



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-HIPERCOLESTEROLÉMICA DE
LAS PLANTAS *Terminalia catappa* L (ALMENDRÓN) y *Genipa americana* L
(CARUTO) EN RATONES ALBINOS
(Modalidad: Tesis de Grado)

DANIELA CAROLINA CENTENO ANTÓN Y PEDRO ELÍAS SÁNCHEZ
ZERPA

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2017

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-HIPERCOLESTEROLÉMICA
DE LAS PLANTAS *Terminalia catappa* L (ALMENDRÓN) y *Genipa americana* L
(CARUTO) EN RATONES ALBINOS

Aprobado Por:


Henríquez Wilian
Asesor


Dra. Vilma Lanza
Co-Asesora

Milagros Fariñas
Jurado Principal

Hernando Herrera
Jurado Principal

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	11
Obtención de los extractos.....	11
Obtención de los extractos vegetales.....	11
Análisis fitoquímico.....	12
Alcaloides	12
Flavonoides.....	13
Taninos	14
Glicósidos cianogénicos	14
Antraquinonas.....	14
Saponinas.....	14
Esteroles y triterpenos	15
Polifenoles	15
Cumarinas	15
Lípidos	15
Bioensayos.....	16
Preparación del alimento rico en grasa e inducción de hipercolesterolemia.....	16
Dosificación de los animales con los extractos	17
Toma y procesamiento de las muestras sanguíneas.....	19
Purificación de los extractos.....	20
Caracterización de la estructura de los compuestos obtenidos.....	21

Análisis de resonancia magnética nuclear	21
Espectrometría de masas por electronebulización	22
Análisis estadístico	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
Obtención de los extractos	24
Análisis fitoquímico	25
Bioensayos	29
Inducción de hipercolesterolemia	29
Dosificación con los extractos	30
Contenido de colesterol total en suero de ratones albinos	31
Contenido de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en suero de ratones albinos	33
Análisis de resonancia magnética nuclear	38
Análisis de espectrometría de masas mediante ionización por electronebulización	43
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	49
HOJAS DE METADATOS	54

DEDICATORIA

A

Dios por ser el que me ilumina el camino, me da el valor y la fuerza que necesito para no rendirme.

Mis hijos Dyland José y Kendry Paul quienes con su ternura e inocencia me dieron la fuerza para seguir adelante. Que permanezca en ustedes el motivo de mi alegría y superación. LOS AMO.

Mis madres Murexida y Gladys, Mi tía carolina: Fuentes de amor incondicional y constancia en todo momento de mi vida.

Mi papá Antonio quien desde el cielo me protege y me da su bendición siempre.

Mi esposo Ronald José por su sacrificio, esfuerzo, y confianza pero sobre todo por creer en mi capacidad brindándome su apoyo, comprensión, tiempo y amor para realizarme profesionalmente. Te Amo.

Mi padre y abuela María Elena por su confianza.

Mis hermanos, sobrinos y primos que este logro sirva de estímulo en sus vidas.

Mi cuñada Erycarlis que siempre me brindó su apoyo y extendió sus manos en los momentos más difíciles. Espero que luches por lo que quieres aun cuando se te presenten muchos obstáculos.

La familia Bello Totesautt por su apoyo y paciencia incondicional.

Mis amigas Wildasha, Roselvys, Karen y Roraima quienes fueron mi compañía en todo momento, con las que compartí muchas alegrías y tristezas, sigan adelante.

DEDICATORIA

A

Dios que todo lo puede, a él le debo el haberme puesto con la familia y en el lugar exacto, gracias a él pude sortear todos los obstáculos y que a pesar de que tarde un poco, pude alcanzar mi meta, y con él siempre por delante para lograr todas las que vienen.

Mis padres, Xiomara Emilia Zerpa De Sánchez y Pedro Elías Sánchez Hernández, por ser los mejores e incondicionales, gracias por todo lo que me han dado, a ustedes le debo todo lo que soy, y esta meta cumplida también es de ustedes y por ustedes; le agradezco a Dios tenerlos a mi lado. Los amo.

Mi hermana Marelys Sánchez, porque de una u otra manera siempre has estado presente en todo momento en mi vida, por ser mi confidente y aguantarte mis noches y madrugadas de estudio, espero sea un motivo de inspiración para ti, para que siempre veas hacia adelante y también alcances todo lo que te propongas, y seas un mejor ejemplo para nuestro Thomas.

