



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Hidrólisis selectiva del peracetato de diosmina

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A

Bulmaro Villicaña Huerta

DIRECTORES:

**D.Q. MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO
M.C. LIRENNY QUEVEDO TINOCO**

Morelia, Michoacán.

Mayo del 2019

DEDICATORIA

A MIS PADRES.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: por su ejemplo de lucha y honestidad, por apoyarme siempre, ser una motivación en mi vida, guiarme en el camino y otorgarme todo lo necesario para seguir adelante.

A mis abuelitos: por todas las bendiciones que me han dado, sus buenos consejos de experiencia, paciencia y esfuerzo.

A mi hermano y hermanas: por la constante motivación, apoyo y comprensión para seguir adelante a pesar de los momentos difíciles.

A mis tíos y primos: por el cariño, apoyo y constantes consejos, por estar siempre en todo momento.

Al **D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado**, Profesor Investigador del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, por brindarme la confianza a mi llegada al laboratorio, por guiarme en mis proyectos, apoyarme siempre, agradezco sus consejos y correcciones que gracias a ello pude culminar este trabajo.

A **Lirennny**, porque desde el principio me recibió de la mejor manera, con paciencia y siempre la mejor disposición, gracias a su experiencia, conocimiento y motivación me orientó y siempre me impulsó a seguir adelante.

A mis amigos de facultad: **Diego e Ivan**, por todos los grandes e inolvidables momentos compartidos, por convertirse en parte de mi familia durante estos años, siempre apoyarme y su sincera amistad.

A mis compañeros de laboratorio: **Lirennny, Héctor, Kary, Toño, Luis, Ivan, Diego, Dany e Itzel**, por el apoyo, amistad y los consejos recibidos, por siempre resolver mis dudas de la mejor disposición.

A mis revisores de tesis: **D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres, D.Q. Gabriela Rodríguez García, M.C. Rosa María Trujillo Aguirre, D.C. Ernesto Ramírez Briones, M.C. Melissa Tapia Juárez**, por tomarse el tiempo y la ayuda con la revisión de la tesis, por el apoyo para la culminación de este proyecto.

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1. HISTORIA DE PRODUCTOS NATURALES.....	10
2.2. FLAVONOIDES.....	11
2.3. FUNCIONES DE FLAVONOIDES.....	12
2.4. CLASIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.....	13
2.5. CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES EN FRUTAS Y VERDURAS DE CONSUMO COMÚN.....	15
2.6. DIOSMINA.....	16
2.7. BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO DE DIOSMINA.....	18
2.8. ENFERMEDADES VENOSAS.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	22
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
5. METODOLOGÍA.....	23
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	24

6.1. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE PARTIDA.....	24
6.2 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PERACETATO DE DIOSMINA (2).....	24
6.3. PREPARACIÓN DEL DERIVADO HEXA-ACETILADO DE DIOSMINA (3) MEDIANTE HIDRÓLISIS SELECTIVA.....	31
7. CONCLUSIÓN.....	36
8. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
8.1 MÉTODOS INSTRUMENTALES.....	37
8.2 OBTENCIÓN DE MUESTRA DE PARTIDA.....	37
8.3. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PERACETATO DE DIOSMINA (2).....	37
8.4. HIDRÓLISIS SELECTIVA A PARTIR DEL PERACETATO DE DIOSMINA (2) PARA LA OBTENCIÓN DEL DERIVADO 3.....	38
9. BIBLIOGRAFÍA.....	40

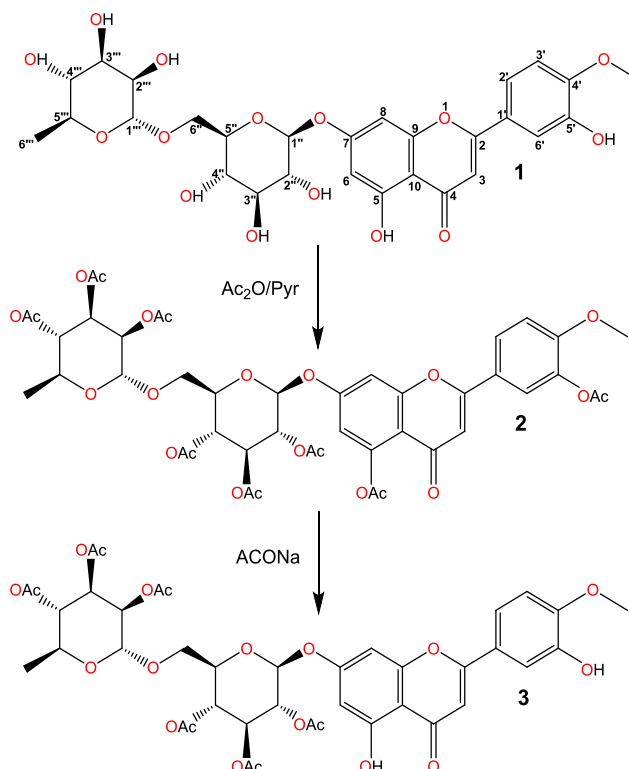
SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

δ	Desplazamiento químico
AcOEt	Acetato de etilo
d	Señal doble
dd	Señal doble de doble
g	Gramo
H & L	Hidrosolubles y liposolubles
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Señal múltiple
mg	Miligramo
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
p.a.	Principio activo
ppm	Partes por millón
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
s	Señal simple
μmol	Micromol

RESUMEN

Los flavonoides son de gran importancia para el uso humano debido a diversas propiedades, principalmente antioxidantes. La diosmina (**1**) es un flavonoide glicosilado, que actúa como principio activo en tabletas con acciones antiinflamatorias y vasoprotectoras.

La diosmina (**1**) cuenta con 8 grupos –OH en su estructura, los cuales pueden ser funcionalizados con grupos acetato (-COCH₃) mediante una reacción de acetilación, obteniendo como producto de reacción el peracetato de diosmina (**2**). En el presente trabajo se describe la obtención y purificación del peracetato de diosmina (**2**), así como la hidrólisis selectiva de este compuesto para la obtención de **3**. Los compuestos **2** y **3** fueron caracterizados mediante métodos físicos y espectroscópicos. Este es el primer reporte de hidrólisis selectiva del derivado peracetilado de diosmina **2** y su respectiva caracterización.

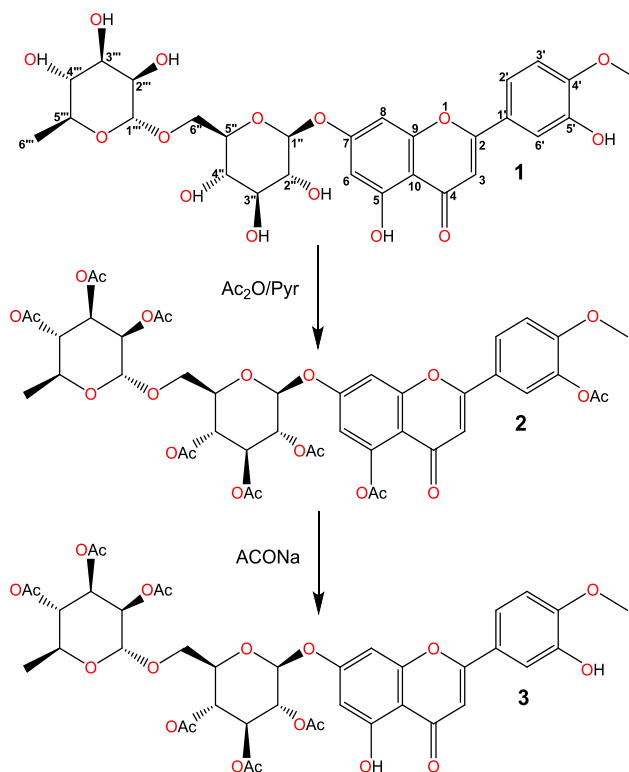


Palabras clave: Flavonoides, diosmina, reacción de acetilación, peracetato de diosmina, hidrólisis selectiva.

ABSTRACT

Flavonoid compounds are of great importance for human uses due to its several properties, mainly as antioxidant principles. Within these natural products, the glycosylated flavonoid diosmin (**1**) is found, already present as active principle in medications with antiinflammatory and vasoprotective activities.

Diosmin (**1**) contains eight –OH groups in its structure, which can be converted into acetate groups (–COCH₃) through acetylation reactions to provide diosmin peracetate (**2**) as the reaction product. The present work describes the preparation and purification of diosmin peracetate (**2**), and its partial-selective hydrolysis to give **3**. Compounds **2** and **3** were characterized by its physical and spectroscopic data. This is the first report of selective hydrolysis in diosmin peracetate (**2**) and its respective chemical characterization.



Keywords: flavonoids, diosmin, acetylation reaction, peracetate of diosmin, selective hydrolysis.

