93*, 288-303.
94. Elujoba, A. A.; Ajulo, O. O.; Iweibo, G. O. Chemical and biological analyses of Nigerian *Cassia* species for laxative activity *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1989**, *7*, 1453-1457.

95. Evans, C. E.; Banso, A.; Samuel, A. Efficacy of some nupe medicinal plants against *Salmonella typhi*: an in vitro study. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *80*, 21-4.
96. Moriyama, H.; Iizuka, T.; Nagai, M.; Miyataka, H.; Satohb, T. Antiinflammatory activity of heat-treated *Cassia alata* leaf extract and its flavonoid glycoside. *Yakagaku Zasshi*, **2003**, *123*, 607-611.
97. Jafri, M. A.; Subhani, M. J.; Javed, K.; Singh, S. Hepatoprotective activity of leaves of *Cassia occidentalis* against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *66*, 355-361.
98. Chopra, R. N.; Nayar, S. L.; Chopra, I. C. *Glossary of Indian medicinal plants*. CDRI, New Delhi, **1956**, 54.
99. Basu, B. D.; Kirtikar, K R. *Indian medicinal plants*. **1940**, *2*, 860.
100. Barbosa-Ferreira, M.; Dagli, M. L. Z.; Maiorka, P. C.; Górnjak, S. L. Sub-acute intoxication by *Senna occidentalis* seeds in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 497-503.
101. Chauhan D.; Chauhan, J. S.; Siddiqui, I. R.; Singh, J. Two new anthraquinones glycosides from the leaves of *Cassia occidentalis*. *Indian J. Chem.* **2001**, *40B*, 860-863.
102. Purwar, C.; Rai, R.; Srivastava, N.; Singh, J. New flavonoid glycosides from *Cassia occidentalis*. *Indian J. Chem.* **2003**, *42B*, 434-436.
103. Tiwari, R. D.; Singh, J. Flavonoids from the leaves of *Cassia occidentalis*. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1107-1108.
104. Hatano, T.; Mizuta, S.; Ito, H.; Yoshida, T. C-Glycosidic flavonoids from *Cassia occidentalis*. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1379-1383.
105. Wader, G. R.; Kudav, N. A. Chemical investigation of *Cassia occidentalis* Linn. with special reference to isolation of xanthenes from *Cassia* species. *Indian J. Chem.* **1987**, *26B*, 703.
106. Kitanaka, S.; Takido, M. Two new bitetrahydroanthracenes from roots of *Cassia occidentalis* L. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 511-512.
107. Guo, H.; Chang, R.; Guo, D.; Zheng, J. Anthraquinones from hair root cultures of *Cassia obtusifolia*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1623-1625.
108. Takido, M. Studies on the constituents of the seeds of *Cassia obtusifolia* L. I. The structure of obtusifolin. *Chem. Pharm. Bull.* **1958**, *6*, 397-400.

109. Takido, M. Studies on the constituents of the seeds of *Cassia obtusifolia* L. II. The structure of obtusin, chryso-obtusin and aurantio-obtusin. *Chem. Pharm. Bull.* **1960**, *8*, 246-251.
110. Kitanaka, S.; Takido, M. Studies on the constituents of the seeds of *Cassia obtusifolia*: the structures of two new lactones, isotalactone and cassialactone. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1951-1953.
111. Kitanaka, S.; Takido, M. Studies on the constituents of the seeds of *Cassia obtusifolia* L. The structure of two naphthopyrone glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 3980-3984.
112. Wells, J. M.; Cole, R. J.; Kirksey, J. W. Emodin, a toxic metabolite of *Aspergillus wentii* isolated from weevil-damaged chestnuts. *Appl. Microbiol.* **1975**, *30*, 26-28.
113. Liberman, D. F.; Schaefer, F. L.; Fink, R. C.; Ramgopal, M.; Ghosh, A. C.; Mulcahy, R. Mutagenicity of islandicin and chysophanol in the *Salmonella*/microsome system. *Appl. Microbiol.* **1980**, *40*, 476-479.
114. Reljić, R.; Ries, M.; Anić, N.; Ries, B. New chromogen for assay of glucose in serum. *Clin. Chem.* **1992**, *38*, 522-525.
115. Peterson, G. L. Determination of total proteins. *Methods Enzymol.*, **1983**, *91*, 95-119.
116. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351-358.
117. Sedlak, J.; Lindsay, R. Estimation of total protein bound non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* **1968**, *25*, 192-205.
118. Garduño-Ramírez, M. L.; Delgado, G. New eremophilanoids from the roots of *Psacalium radulifolium*. Hypoglycemic, antihyperglycemic and anti-oxidant evaluations. *Rev. Soc. Quím. Méx.*, **2003**, *47*, 160-166.
119. Banner, C. *Chemical Laboratory Methods*. Academic Press, New York. 1985
120. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **1976**, *72*, 248-254.
121. Sun, Y.; Peterson, T. E.; McCormick, M. L.; Oberley, L. W.; Osborne, J. W. Improved superoxide dismutase assay for clinical use. *Clin. Chem.*, **1989**, *35*, 1265-1266.
122. Kakkar, R.; Mantha, S. V.; Radhi, J.; Prasad, K. Increased oxidative stress in rat liver and páncreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin. Sci.* **1998**, *94*, 623-632.
123. Paglia, D. E.; Valentine, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathion peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **1967**, *70*, 158-169.