Darwin Cariaco, desde que te conocí has sido un apoyo incondicional, sin pedir nada a cambio has estado conmigo en las buenas y en las malas, siempre has estado para mí, gracias por todo tu apoyo, gracias por ser como eres y gracias por estar.

Mi familia: Tíos José Sánchez y Rafucho Sánchez y primos Carlos Luis, Hilda, Andrea, Gabriela por siempre contar con ustedes y que de alguna manera fueron parte de este transitar de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Willian Henríquez, quien se tomó el arduo trabajo de transmitirme sus conocimientos los cuales me permitieron llevar a cabo el desarrollo de este proyecto de investigación. Más que mi asesor fue un amigo y un excelente profesional. Gracias por su Apoyo y Confianza Profe.

A la Dra. Vilma Lanza, por su ayuda brindada.

Al Sr. Lesme Ortiz y Julio Bermúdez por su valiosa colaboración prestada en el INIA.

A la Lic. Hellen Bruzual quien con su orientación y profesionalismo me guió en muchas ocasiones en el desarrollo de este proyecto, además, por su valiosa compañía en el Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Willian Henriquez, por su constancia y dedicación a este trabajo, por su apoyo, y por brindarnos su amistad, con sus consejos certeros y siempre con una palabra de aliento.

Al personal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) por toda su colaboración para llevar a cabo el muestreo con los ratones, en especial a Lesme y Julio por estar pendiente en todo momento.

A la Dra. Vilma Lanza por la colaboración con el material necesario para el cuidado de los ratones y por su asesoramiento en este trabajo.

A la Licda. Hellen Bruzual por todos los conocimientos dados en el laboratorio de productos naturales y por su valiosa colaboración para el muestreo con las plantas estudiadas

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contenido nutricional del alimento comercial para ratones (PROTINAL).	16
Tabla 2. Separación de los grupos de ratones para la administración de una dosis diaria de los extractos de <i>Terminalia catappa</i> L (Almendrón) y <i>Genipa americana</i> L (Caruto) y el fármaco rosuvastatina.....	18
Tabla 3. Familias de metabolitos secundarios detectados en las pruebas químicas realizadas a los extractos metanólicos de <i>Terminalia catappa</i> L (Almendrón) y <i>Genipa americana</i> L (caruto).....	28
Tabla 4. Masa promedio de los grupos de animales empleados en el experimento de determinación de efecto anti-hipercolesterolémico de extractos <i>Terminalia catappa</i> L (Almendrón) y <i>Genipa americana</i> L (caruto).....	30
Tabla 5. Rango del contenido del perfil lipídico normal en ratones albinos.	31
Tabla 6. Contenido de colesterol total en suero de ratones albinos, con hipercolesterolemia inducida por una dieta rica en grasa, tratados a diferentes dosis de extractos metanólicos de <i>Terminalia catappa</i> L (almendrón), <i>Genipa americana</i> L (caruto) respectivamente (125 y 250 mg Extracto/kg ratón/día) y fármaco comercial (Crestor = rosuvastatina 8,3 mg/kg/día).	33
Tabla 7. Efecto de extractos metanólicos de <i>Terminalia Catappa</i> L (almendrón), <i>Genipa americana</i> L (Caruto) y fármaco comercial Crestor sobre la concentración de HDL en suero de ratones albinos hipercolestérolemicós.....	35
Tabla 8. Resumen del colesterol total y HDL-colesterol en ratones albinos tratados con extractos metanólicos de <i>G. americana</i> L y <i>T. catappa</i> L.....	36
Tabla 9. Desplazamientos químicos de RMN C del sólido purificado y valores reportados para el manitol.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de maceración y extracción de los constituyentes de las especies vegetales estudiadas. Maceración de: A) Almendrón B) Caruto	11
Figura 2. Rotaevaporador marca Büchi 461	12
Figura 3. Esquema de trabajo para la detección de alcaloides mediante la utilización de los reactivos Dragendorff, Meyer y Wagner.	13
Figura 4. Separación de los ratones albinos machos en grupos durante el suministro de la alimentación rica en grasa.....	17
Figura 5. Dosificación de los extractos y el fármaco rosuvastatina vía oral a los ratones albinos durante el tratamiento (30 días).	19
Figura 6. Extracción de sangre mediante una punción en el ventrículo derecho del corazón en ratones albinos.	20
Figura 7. Prueba de detección alcaloides. I: reactivo de Dragendorff (A) Control positivo (B) Extracto almendrón (C) Extracto caruto; II: Reactivo Meyer (A) Control positivo (B) Extracto almendrón (C) Extracto caruto; III: Reactivo Wagner (A) Control positivo (B) Extracto almendrón (C) Extracto caruto.	25
Figura 8. Prueba de detección flavonoides con virutas de magnesio. Prueba positiva si se observa una coloración roja.	25
Figura 9. Prueba de detección taninos, usando reactivo de gelatina. (A) Extracto almendrón (B) Extracto caruto. Prueba positiva la presencia de un precipitado blanco.	25
Figura 10. Prueba de detección antraquinonas. (A) Extracto almendrón (B) Extracto caruto. La prueba es positiva si se observa una fase acuosa con fluorescencia roja.....	26
Figura 11. Prueba de detección polifenoles, usando cloruro férrico (FeCl ₃). (A) Extracto caruto (B) Extracto almendrón. Una coloración parda evidencia la presencia de polifenoles.	26
Figura 12. Prueba de detección de lípidos. (A) Extracto almendrón (B) Extracto caruto. La aparición de mancha de color marrón-naranja la prueba es positiva.	26
Figura 13. Prueba de detección saponinas. (A) Extracto almendrón (B) Extracto caruto. La prueba es positiva si se evidencia una coloración violeta.	27
Figura 14. Prueba de detección esteroides y triterpenos. (A) Extracto almendrón (B) Extracto caruto. La aparición de un color verde es indicativo de la presencia de esteroides; así como de un color púrpura - rojizo indica triterpenos.	27
Figura 15. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones, RMN ¹ H, (DMSO d ₆ , 300 MHz). A) Del sólido purificado a partir del	