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos, el hombre ha tratado de sobrevivir y mantener su bienestar nutricional y de salud. Para ello tuvieron que pasar varias etapas desde que el ser humano percibió que las plantas podían contrarrestar malestares, mitigar dolor o curar heridas. De lo anterior, al imitar la conducta animal, el hombre primitivo pudo encontrar la cura a diversas enfermedades, no obstante, en algunas ocasiones el resultado no era tan positivo, por lo que a prueba y error supo lo que podía y no funcionar. Uno de los impedimentos importantes en el uso de plantas curativas era el idioma, ya que eran pocas las ideas que se tenían sobre los beneficios sobre algunos vegetales y no podían compartirlas. Con el paso del tiempo supo compartir las experiencias y beneficios de las plantas expandiendo los conocimientos al comparar los resultados medicinales de una cultura a otra y ser colonizadas las culturas (Cortez-Gallardo *et al.*, 2004).

A principios del siglo XIX, se comenzó a estudiar a profundidad el uso de especies vegetales medicinales, y se demostró que los metabolitos secundarios de las plantas son responsables de la actividad biológica, estos compuestos pueden ser la base para diversos derivados, sustancias bioactivas y así aumentar el campo de aplicación (Gutiérrez & Estévez, 2009).

Un ejemplo de estos metabolitos secundarios son los flavonoides, cuya palabra proviene del latín *flavus* y significa color entre amarillo y rojo, como el de la miel o el oro, principalmente encontrados en uvas, manzanas, cebollas, cerezas, repollos, cuentan con propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas, y antioxidantes (Escamilla *et al.*, 2009).

Son sintetizados en las plantas, por las vías metabólicas del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico, tiene una estructura general C₆-C₃-C₆. Se clasifican de acuerdo a los grupos de sustitución en el anillo C, pueden ser flavanol, antocianidina, flavona, flavanona e isoflavona (Gutiérrez, 2007).

Dentro de la medicina actual también se usan las plantas con fines terapéuticos como materia de partida para aislar el principio activo de interés, esto se puede realizar mediante varias técnicas: macerados, concentrados, purificaciones, reacciones para realizar algún derivado y pruebas biológicas. Para llegar así a una forma farmacéutica (Saenz, 2004).

En la actualidad un 50% de los fármacos utilizados provienen directa o indirectamente de plantas. Dentro de estos puede encontrarse al medicamento con el principio activo Diosmina (**1**) (600 mg por tableta), que al ser un flavona actúa como un venotónico y vasoprotector (Cragg & Newman, 2009).

2. ANTECEDENTES

2.1 HISTORIA DE PRODUCTOS NATURALES

El ser humano siempre ha procurado su bienestar, experimentando en gran parte con la naturaleza, utilizando sustancias de productos naturales con fines terapéuticos, como lo son: principios activos de procedencia animal, vegetal y mineral.

Aunque todos los métodos empíricos son inciertos, se deduce que nuestros antepasados analizaban la naturaleza y sus presas en cuanto a conducta, imitándolos al momento de verlos enfermos y al consumir alguna planta mejoraba su salud y aspecto, a prueba y error fueron los primeros intentos por mejorar los malestares de pueblos primitivos (Pérez-Tamayo, 1997).

Estos conocimientos fueron heredados a los pueblos sedentarios y con ello se fueron especializando con el uso de estos recursos naturales dando aparición a chamanes o brujos (Pavía-Ruz *et al.*, 1998). Específicamente, en América el principal recurso para el bienestar humano era el uso de especies vegetales debido a su diversidad ecológica, siendo las culturas olmeca, teotihuacana, maya, zapoteca, purépecha, tolteca y azteca las principales exponentes de estas prácticas (Cortez-Gallardo *et al.*, 2004).

Con la llegada de los españoles se perdió parte del conocimiento de plantas medicinales pero parte de este trascendió vía oral y posteriormente fueron plasmados; no obstante, los conquistadores a su vez los reforzaron, aprendiendo el idioma, plantas medicinales, costumbres y conocimientos de cada una de estas culturas. Con el tiempo aparecieron códigos ilustrados, con descripción y aplicación de cada una de las plantas.

Así fueron especializándose todas las técnicas hasta llegar a una ciencia que estudiara las sustancias de origen natural, poniendo especial interés en la identificación, descripción, análisis, comercio y uso terapéutico de las drogas vegetales. Con el avance tecnológico se ha mejorado la extracción de principios activos a partir de productos naturales, lo cual permite sintetizar compuestos con mayor actividad biológica y campo de aplicación más amplio (Villar *et al.*, 1999).

2.2 FLAVONOIDES

Los flavonoides son un grupo de compuestos que fueron descubiertos por Szent-György a quien se le otorgó el premio Nobel, en 1937 por aislar una sustancia de la cáscara de limón, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Robinson en 1936 dedujo que los anillos eran condesados de forma diferente y de aquí serían precursores para los diferentes tipos de flavonoides existentes.

Los compuestos polifenólicos presentes en plantas, son los que le proporcionan el color a las flores y frutas, y poseen propiedades antioxidantes (figura 2.2.1). Estos compuestos no los produce de forma natural el cuerpo humano por lo que la única forma de obtenerlos es mediante dieta (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

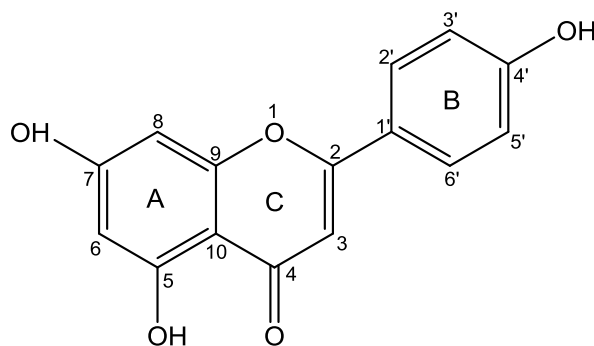


Figura. 2.2.1. Estructura básica de un flavonoide (Peñarrieta *et al.*, 2014).

Los flavonoides inicialmente fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres (Havsteen, 1983).

Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Se han encontrado alrededor de 5000 flavonoides diferentes (Ross y Kasum, 2002), se recomienda una ingesta diaria de flavonoides de 23 mg/día, siendo la quercetina el predominante con un valor medio de 16 mg/día (Hertog *et al.*, 1996).

2.3. FUNCIONES DE FLAVONOIDES:

Esta clase de compuestos pueden ser usados con diferentes propósitos como:

- Fortalecen las paredes de capilares, tienen función anticoagulante (Williams *et al.*, 2004).
- Pueden quelar metales pesados (Mira *et al.*, 2002).
- Influyen sobre el crecimiento y la multiplicación celular: ya que se relacionan directamente con la función normal de fosforilación (Hou *et al.*, 2004).
- Influyen sobre la expresión genética: vía las quinasas.
- Función antibacteriana y antiviral (Grotewold, 2005).

- Función antihistamínica (Kawai *et al.*, 2007).

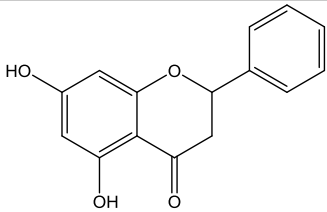
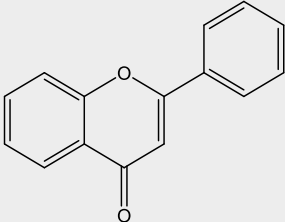
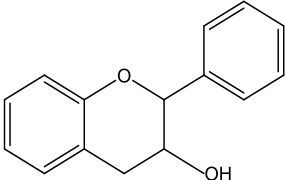
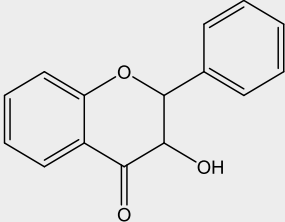
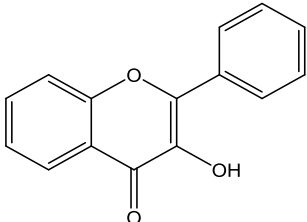
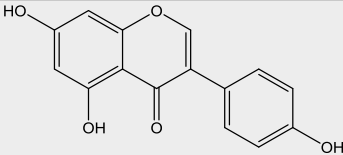
En su estructura química pueden tener diferentes grupos hidroxilo en distintas posiciones lo que se relaciona con la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras (Escamilla *et al.*, 2009).

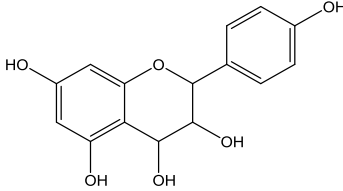
2.4. CLASIFICACIÓN DE FLAVONOIDES:

De acuerdo a los grupos funcionales presentes en el anillo C. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 2.4.1.

Tabla 2.4.1 clasificación de flavonoides.

Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Antocianidinas	Tiene un grupo –OH unido en posición C-3, además de un doble enlace entre C-3 y C-4 del anillo C.	Antocianidina	
Chalcona	Ausencia de anillo C, con grupo carbonilo en C-1 y un doble enlace en C-2 y C-3.	Buteína	
Dihidrochalcona	Ausencia de anillo C, con	Asebogenina	

	grupo carbonilo en C-1.		
Flavanona	Grupo carbonilo en C-4 y centro estereogénico en C-2.	Pinocembrina	
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en C-4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en C-3.	Diosmetina	
Flavanoles	Con un grupo -OH en C-3 del anillo C.	Catequina	
Flavononol	Presenta un grupo carbonilo en C-4 y un grupo -OH en C-3 del anillo C.	Taxifolin	
Flavonoles	Grupo carbonilo en C-4 y un grupo -OH en C-3 del anillo C.	Quercetina	
Isoflavonas	Tiene un grupo carbonilo en C-4 y el anillo B se encuentra en	Genisteína	

	C-3 en el heterociclo C.		
Leucoantocianidina	Posee dos grupos –OH en C-3 y C-4 del anillo C.	Pelargonidina	

2.5. CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES EN FRUTAS Y VERDURAS DE CONSUMO COMÚN:

Existen alimentos capaces de absorber radicales libres del oxígeno. En la tabla (2.5.1) se pueden observar algunos ejemplos de estos alimentos y su capacidad antioxidante donde a mayor valor, mejor su potencial antioxidante (Agricultural Research Service (ARS), 2007).

Tabla 2.5.1. Valor antioxidante de frutas y verduras de consumo común.

Alimento	Valor
Arándanos	6552 umol (H & L)
Ciruelos	6259 umol (H & L)
Grosellas negras	5347 umol (H & L)
Frambuesas	4882 umol (H & L)
Fresas	3577 umol (H & L)
Cerezas	3365 umol (H & L)
Brócoli (crudo)	3083 umol (H & L)
Pasas	3037 umol (H & L)
Naranjas	1819 umol (H & L)
Espinacas (crudo)	1515 umol (H & L)
Alfalfa	1510 umol (Solo H)
Uva negra	1260 umol (Solo H)
Cebolla (crudo)	1034 umol (H & L)

Berenjena	933 umol (H & L)
Zanahorias	666 umol (H & L)
Calabaza	483 umol (H & L)
Coliflor	620 umol (Solo H)

*Considerando porciones de 100g

La ingesta promedio de flavonoles y flavonas se sitúa entre los 20 y 26 mg/día. Esto quiere decir que es mayor a la cantidad de ingesta diaria del beta-caroteno (2-3 mg/día) y la vitamina E (7-10 mg/día) y se aproxima a la ingesta de la vitamina C (70-100 mg/día) (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

2.6. DIOSMINA (1):

La diosmina (**1**) es una flavona glicosilada (figura. 2.6.1.) con amplio espectro de aplicación biológico, entre la que se encuentra un efecto en el aumento de la resistencia de las paredes vasculares. En estudios recientes se pudo comprobar que la ingesta oral de diosmina (**1**) incrementa la insulina en plasma, de esta manera tiene beneficios a nivel hepático (Pari & Srinivasan, 2010).

La forma de obtención del metabolito secundario es a partir de *Hyssopus officinalis* (Hisopo) y de diferentes especies del género *Citrus*, como: *Citrus medica* (Cidro), *Citrus limon* (Limonero) y *Citrus aurantifolia* (Limero).

En la actualidad son escasas las aportaciones acerca de la presencia y distribución de diosmina (**1**) en las plantas por lo que se han desarrollado métodos para su obtención por vía química. La finalidad de estos procesos es la síntesis y purificación final del compuesto. El inconveniente de los procesos es que puede ser acompañado el producto final con disolventes, al ser así no tiene la eficacia esperada y puede haber efectos adversos, por ello se llevan a cabo nuevas técnicas de purificación del compuesto libre de disolventes. El proceso consta de realizar una extracción con éter de petróleo y posteriormente una extracción con metanol,

obteniéndose así a la diosmina (**1**) que si se desea se puede cristalizar para su purificación (del Río *et al.*, 2003).

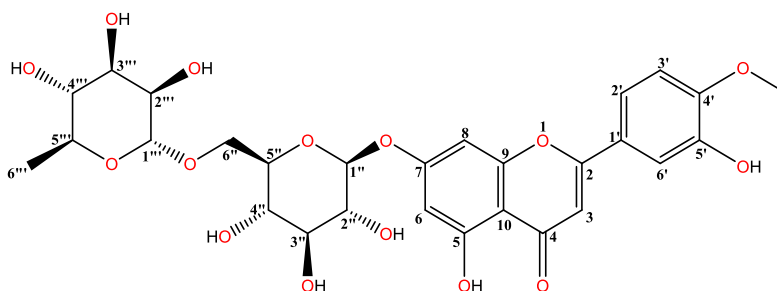


Figura. 2.6.1. Estructura química de la 4',5,7 trihidroxi, 4'-metoxi flavona 7-rutinosido (diosmina) (**1**).

La diosmina (**1**) es comercializada como medicamento bajo el nombre de daflon® (laboratories servier), mediflu® (Interquim), vedipal® (Tecnofarma), entre otras; y suele estar en combinación con Hesperidina (9:1, respectivamente), ya que favorece un efecto sinérgico. Algunas de las indicaciones terapéuticas son: el alivio a corto y largo plazo de edemas y la insuficiencia venosa crónica, actuando a nivel de venas y vénulas mejorando la microcirculación. La relación dosis-efecto, es de dos tabletas de 500 mg de ingesta al día (Granados, 2003). Se han realizado derivados de la diosmina (**1**) incorporándole zinc con el fin de ayudar en casos de diabetes o trastornos vasculares derivados de esta enfermedad (Saad, 2015).

Los reportes del peracetato de diosmina fueron encontrados en la literatura, el proceso llevado a cabo para su obtención es parecido al realizado en este trabajo, y el análisis por RMN ^1H y ^{13}C , no se ha reportado actividad biológica del peracetato de diosmina (figura 2.6.2) (da Conceição, 2015).

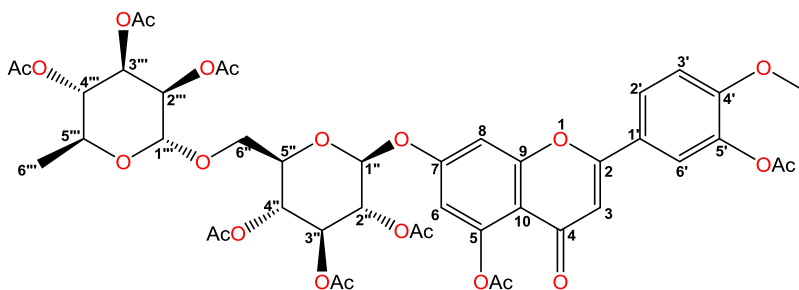


Figura 2.6.2 estructura del peracetato de diosmina (2).

2.7. BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO DE DIOSMINA:

De acuerdo a Granados (2003), la farmacocinética de la diosmina (**1**) es la siguiente:

- La absorción se realiza a la segunda hora y alcanza una concentración máxima en sangre a las 5 horas después de la administración.
- El metabolito predominante es el ácido hidroxifenilpropiónico, en menor proporción se encuentran otros ácidos fenólicos.
- La vida media del medicamento en torrente sanguíneo se estima que es de 11 horas.
- La eliminación por lo general se realiza por medio de las heces, y en un 14% en orina.

2.8. ENFERMEDADES VENOSAS:

Las afecciones venosas es un problema mundial que en su gran mayoría es detectada en personas de edad avanzada con un 23%, y un 6% personas que tienen enfermedades venosas crónicas o no tratadas, relacionadas con cambios cutáneos y úlceras.

Se han realizado estudios epidemiológicos en los cuales se ha identificado millones de personas con estos transtornos, siendo la mayoría mujeres con 2.6% y 1.9% hombres (Kaplan R, 2003).

Por lo general, las enfermedades venosas crónicas pueden causar mucho dolor, incluso llevar a la incapacidad y con esto disminución en el rendimiento laboral, teniendo como resultado un excesivo gasto socioeconómico entre consultas, tratamiento y faltas al trabajo (Korn *et al.*, 2002).

Existen varios factores que pueden predisponer a tener enfermedades vasculares, entre ellas:

- Factores primarios: podemos encontrar la herencia o por genética, ya que varios estudios arrojaron un 90% de probabilidad de la enfermedad a hijos con ambos padres enfermos y 20% cuando los padres no presentaban daños venosos (Cornu-Thénard *et al.*, 1994). Otro factor es el daño directo sobre paredes venosas en este se puede agregar la trombosis, afecciones derivadas de problemas de hipertensión y fístulas congénitas o como resultado de algún tratamiento quirúrgico (Scott *et al.*, 1995).
- Edad: es uno de los principales riesgos para padecer alguna enfermedad vascular, ya que al paso de los años la población aumenta el riesgo, ha sido demostrado también por el estilo de vida dirigiéndose con mayor riesgo a las mujeres (Fowkes *et al.*, 2001).
- La obesidad: se han realizado diversos estudios enfrentando a población con masa corporal normal y población con sobrepeso y obesidad, encontrando a los últimos con mayor riesgo de tener alguna enfermedad venosa ya que las mujeres con obesidad presentan mayor cantidad de estrógenos en torrente sanguíneo (Sisto *et al.*, 1995).
- Sedentarismo y ocupaciones laborales: pueden ser un riesgo o incrementar el grado de severidad de la enfermedad, el estar por lapsos largos de tiempo sentado ya sea por sedentarismo o largas jornadas de trabajo, ya que las contracciones musculares son escasas o mínimas (Rabe *et al.*, 2003).