124. Lawrence, R. A.; Burk, R. F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* **1976**, *71*, 952-958.
125. Aebi H., Catalase: In "Methods of Enzymatic Analysis," Bergmeyer HV, Chemie, Weinheim, F.R.G. p 673—684, 1974.
126. Ahluwalia, V. K.; Sharma, N.D.; Mittal, B.; Gupta, S.R. Novel prenylated flavonoides from *M. philippensis* Muell. *Arg. Ind. J. Chem.* **1988**, *27B*, 238-241.
127. Kaouadji, M; Ravanel, P.; Marionett, A, M. New prenylated flavanones from *Platanus acerifolia* buds. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 153-155.
128. Delgado, G.; Cárdenas, X.; Alvarez, L.; Romo de Vivar, A.; Pereda-Miranda, R. New oleanane and isopimarane terpenoids from *Lepechinia glomerata*. *J. Chem. Res.* **1986**, *286*, (S) 286-287 (M) 2565-2579.
129. Filho, R, B.; Gottlieb, O. R.; Mourao A. P. A stilbene and two flavanones from *Derris rariflora*. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 261-263.
130. Alves, H. M.; Arndt, V. H. W. D.; Ollis, W. B.; Eyton, O. R.; Magalhães; G. T. Triterpenoids isolated from *Machaerium incorruptibile*. *Phytochemistry* **1966**, *5*, 1327-1330.
131. Burns, D.; Reynolds, W. F.; Buchanan, G.; Reese P. B.; Enriquez, R. G. Assignment of ¹H and ¹³C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 488-493.
132. Faizi, S.; Ali, M.; Saleem, R.; Sarah, I. B. Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of stigma-5-en-3-O-β-glucoside and its acetyl derivative. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 399-405.
133. Nelly, D. R. A new method for the determination of the absolute stereochemistry of aromatic and heteroaromatic alkanols using Mosher's esters. *Tetrahedron: Asym.* **1999**, *10*, 2927-2934.
134. Parsons, L. C.; Gray, A. I.; Waterman, P. G. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 46-53.
135. Angyal, S. J.; Odier, L. The effect of O-methylation on chemical shifts in the ¹H- and ¹³C NMR spectra of cyclic polyols. *Carbohydr. Res.* **1983**, *123*, 23-29.
136. Chavez, M. I.; Delgado, G. Isolation and relay synthesis of 11α-hydroperoxy diacetyl hederagenin, a novel triterpenoid derivative from *Serjania triquetra* (Sapindaceae). Biogenetic implications. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 3869-3878.

137. Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Tannins and related compounds. XLVIII. Rhubarb. (7). Isolation and characterization of new dimeric and trimeric procyanidins. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 3208-3222.
138. Hillis, W. E.; Inoue, T. The polyphenols of Nothofagus species-II. The heartwood of *Nothofagus fusca*. *Phytochemistry* **1967**, *6*, 59-67.
139. Mitscher, L. A.; Rao, G. S. R.; Khanna, I.; Veysoglu, T.; Drake, S. Antimicrobial agents from higher plants: Prenylated flavonoids and other phenols from *Glycyrrhiza lepidota*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 573-576.
140. Garo, E., Millard, M., Antus, S., Mavi, S., Hostetmann K., 1996, Five flavans from *Mariscus psilostachys*. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1265-1269.
141. Mabry, T. J. K.; Marham, R.; Thomas, M. B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin, 1970.
142. Liu, Z.Q.; Yu, W.; Liu, Z. L. Antioxidative and prooxidative effects of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low-density lipoprotein. *Chem. Phys. Lipids* **1999**, *103*, 125-135.
143. Liégeois, C.; Lermusieau, G.; Collin, S. Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1129-1134.
144. Dotan, Y.; Lichtenberg, D.; Pinchuk, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 200-227.
145. Metodiewa, D.; Jaiswal, A. K.; Cenas, N.; Dickanaité, E.; Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, *26*, 107-116.
146. Tian, B.; Hua, Y. Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA. *Food Chem.* **2005**, *91*, 413-418.
147. Akhtar, M. S.; Iqbal, J. Evaluation of the hypoglycaemic effect of *Achyranthes aspera* in normal and alloxan-diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* **1991**, *31*, 49-57.
148. El-Shabrawy, O. A.; Nada, S. A. Biological evaluation of multicomponent tea used as hypoglycemic in rats. *Fitoterapia* **1996**, *67*, 99-102.
149. Shaiq, A. M.; Jahangir, M.; Shazad ul Hussan, S.; Choudhary, M. I. Inhibition of α -glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 295-299.