extracto metanólico de <i>Genipa americana</i> L, B) ampliación de la región entre 3,2 – 4,5 ppm (ppm: partes por millón).	39
Figura 16. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece, RMN ^{13}C , (DMSO d_6 , 75 MHz). A) Del sólido purificado a partir del extracto metanólico de la corteza de <i>Genipa americana</i> L, B) ampliación de la región entre 63 – 72 ppm (ppm: partes por millón).	40
Figura 17. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece mediante transferencia de polarización, RMN ^{13}C DEPT 135, (DMSO d_6 , 75 MHz). A) Del sólido purificado a partir del extracto metanólico de la corteza de <i>Genipa americana</i> L, B) Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece, RMN ^{13}C , normal (ppm: partes por millón).	41
Figura 18. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece, RMN ^{13}C . A) Del sólido purificado a partir del extracto metanólico de <i>Genipa americana</i> L, (DMSO d_6 , 75 MHz), B) del manitol (ppm: partes por millón).	42
Figura 19. Estructura química del manitol.	43
Figura 20. Espectro de masas mediante ionización por electronebulización, EM-IEN, del sólido purificado a partir del extracto metanólico de la corteza de <i>Genipa americana</i> L.	44
Figura 21. Espectro de masas en Tándem mediante ionización por electronebulización, EM-ESI, de iones moleculares del sólido purificado a partir del extracto metanólico de <i>Genipa americana</i> L. A) Espectro de EM/EM del ion con relación m/z 382, B) Espectro de EM/EM del ion con relación m/z 387 y C) Espectro de EM/EM del ion con relación m/z 200.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

HMG-CoA:	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
OMS:	Organización mundial de la salud
INIA:	Instituto Nacional de Investigación Agrícola
RMN:	Resonancia magnética nuclear
COSY:	Espectroscopia correlacionada homonuclear
HMQC:	Coherencia cuántica heteronuclear múltiple
HMBC:	Correlación de banda múltiple heteronuclear
IVIC:	Instituto Venezolano de Investigación Científica
RMN ¹ H:	Resonancia magnética nuclear de protones
EM-IEN:	Espectrometría de masas mediante ionización por electronebulización
RMN ¹³ C:	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
HDL:	High density lypoprotein
LDL:	Low density lypoprotein