Se pueden clasificar en 6 niveles las enfermedades venosas, tomando en cuenta desde los signos no visibles o personas asintomáticas, hasta úlceras crónicas o personas sintomáticas. Esta clasificación permite facilitar el diagnóstico, seguimiento de la enfermedad, la gravedad clínica de la afección

y tratamiento de personas con estos padecimientos (Miquel *et al.*, 2015). Algunos medicamentos son preinscritos para problemas hemorroidales o enfermedades vasculares crónicas en miembros inferiores, realizando un crecimiento en el recubrimiento de venas, con el fin de aliviar cansancio, pesadez, inflamación, úlceras y varices (Ramos *et al.*, 2017).

Los medicamentos usados para estos trastornos son:

- Alfa benzopironas
- Flavonoides
- Saponinas
- Sintéticos como el naltazon

De forma general el mecanismo de acción que realizan estos medicamentos es inactivar la noradrenalina para aumentar el tono venoso, aumentan el grosor de la pared vascular, actúan directamente en vasos linfáticos drenando la linfa, disminuyen la segregación del paquete globular disminuyendo la viscosidad de la sangre y al haber inflamación en el proceso de daño vascular se trata de contrarrestar (Perrin & Ramelet, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

La obtención de derivados con actividad biológica a partir de productos naturales ha llevado a encontrar nuevos compuestos que presentan actividades interesantes, como la diosmina (**1**) un flavonoide que ayuda al fortalecimiento de paredes capilares. Se ha reportado la preparación del peracetato de diosmina (**2**) a partir de **1**, y sus aplicaciones en la química de coordinación; sin embargo, no se han explorado condiciones de reacción de hidrólisis parcial que permitan hidrolizar grupos acetato estratégicos en **2** para posteriores modificaciones estructurales. Es por esto que surge el interés de realizar un estudio enfocado a la realización de hidrólisis selectiva del peracetato de diosmina (**2**), bajo condiciones básicas suaves.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el comportamiento reactivo del peracetato de diosmina frente a acetato de sodio para favorecer hidrólisis parciales.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar el peracetato de diosmina (**2**) a partir de diosmina (**1**).
- Purificar la diosmina acetilada (**2**) mediante técnicas cromatográficas.
- Realizar reacciones de hidrólisis selectiva a partir de **2**.
- Purificar y caracterizar mediante técnicas físicas y espectroscópicas a los productos de reacción.

5. METODOLOGÍA

La metodología propuesta se resume en el esquema 1.



Esquema 1. Secuencia de pasos en la obtención de la reacción de hidrólisis selectiva.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE PARTIDA

A partir de tabletas trituradas de Phlebodia®, del Laboratorio INNOTHERA, se obtuvo la mezcla de diosmina (**1**) y excipientes. Cabe destacar que debido a la baja solubilidad del flavonoide de interés no fue posible su extracción y purificación con disolventes orgánicos. Lo anterior no limitó el estudio, en cambio, acortó etapas de experimentación.

El polvo obtenido fue suspendido en piridina para llevar a cabo una reacción de acetilación con anhídrido acético.

6.2. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PERACETATO DE DIOSMINA (**2**)

De la reacción de acetilación de diosmina (**1**) (figura 6.2.1) se obtuvo un polvo blanco con un punto de fusión de 132-135 °C, con solubilidad en algunos disolventes orgánicos (tabla 6.2.1). En el espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) se observaron entre 7.80 y 6.60 ppm las señales típicas de los hidrógenos aromáticos presente en la molécula, entre 5.40 y 3.80 ppm aparecieron las señales correspondientes al azúcar, además se observaron las señales simples de los acetatos en 2.44, 2.37, 2.09, 2.06, 2.05, 2.03 y 1.92 ppm (figura 6.2.2). En su espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) se apreciaron además de las señales típicas del esqueleto de diosmina (**1**), las 8 señales de los carbonilos y metilos de acetato en 170.1, 169.9, 169.8, 169.7, 169.5, 169.3, 169.1 y 168.6 ppm, así como entre 56.0 y 20.6 ppm, respectivamente (figura 6.2.3). Los datos físicos y espectroscópicos (tablas 6.2.2 y 6.2.3) fueron comparados con la literatura (da Conceição, 2015), los cuales coincidieron con el peracetato de diosmina (**2**). Adicionalmente se observaron señales en 158.1, 126.8, 107.3 y 66.1 ppm que no corresponden a la estructura, y que posiblemente están relacionadas con algún componente de la forma farmacéutica empleada.

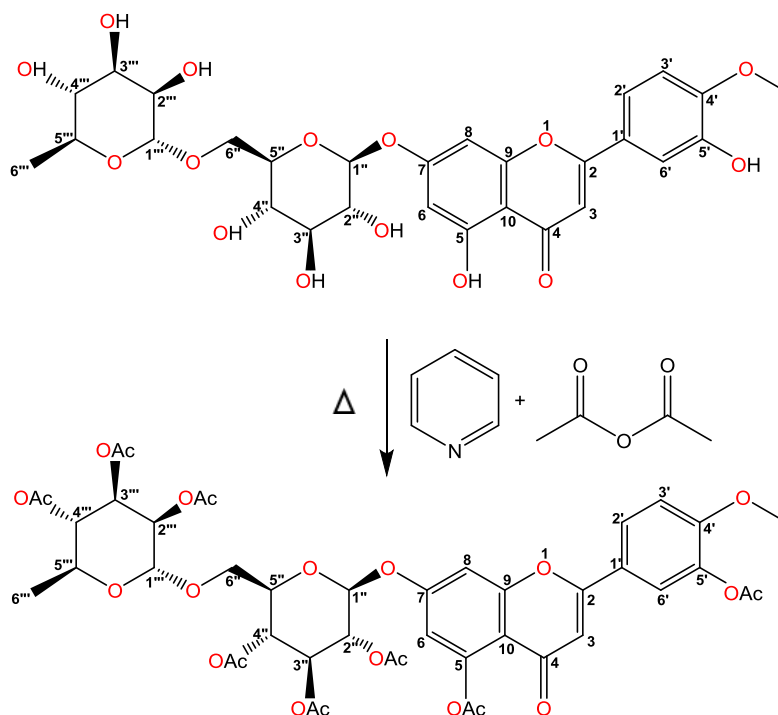


Figura. 6.2.1 Reacción de acetilación de diosmina (**1**)

Tabla 6.2.1 Datos de solubilidad de peracetato de diosmina (**2**) en diferentes disolventes. S (Soluble), LS (Ligeramente soluble), I (Insoluble).

Disolvente	Solubilidad	Disolvente	Solubilidad
Acetona	S	Agua	I
Hexano	LS	Acetato de etilo	S
Metanol	S	Diclorometano	S

Tabla 6.2.2 Datos de RMN de ^{13}C de peracetato de diosmina (**2**) δ en ppm.

No.	^{13}C experimental	^{13}C referencia
2	159.6	159.8
3	108.9	109.0
4	176.1	176.2
5	159.6	159.8
6	97.9	98.1
7	161.3	161.5

8	97.5	97.8
9	150.5	150.7
10	102.1	102.4
1'	123.6	123.9
2'	112.4	112.5
3'	139.9	140.1
4'	153.9	154.0
5'	112.6	112.8
6'	120.8	121.0
1"	97.5	97.8
2"	70.7	70.9
3"	72.2	72.4
4"	70.6	70.8
5"	73.3	73.5
6"	68.5	68.6
1'''	97.9	98.1
2'''	69.2	69.3
3'''	68.8	68.9
4'''	70.6	70.8
5'''	66.6	66.7
6'''	17.1	17.3
OCH₃	56.0	56.2
COCH₃	170.1, 169.9, 169.8, 169.7, 169.5, 169.3, 169.1, 168.6, 21.0, 20.6, 20.6, 20.6, 20.5, 20.5, 20.5	170.2, 170, 169.9, 169.8, 169.7, 169.4, 169.3, 168.8, 21.0, 20.7, 21.1, 20.8, 20.8, 20.7, 20.6

Tabla 6.2.3 Datos de RMN de ^1H de peracetato de diosmina (**2**) δ en ppm, J en Hz.