150. Enigbokan, M. A.; Felder, T. B.; Thompson, J. O.; Kuti, J. O.; Ekpenyong, K. I. Hypoglycaemic effects of *Opuntia ficus-indica* Mill., *Opuntia lindheimeri* engelm and *Opuntia robusta* wendl. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother. Res.* **1996**, *10*, 379-382.
151. Ngadjui, B. T.; Dongo, E.; Abegaz, B. M.; Fotso, S.; Tamboue, H. Dinklangins A, B, and C: three prenylated flavonoids and other constituents from the twigs of *Dorstenia dinklagei*. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 99-104.
152. Takayama, M.; Fukai, T.; Hano, Y.; Nomura, T. Mass spectrometry of prenylated flavonoids. *Heterocycles* **1992**, *33*, 409-434.
153. Slade, D.; Ferreira, D.; Marais, J. P. J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2177-2215.
154. Ogunkoya, L. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 121-126.
155. Majumder, P. L.; Chakraborty, M. Reinvestigation of the action of hydrogen peroxide on ursolic acid acetate. *Tetrahedron* **1979**, *35*, 2397-2403.
156. Gordon, M. H.; An, J. Antioxidant activity of flavonoids isolated from licorice. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1784-1788.
157. Sato, Y.; Akao, T.; Heb, J. X.; Nojima, H.; Kuraishi, Y.; Morota, T.; Asano, T.; Tani, T. Glycycomarin from *Glycyrrhizae Radix* acts as a potent antispasmodic through inhibition of phosphodiesterase 3. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *105*, 409-414.
158. Martin, M.; Dewick, P.M. Role of an isoflav-3-ene in the biosynthesis of pterocarpans, 2-isoflavan and coumestan metabolites of *Medicago sativa*. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *26*, 2341-2344.
159. Martin, M.; Dewick, P.M. Biosynthesis of pterocarpan, isoflavans and coumestan metabolites of *Medicago sativa*. The role of an isoflavan-3-ene. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2341-2346.
160. Burns, D. T.; Dalgarno, B. G.; Gargan, P. E.; Grimshaw, J. An isoflavone and a coumestan from *Eysenhardtia polystachya*—Robert Boyle's Fluorescent acid-base— base indicator. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 167-169.
161. Li, Y.; Maher, P.; Schubert, D. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* **1997**, *19*, 453-463.

162. Hatano, T.; Yasuhara, Y.; Fukuda, T.; Nora, T.; Okuda, T. Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoaryl coumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 3005-3009.
163. Quine, S.D.; Raghu, P.S. Effects of (–)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart. *Pharmacol. Rep.* **2005**, *57*, 610-615.
164. Du Y.; Ming K. K. Oleanolic acid protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by enhancing mitochondrial antioxidant mechanism mediated by glutathione and α -tocopherol in rats *Planta Med.* **2006**, *72*, 222-227.
165. Mae, T.; Kishida, H.; Nishiyama, T Tsukagawa, M.; Konishi, E.; Kuroda, M.; Mimaki, Y.; Sashida, Y.; Takahashi, K.; Kawada, T.; Nakagawa, K.; Kitahara. M. A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand-binding activity affects diabetes in KK-A^y mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 3369-3377.
166. Balasubramanyam, M.; Mohan, V. Current concepts of PPAR- γ signaling in diabetes mellitus. *Curr. Sci.* **2000**, *79*, 1440-1446.
167. Wilson, G. L.; Setter, E. H. Streptozotocin interactions with pancreatic β cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Topics in Micro Immun.* **1990**, *156*, 27-33.
168. Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat páncreas. *Physiol. Res.* **2001**, *50*, 536-546.
169. Kono Y.; Fridovich I. Inhibition and reactivation of Mn-catalase. Implications for valence changes at the active site manganese. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 13646-13648.