RESUMEN

Se evaluó el efecto anti-hipercolesterolémico de la hoja de *Terminalia catappa* y la corteza de *Genipa americana* L, las cuales son especies vegetales empleadas en la medicina tradicional para reducir altos niveles de colesterol e hipertensión arterial. En los extractos metanólicos obtenidos de las plantas *T. catappa* L (Almendrón) y *G. americana* L (Caruto), recolectadas en los jardines del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente (*T. catappa*) y en el caserío Las Veguitas, municipio Juan Manuel Cajigal, Onoto-estado Anzoátegui (*G. americana* L), se detectó la presencia flavonoides, taninos, polifenoles, esteroides, saponinas y lípidos. Ambos extractos fueron sujetos a evaluación de efecto hipocolesterolémico en ratones albinos, el proceso fue desarrollado en dos etapas, en una primera fase se les indujo hiperlipidemia a los animales mediante el suministro de alimento suplementado con grasa de pollo en proporción 80/20, para garantizar el aumento del colesterol en sangre; en una segunda etapa los ratones fueron tratados con una solución acuosa de extracto de almendrón o de caruto a dosis de 125 o 250 mg extracto/kg ratón/día por vía oral. Similarmente, otro grupo de animales fue tratado con una dosis de 8,3 mg rosuvastatina/kg ratón/día, como control hipolipidémico. La evaluación del efecto anticolesterolémico evidenció una reducción de los niveles de colesterol de $82,8 \pm 6,7$ mg/dl en ratones hiperlipidémicos a $72,2 \pm 0,8$ y $72,6 \pm 14,4$ mg/dl en ratones tratados con extractos de almendrón y de caruto a la dosis de 250 mg extracto/kg ratón/día, respectivamente. Valores que están muy por debajo del contenido de colesterol en los ratones alimentados con alimento estándar para roedores, $82,8 \pm 6,7$ mg/dl. Estos resultados corroboran el uso empírico que se les da a estas especies vegetales para regularizar los niveles de colesterol y la hipertensión arterial. Adicionalmente, se purificó un sólido, que precipitó en el extracto metanólico de la corteza de *G. americana* L, mediante lavados sucesivos y procesos de recristalización, para el cual los análisis espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de carbono trece y protones, así como los de espectrometría de masas, mediante ionización por electronebulización, coinciden para una sustancia tipo alditol semejante al manitol, aunque con diferencia de $\sim 12^{\circ}\text{C}$ en el punto de fusión. Estos resultados indican que *T. catappa* y *G. americana* L son plantas promisorias para continuar el proceso de evaluación y aislamiento de posibles agentes antilipémicos.

INTRODUCCIÓN

El colesterol es un tipo de lípido de gran importancia para el sistema nervioso y el sistema endocrino; representa el 75% del total de los lípidos del cuerpo humano (Kaul *et al.*, 2001). Es necesario para la realización y regulación de funciones como la formación de los ácidos biliares u hormonas sexuales y tiroideas. El colesterol presente en el organismo proviene de dos fuentes, una parte es aportada por el consumo diario de alimentos y la otra es producida por el mismo organismo (Herrera y Barbas, 2001). Aunque es necesario, un contenido elevado de colesterol constituye un factor de riesgo de determinadas enfermedades cardíacas, principalmente, aterosclerosis, cerebrovascular y vascular periférica (Qureshi *et al.*, 2002). La hipercolesterolemia se produce cuando hay un nivel del colesterol en sangre por encima de lo considerado normal (hasta 200 mg/dl). Este aumento está asociado a problemas coronarios, tipo de dieta, sexo, estilo de vida y la síntesis endógena del organismo (Carratala, 2007).

Existen muchos factores por los cuales el nivel de colesterol puede incrementarse; de manera exógena a través del consumo de alimentos como las carnes rojas, la yema de huevo, carne de cerdo, tocino, jamón, embutidos, entre otros (Durrington, 2003). Los lípidos en exceso ocasionan que el organismo consuma primero otro tipo de nutrientes, favoreciendo que la grasa no se degrade y se acumule en las arterias, lo que conlleva a la posible presencia de un evento cardiovascular, un aumento de la presión arterial, aterosclerosis, además de otras afecciones (Ron *et al.*, 1983).

La hipercolesterolemia es la alteración lipídica más frecuente y constituye uno de los principales factores de riesgo cardiovascular y la primera causa de muerte en la población. Sólo el 30% del colesterol en el cuerpo humano proviene de la dieta, el 70% restante es sintetizado por éste, principalmente en el hígado. En correlación con esto, varias son las causas que pueden elevar los niveles de colesterol, algunas de

ellas no se pueden modificar; sin embargo, la mayoría si se puede cambiar. Existen algunas enfermedades hepáticas, endocrinas y renales además de la administración de ciertas sustancias que favorecen la síntesis de las lipoproteínas de baja densidad (LDL del inglés Low Density Lipoprotein), las cuales transportan el colesterol perjudicial para el organismo; favoreciendo la acumulación de grasa en las arterias y altos niveles de colesterol (Ron *et al.*, 1983).