No.	^1H Experimental	^1H referencia
2	-	-
3	6.51 (1H, S)	6.51 (1H, S)
4	-	-
5	-	-
6	6.65 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	6.65 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)
7	-	-
8	6.96 (1H, d, $J = 2.41$ Hz)	6.96 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	7.73 (1H, dd, $J = 2.8, 8.4$ Hz)	7.72 (1H, dd, $J = 2.3, 9.0$ Hz)
3'	7.07 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	7.08 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)
4'	-	-
5'	-	-
6'	7.55 (1H, d, $J = 2$ Hz)	7.56 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)
1''	5.36- 5.17 (6H, m)	5.37- 5.15 (6H, m)
2''	5.36- 5.17 (6H, m)	5.37- 5.15 (6H, m)
3''	5.36- 5.17 (6H, m)	5.37- 5.15 (6H, m)
4''	5.36- 5.17 (6H, m)	5.37- 5.15 (6H, m)
5''	3.86- 3.81 (2H, m)	3.85- 3.80 (2H, m)
6''a	3.86- 3.81 (2H, m)	3.85- 3.80 (2H, m)
6''b	3.70- 3.65 (1H, m)	3.70- 3.65 (1H, m)
1'''	4.72 (1H, s)	4.72 (1H, s)
2'''	5.04- 4.98 (1H, m)	5.05- 4.97 (1H, m)
3'''	5.36- 5.17 (6H, m)	5.37- 5.15 (6H, m)
4'''	5.36- 5.17 (6H, m)	5.37- 5.15 (6H, m)
5'''	4.02- 3.98 (1H, m)	4.01- 3.95 (1H, m)
6'''	1.14 (3H, d, $J = 6$)	1.14 (3H, d, $J = 6.2$)
OCH₃	3.91 (3H, s)	3.91 (3H, s)

COCH₃	2.44 (3H, s)	2.43 (3H, s)
COCH₃	2.37 (3H, s)	2.36 (3H, s)
COCH₃	2.09 (3H, s)	2.17 (3H, s)
COCH₃	2.06 (6H, m)	2.09 (6H, m)
COCH₃	2.05 (3H, s)	2.02 (6H, m)
COCH₃	2.05 (3H, s)	1.92 (3H, s)
COCH₃	2.03 (3H, s)	
COCH₃	1.92 (3H, s)	

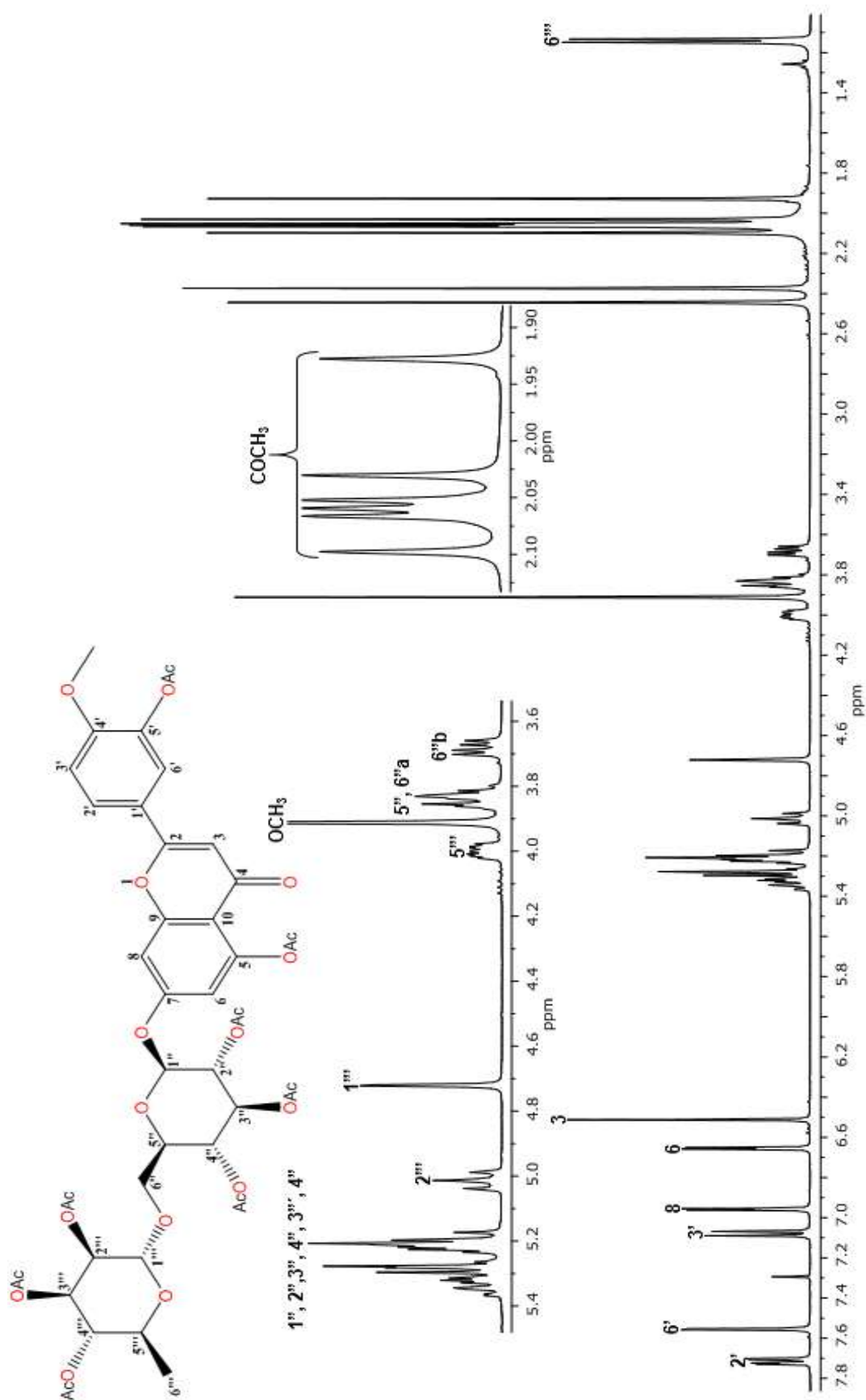


Figura 6.2.2. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz de peracetato de diosmina (2), en CDCl_3 .

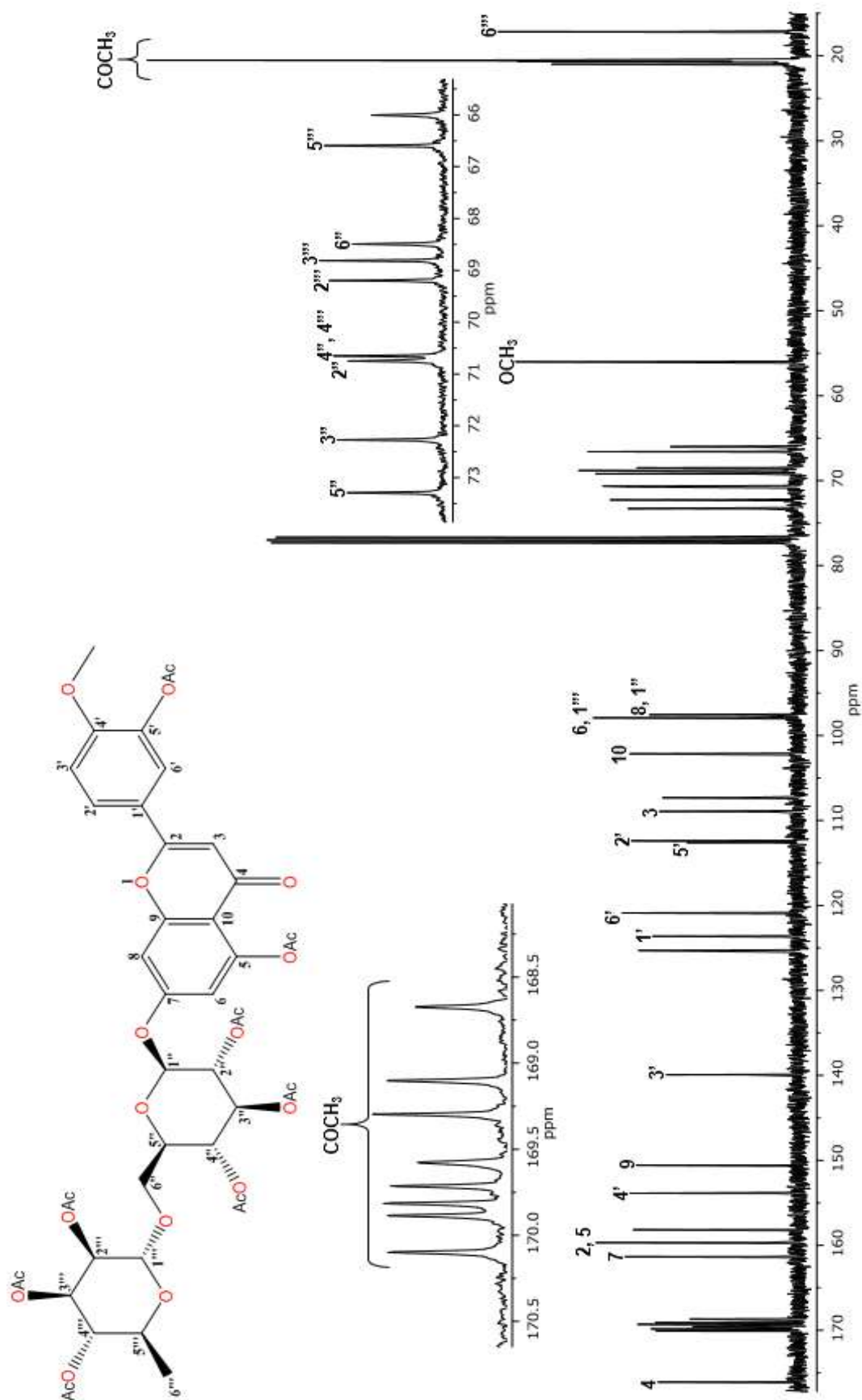


Figura 6.2.3. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz de peracetato de diosmina (2), en CDCl_3 .