Se pueden distinguir dos tipos de hipercolesterolemia, una que deriva de problemas en los sistemas transportadores del colesterol y factores genéticos, destacándose las dislipidemias. El otro es generado por el aumento de colesterol asociado a ciertas enfermedades hepáticas, endocrinas y renales, así como la existencia de algunas sustancias como esteroides anabolizantes, progestágenos, betabloqueantes y algunas sustancias hipertensivas que puedan aumentar los niveles de LDL conocido como “colesterol malo” favoreciendo el desarrollo de hipercolesterolemia (Rodríguez *et al.*, 1981; Añez *et al.*, 2007).

Existen numerosos trastornos que pueden ocasionar hipercolesterolemias graves, si su desarrollo se debe normalmente a factores genéticos. Dentro de las formas más importantes de colesterolemia se encuentran la hipercolesterolemia familiar que consiste en un trastorno grave ocasionado por una serie de mutaciones en el gen receptor de las lipoproteínas de baja densidad que transportan el colesterol; en estos casos, el nivel de colesterol se sitúa entre 300 y 500 mg/dl, con consecuencia de enfermedades coronarias precoz, en los hombres aparece entre la cuarta y quinta década de vida, mientras que en las mujeres una década más tarde. Según estudios, el 75% de los hombres con hipercolesterolemia familiar, sin tratamiento, tendrán un infarto antes de los 60 años y las mujeres antes de los 70 años (Buckner *et al.*, 1998; Añez *et al.*, 2007).

Por otro lado, se encuentra la hipercolesterolemia poligénica grave que se caracteriza por un nivel elevado de colesterol-LDL superior a 220 mg/dl, causado por

factores poligénicos en interacción con factores ambientales, especialmente la dieta, asociado a un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, y la hipercolesterolemia familiar combinada que es un trastorno donde los afectados presentan niveles muy elevados de colesterol o de triglicéridos, situándose el valor del colesterol total entre los 250 y 350 mg/dl (Warnick *et al.*, 1990).

La hipercolesterolemia, generalmente, se controla con tratamiento dietético, con el fin de reducir el nivel de colesterol-LDL; otra alternativa es aumentar la actividad física contribuyendo al aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés High Density Lipoprotein) conocido como “colesterol bueno”. El tratamiento farmacológico se reserva para pacientes con formas graves de hipercolesterolemia en los cuales no pueden controlar los niveles de colesterol a través de una dieta saludable por sí sola, dependiendo de medicamentos hipocolesterolémicos (Durrington, 2003).

Para los casos de hipercolesterolemias grave se considera que las decisiones sobre el tratamiento farmacológico se deben basar en una evaluación conjunta de los niveles de LDL y en la valoración global del riesgo cardiovascular de cada individuo. Para estos casos, las estatinas (inhibidores de la enzima HMG-CoA reductasa) inhiben la producción del colesterol en el hígado, siendo estas los mejores fármacos para disminuir el colesterol-LDL, que junto con la intervención de un buen estilo de vida reducen el riesgo de cardiopatía y accidentes cardiovasculares. También, se utilizan unas resinas que al unirse a los ácidos biliares el organismo elimina el exceso de colesterol. Adicionalmente, los fibratos, derivados del ácido fíbrico, ayudan a reducir el colesterol, disminuyendo la cantidad de triglicéridos y aumentando el colesterol-HDL; no obstante, estos fármacos pueden derivar riesgos de efectos secundarios como alteraciones en las células hepáticas, disminución de la función renal, cefalea, entre otros (Pencina *et al.*, 2014).

Otra alternativa aplicada por la población para aliviar sus dolencias es el uso de

la medicina tradicional con hierbas medicinales. En este sentido, desde la antigüedad las plantas han constituido un recurso para el ser humano que les ha permitido curar o aliviar sus enfermedades. Entre las plantas se encuentran las llamadas plantas medicinales, a las cuales se les atribuyen propiedades farmacológicas, por sus efectos curativos, ya que fueron el principal e incluso el único recurso terapéutico disponible en muchas sociedades, conocimiento que ha sido transmitido de generación en generación y aún se conserva con el pasar del tiempo, mediante la propagación de los conocimientos. Los productos naturales obtenidos de las plantas son recursos que en muchos casos son sustancias de menor efecto secundarios que las de origen netamente sintético (De La Cruz 2005).