6.3. PREPARACIÓN DEL DERIVADO HEXA-ACETILADO DE DIOSMINA (2) MEDIANTE HIDRÓLISIS SELECTIVA.

Una vez obtenido el peracetato de diosmina (2) se trató con acetato de sodio en metanol a reflujo durante 90 minutos (figura 6.3.1), con lo que obtuvo un sólido amarillo. En el espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) se observaron las señales típicas de la diosmina acetilada, con la diferencia de que las dos señales simples que se encontraban entre 2.60 y 2.40 ppm correspondientes a los acetatos aromáticos 5 y 5' ya no están presentes, mientras que las señales simples encontradas entre 2.09 y 1.94 ppm indican la permanencia de los grupos éster en la parte del azúcar, lo que demostró que la reacción se llevó de manera selectiva sobre los acetatos presentes en los anillos aromáticos (figura 6.3.2). En su espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) sólo se apreciaron 6 señales de carbonilos correspondientes a los acetatos del azúcar, lo que confirmó la elucidación del derivado obtenido (figura 6.3.3) incrementando la solubilidad dada por los grupos –OH del flavonoide (tabla 6.3.1.). Obteniendo un derivado novedoso al no encontrarlo reportado en la literatura.

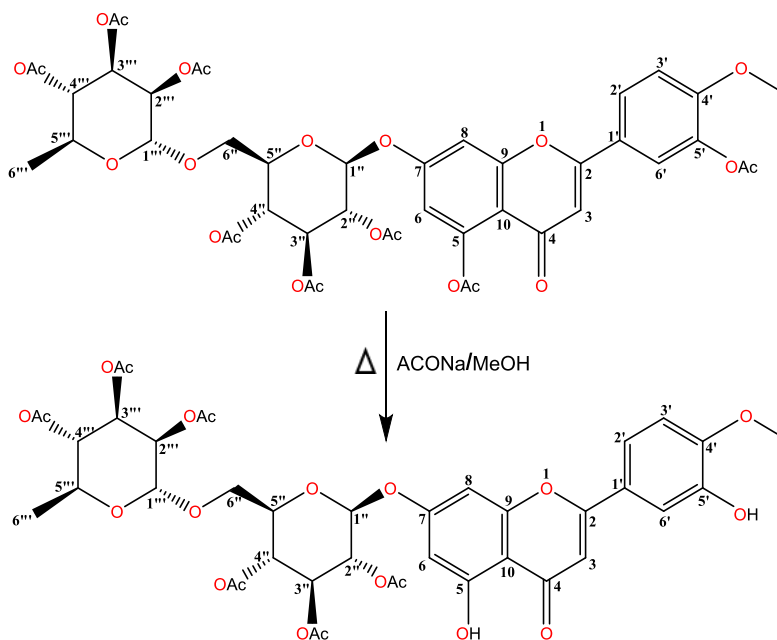


Figura 6.3.1. Hidrólisis selectiva de peracetato de diosmina (2)

Tabla 6.3.1. Datos de solubilidad de hidrólisis selectiva en diferentes disolventes. S (Soluble), LS (Ligeramente soluble), I (Insoluble).

Disolvente	Solubilidad	Disolvente	Solubilidad
Acetona	S	Agua	I
Hexano	LS	Acetato de etilo	S
Metanol	S	Diclorometano	S

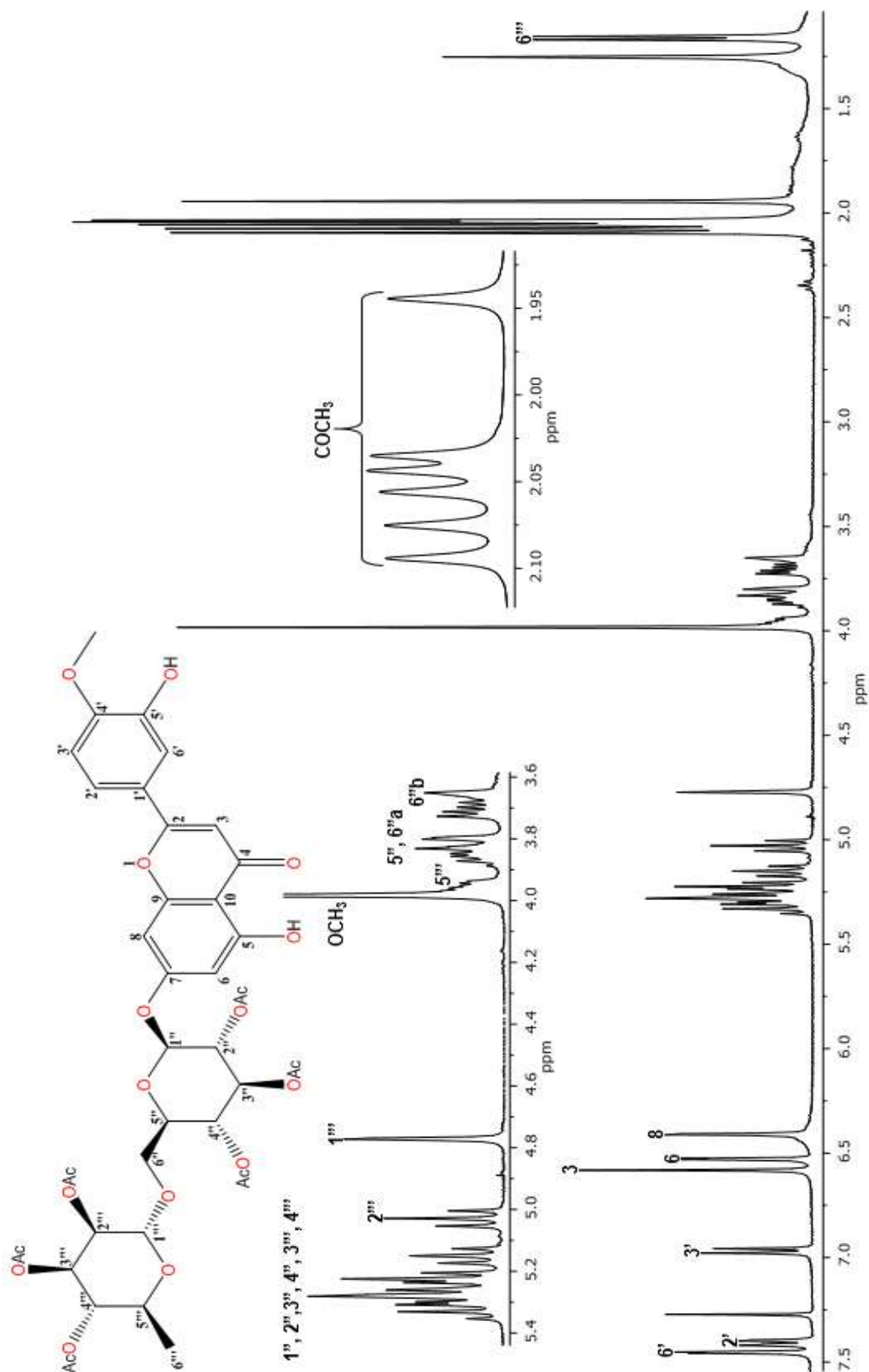


Figura 6.3.2. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz de hidrólisis selectiva **3**, en CDCl_3 .

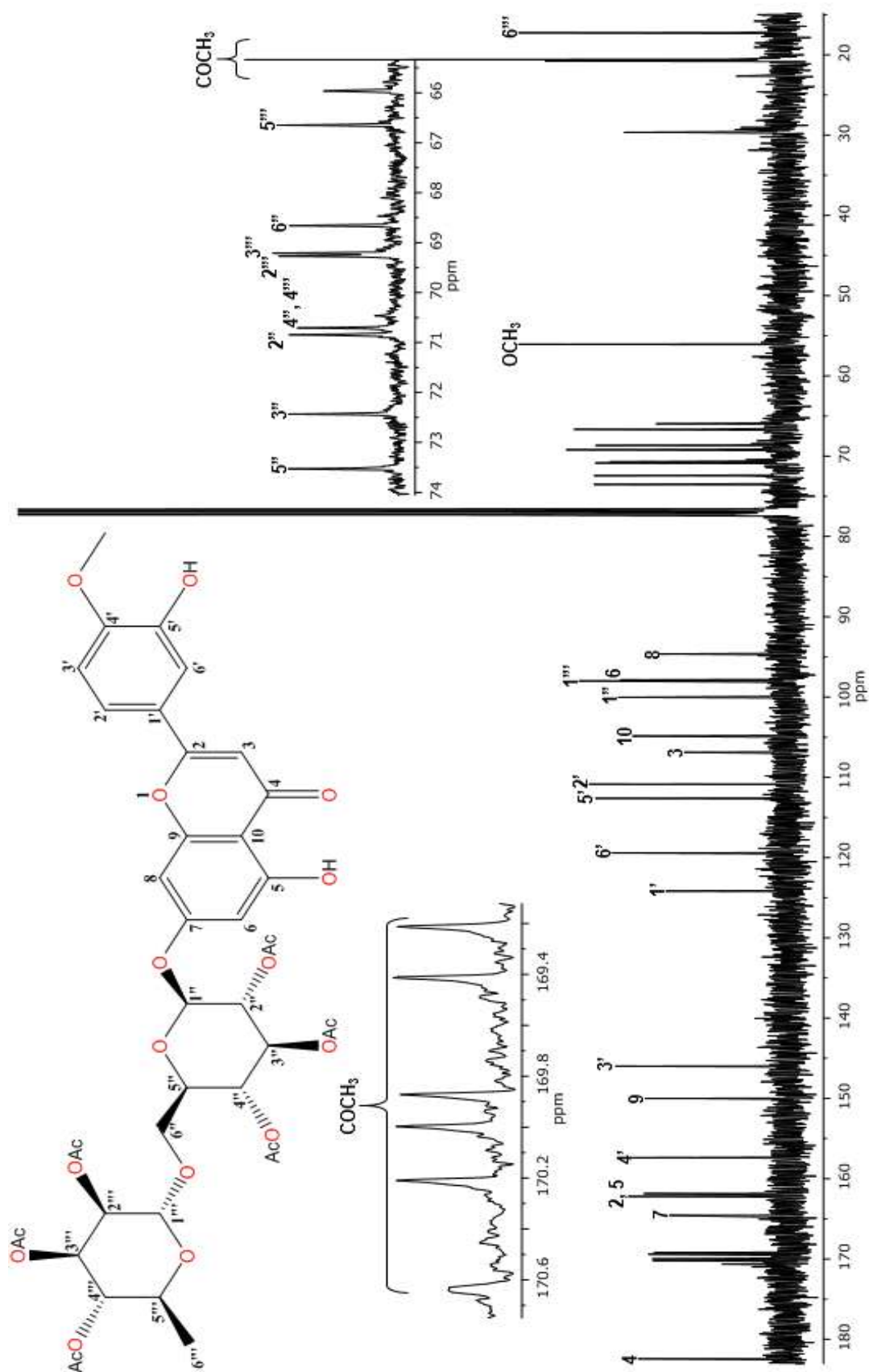
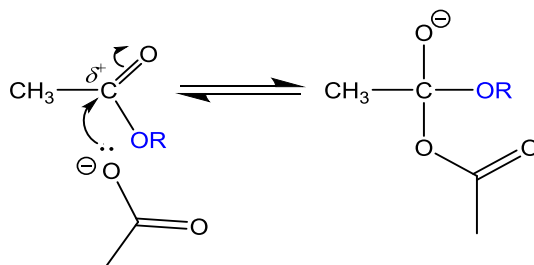


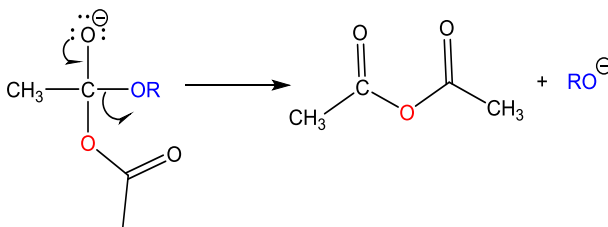
Figura 6.3.3. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz de hidrólisis selectiva **3**, en CDCl_3 .

Considerando que la obtención del compuesto **3** es por vía hidrólisis básica (McMurry, 2008) el mecanismo de reacción propuesto es el siguiente:

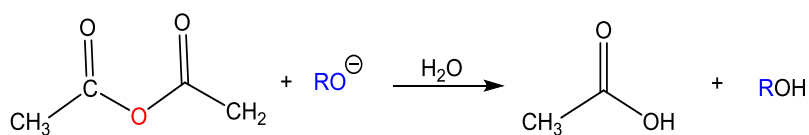
La reacción inicia con el ataque nucleofílico del anión acetato hacia el carbonilo del éster.



La regeneración del doble enlace favorece la ruptura de la flavona generando anhídrido acético.



La adición de agua permite neutralizar a los alcóxidos y la degradación del anhídrido acético al respectivo ácido.



7. CONCLUSIÓN

Partiendo de una forma farmacéutica de diosmina (**1**) se pudo obtener mediante una reacción de acetilación al peracetato de diosmina (**2**), un derivado conocido y de menor polaridad que su precursor, con el cual se logró la hidrólisis selectiva de los acetatos presentes en los anillos aromáticos. Esta hidrólisis selectiva permite restablecer el potencial antioxidante de la porción flavonoide de la molécula, así como permitir posteriores funcionalizaciones en los anillos aromáticos para la generación de otros derivados novedosos.

8. PARTE EXPERIMENTAL

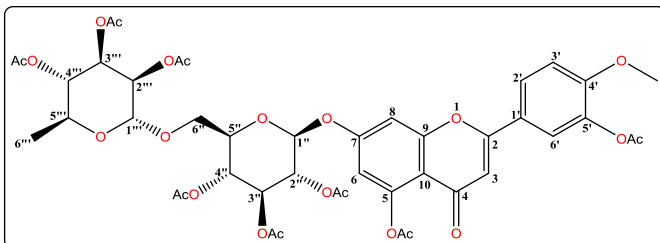
8.1 MÉTODOS INSTRUMENTALES

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C se midieron en un equipo Varian Mercury Plus 400, a 400 MHz y 100 MHz, respectivamente, usando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y como referencia interna tetrametisilano (TMS). Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Scientific y no están corregidos.

8.2 OBTENCIÓN DE MUESTRA DE PARTIDA

Se utilizaron tabletas de 600 mg de diosmina (**1**) del Laboratorio INNOTHERA, con el nombre comercial Phlebodia®, las cuales se trituraron en mortero de porcelana. El polvo obtenido fue sometido a reacción de acetilación.

8.3 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PERACETATO DE DIOSMINA (2)

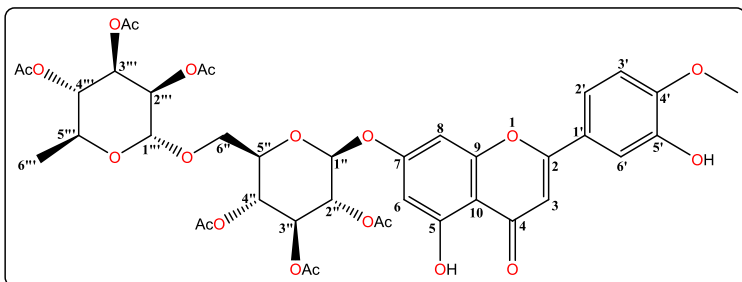


Para realizar la reacción de acetilación se procedió a triturar las tabletas, una vez triturado se pasó a un recipiente y se agregó 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido

acético por cada gramo de muestra; la reacción se llevó sobre baño de vapor por 3 horas, después del tiempo de reacción, se realizó la extracción del producto acetilado, pasando la muestra en embudo de separación y realizando 4 lavados en el siguiente orden: HCl 10%, H₂O, Bicarbonato de Sodio y H₂O, finalmente, se adicionó sulfato de sodio anhidro para retirar exceso de agua y se filtró la fase orgánica. El crudo de reacción (2.24 g) se purificó en cromatografía en columna, usando una columna de 2 cm de diámetro y una altura de sílice de 5 pulgadas, la elución se realizó utilizando un sistema de polaridad 2:8 hexano:acetato de etilo, a partir de la cual se obtuvieron 47 fracciones las cuales se monitorearon en cromatografía en capa fina, el compuesto de interés, peracetato de diosmina (**2**) se encontró en las fracciones 17-24 obteniendo 2.07g un polvo blanco, p.f 132-135 °C

en un rendimiento del 55.27%. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) y de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (tablas 6.2.2 y 6.2.3).

8.4 HIDRÓLISIS SELECTIVA A PARTIR DEL PERACETATO DE DIOSMINA (2) PARA LA OBTENCIÓN DEL DERIVADO 3



Posterior a la reacción de acetilación, el crudo fue sometido el purificado de peracetato de diosmina (2) a reacción de hidrólisis selectiva 3. Esta reacción se

realizó pesando 0.0101 g del peracetato (2) disueltos en 5 mL de metanol, a los cuales se les adicionó 0.0053 g de acetato de sodio, la reacción se colocó a reflujo y se monitoreó en cromatografía en capa fina, observando un cambio de R_f a la hora y media, posteriormente se vertió a un embudo de separación y se extrajo el derivado con acetato y agua (x8). Se obtuvieron La fase orgánica se secó con NaHSO_4 se analizó por RMN ^1H y ^{13}C . Se obtuvo un sólido amarillo con un punto de fusión de 132-135 °C en un rendimiento del 70.72%. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.45 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-6'), 7.40 (1H, dd, $J=8.4\text{Hz}$, 8.4Hz, H-2'), 6.96 (1H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-3'), 6.82 (1H, s, H-3), 6.55 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-6), 6.40 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-8), 5.35-5.12 (6H, m, H-1'', H-2'', H-3'', H-4'', H-3''', H-4'''), 5.05-5.00 (1H, m, H-2'''), 4.773 (1H, s, H-1'''), 3.98 (OCH_3), 3.98-3.93 (1H, m, H-5''), 3.88-3.79 (2H, m, H-5'', H-6''a), 3.72-3.65 (1H, m, H-6''b), 2.09 (COCH_3), 2.07 (COCH_3), 2.05 (COCH_3), 2.04 (COCH_3), 2.03 (COCH_3), 1.94 (COCH_3), 1.16 (3H, d, $J=6\text{Hz}$, H-6'''). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 182.4 (C, C-4), 170.6 (COCH_3), 170.2 (COCH_3), 170.0 (COCH_3), 169.8 (COCH_3), 169.4 (COCH_3), 169.2 (COCH_3), 164.5 (C, C-7), 162.2 (C, C-2, C-5), 157.4 (C, C-4'), 150.0 (C, C-9), 146.0 (C, C-3'), 124.1 (C, C-1'), 119.4 (C, C-6'), 112.6 (C, C-5'), 110.8 (C, C-2'), 106.9 (C, C-3), 104.8 (C, C-10), 100.0 (C, C-1''), 98.0 (C, C-1'''), 97.8 (C, C-6), 94.6 (C, C-8), 73.5 (C, C-5''), 72.4 (C, C-3''), 70.8 (C, C-2''), 70.7 (C, C-4'', C-4'''), 70.8 (C, C-2'''), 69.2 (C, C-3'''), 68.6 (C, C-6''),

66.6 (C, C-5'''), 56.0 (OCH₃), 20.7 (COCH₃), 20.7 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 17.2 (C, C-6''').

9. BIBLIOGRAFÍA

- Cornu-Thénard, A., Boivin, P., Baud, JM., De, VI., Carpentier, PH. Importance of the familiar factor in varicose disease: clinical study of 134 families. *J Dermatol Surg Oncol.* (1994); 20: 318-326.
- Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., and Rodríguez-Landa, J. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Rev Biomed.* (2004); 15: 123- 136.
- Cragg, GM., Newman, DJ. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem.* (2009); 8: 313-331.
- Criado, E., Jonson Jr, G. Venous disease. *Current Problems.* (1991); 28: 339-400.
- Da Conceição Neves, A. Potential Orally-Active Heparin-Like Compounds: Synthesis and Anticoagulant Activity. Tesis presentada para optar el título de: Maestría en Química Farmacéutica. Faculdade De Farmácia Da Universidade Do Porto. (2015).
- Del Río Conesa, J., Ortuño Tomás, A., Marín Martín, F., & Fuster Soler, M. (2003). Patente Nº. 2165299. España: Oficina Española de Patentes y Marcas.
- Escamilla Jiménez, C., Cuevas Martínez, E., and Guevara Fonseca, J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM.* (2009); 52:73-75.
- Fowkes, FGR., Lee, AJ., Evans, CJ., Allan, PL., Bradbury, AW., Ruckley, CV. Lifestyle risk factors for lower limb venous reflux in the general population: Edinburgh Vein Study. *International Journal of Epidemiology.* (2001); 30: 846-52.
- Granados Loarca, E. Uso de flavonoides (hesperidina) en el tratamiento de venas varicosas vesicales sangrantes. *Actas Urol Esp.* (2003); 27: 732-734.
- Grotewold, E. The science of flavonoids. New York: Springer; (2005).
- Gutiérrez Ravelo, Á., and Estévez Braun, A. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.* (2009); 103:409-419.

- Gutiérrez-Venegas, G. Flavonoides en el tratamiento de la hipertensión en pacientes geriátricos. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* (2007); 56: 94-101.
- Havsteen, B. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol.* (1983); 32: 1141-1148.
- Hertog, MGL., Hollman, PCH., y Putte van de, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem.* (1996); 41: 1242-1246.
- Hou, Z., Lambert, JD., Chin, KV., et al. Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancerchemoprevention. *Mutat Res.* (2004); 55: 3-19.
- Kaplan, R., Criqui, M., Denenberg, J., Bergan, J., Fronek, A. Quality of life in patients with chronic venous disease: San Diego population study. *J Vasc Surg.* (2003); 37: 1047-53.
- Kawai, M., Hirano, T., Higa, S., et al. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergol.* (2007); 56: 113-23.
- Korn, P., Patel, S., Heller, J., Deitch, J., Krishnasastri, K., Bush, H., et al. Why insurers should reimburse for compression stockings in patients with chronic venous stasis. *J Vasc Surg.* (2002); 35: 950-7.
- Lee, AJ., Evans, CJ., Hau, CM., Fowkes, FG. Fiber intake, constipation, and risk of varicose veins in the general population: Edinburgh Vein Study. *J Clin Epidemiol.* (2001); 54: 423–429.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J., and Tuñón, M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* (2002); 17: 271-278.
- Mauricio Peñarrieta, J., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J., & Bravo, J. (2014). phenolic compounds in food. *Bolivian Journal Of Chemistry*, 31, p. 68-81.
- McMurry, J. *Química Orgánica*. 7th ed. México, D.F.: Cengage Learning; (2008).
- Miquel Abbad, C., Rial Horcajo, R., Ballesteros Ortega, M., & García Madrid, C. *Guías de Práctica Clínica en Enfermedad Venosa Crónica. Capítulo Español de Flebología y Linfología.* (2015); 1-48.

- Mira, L., Fernandez, MT., Santos, M., et al. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res.* (2002); 36: 199-208.
- Pari, L., Srinivasan, S. Antihyperglycemic effect of diosmin on hepatic keys enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother.* (2010); 64: 477-481.
- Pavía-Ruz, N., Ceballos-Quintal, JM., Medina-Escobedo, C., Ordóñez-Duran, A., Ríos-Rodríguez, H. Magia, religión y medicina. *Rev Biomed.* (1998); 9: 192-8.
- Pérez-Tamayo, R. La medicina de los pueblos primitivos. De la magia primitiva a la medicina moderna. México. SEP. Fondo de Cultura Económica. CONACYT. (1997); 17-29.
- Perrin M, Ramelet A. Pharmacological Treatment of Primary Chronic Venous Disease: Rationale, Results and Unanswered Questions. *Eur J Vasc Endovasc Surg* (2011); 41: 117-25.
- Rabe, E., Pannier-Fischer, F., Broman, K., Schuldt, K., Stang, A., Poncar, C., Wittenhorst, M., Bock, E., Ewer, S., Jackel, KH. Estudio de Bonn sobre las venas, de la Sociedad Alemana de Flebología: Investigación epidemiológica sobre la cuestión de la frecuencia y las manifestaciones de las enfermedades venosas crónicas en la población alemana urbana y rural. *Phlebologie.* (2003); 32: 1-14.
- Ramos, C., Amigo, C., Speranza, N., & Tamosiunas, G. Medicamentos flebotónicos: ¿Qué podemos esperar en el tratamiento de la ivc de miembros inferiores?. *Departamento De Farmacología Y Terapéutica.* (2017); 8: 1-5.
- Reynolds, SRM., Foster, FI. Peripheral vascular action of estrogen, observed in the ear of the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther.* (1940); 68: 173-84.
- Ross, JA., y Kasum, CM. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* (2002); 22: 19-34.

- Saad, T. Synthesis, Spectral Characterization, and Biochemical. Evaluation of Antidiabetic Properties of a New Zinc-Diosmin. Complex Studied in High Fat Diet Fed-Low Dose Streptozotocin. Induced Experimental Type 2 Diabetes in Rats. Department of Biochemistry. Hindawi. (2015); 1-11.
- Sáenz Campos, D. Medicamentos, plantas medicinales y productos naturales. Fármacos. (2004); 16: 13-20.
- Scott, TE., La Morte, WW., Gorin, DR., Menzoian, JO. Risk factors for chronic venous insufficiency: A dual casecontrol study. J Vasc Surg. (1995); 22: 622.
- Sisto, T., Reunanen, A., Laurikka, J., Impivaara, O., Heliövaara, M., Knekt, P., Aromaa, A. Prevalence and risk factors of varicose veins in lower extremities: mini-Finland health survey. Eur J Surg. (1995); 161: 405-14.
- US Department of Agriculture. Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Legacy. Version Current. (2018) Internet: [/nea/bhnrc/ndl](http://nea/bhnrc/ndl).
- Villar del Fresno, AM., Bermejo, P., Carretero, ME. Farmacognosia, conceptos generales. Farmacognosia general. España. Editorial Síntesis; (1999): p. 19-32.
- Willenberg, T., Clemens, R., Haegeli, LM., Amann-Vesti, B., Baumgartner, I., Husmann, M. The Influence of Abdominal Pressure on Lower Extremity Venous Pressure and Hemodynamics: A Human In-vivo Model Simulating the Effect of Abdominal Obesity. Eur J Vasc Endovasc Surg. (2011); 41: 849-855.
- Williams, RJ., Spencer, JP., Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. Free Radic Biol Med. (2004); 36: 838-49.