En un principio, en el momento en que la especie humana comenzó a explorar la naturaleza que le envolvía para satisfacer sus necesidades, lo más accesible eran los minerales y las plantas. Por tal motivo, no resulta extraño que los extractos de plantas hayan sido, desde el principio de los tiempos, la principal fuente de medicinas contra dolencias y enfermedades, además de usarse como alimento, vestuario, vivienda, transporte, perfumes, especies, pinturas, etc (Lietava, 1992). La (OMS) ha estimado que aproximadamente el 80 % de la población mundial depende de la medicina tradicional para remediar sus necesidades de atención primaria, y la mayor parte de esta terapia implica el uso de extractos de plantas (Craig, 1999).

Los productos naturales son sustancias a las que se denominan como metabolitos secundarios derivados de una fuente natural, bien sea plantas, microorganismos, organismos marinos entre otros; cuya función para el organismo que los produce no se conoce con exactitud, aunque se cree que muchos se originan en estos organismos para defenderse de diversos agentes externos. Como consecuencia del resultado de una selección a lo largo de la evolución de las especies, los productos naturales ejercen potentes actividades biológicas, por lo que se han utilizado en terapéutica o tomado como modelo para realizar modificaciones

estructurales específicas y generar nuevos fármacos. De esta forma, los productos naturales o sus derivados constituyen una buena parte del arsenal terapéutico disponible, además de resultar esenciales en algunos casos para identificar y establecer su implicación en una determinada ruta bioquímica (Avedaño, 2010).

Numerosas son las investigaciones científicas que confirman el enorme potencial curativo que poseen muchas plantas, reportadas a diario en la literatura especializada; hasta mediados de la década de los 90 el 47% de los medicamentos obtenidos eran de origen vegetal; adicionalmente, a finales de esa misma década y a principio de los años 2000, se incrementaron las investigaciones que demostraron nuevas aplicaciones de numerosas especies vegetales y sustancias derivadas de estas (Harvey, 2008). En muchos casos, los remedios naturales poseen principios activos, los cuales se potencian biológicamente por la presencia de varias sustancias que complementan su acción, además no se acumulan en el organismo, evitando causar efectos secundarios (Morales *et al.*, 2000).

Se conocen muchos tratamientos naturistas derivados de frutos, hojas, cortezas, raíz de plantas que funcionan como alternativas a tratamientos contra la hipercolesterolemia, especies vegetales como, el jengibre, favorece la buena circulación en las extremidades, ayudando a prevenir problemas circulatorios; la alcachofa, tiene la capacidad de disminuir la presión arterial; el té verde, tonifica el corazón y lo protege contra infarto al miocardio; la alfalfa, evita la formación de placa en las paredes arteriales, lo cual previene las enfermedades del corazón y accidentes cerebrovasculares; el ginkgo, tiene la capacidad de dilatar los vasos sanguíneos y hacer que la sangre circule más fluidamente; el muérdago, actúa contra la aterosclerosis; el ajo, zanahoria, aceite de oliva, calabazas, remolachas, caruto y el almendrón facilitan la circulación al fluidificar la sangre, disminuyen la hipertensión y el colesterol (Castleman, 1991; Morales *et al.*, 2000).

Numerosos estudios han demostrado que el uso empírico de especies vegetales

para aliviar padecimientos humanos está relacionado con ciertos principios activos en los órganos de plantas. En este sentido, Parab y Mengi (2002), evaluaron el efecto hipolipidémico del extracto etanólico de raíces de la especie *Acorus calamus* L, determinando que este ejerce un potente efecto anti-hipercolesterolémico, en ratones albinos alimentados con una dieta aterogénica compuesta de 80 % de pellets de ratarina impregnados con 20% de grasa saturada de pollo, durante 45 días. Similarmente, Daher (2006) evaluó el efecto de un extracto acuoso de las partes aéreas de *Urtica dioica*, encontrando que es una especie valiosa para disminuir niveles de colesterol y LDL en sangre de ratas, no así los niveles de HDL. Ensayos en los cuales se induce hipercolesterolemia en animales y, posteriormente, son tratados con soluciones de extractos vegetales, son una forma útil para evaluar y cuantificar de manera científica lo que muchas personas hacen de manera empírica con ciertas especies vegetales para reducir altos niveles de colesterol en sangre.

Genipa americana L (Caruto), es un pequeño árbol monoico, de 15 m de altura (raramente de 25 m) y tronco cilíndrico, recto, de hasta 60 cm de diámetro. Hojas opuestas, lanceoladas a oblongas, 20-35 cm de largo y 10-20 cm de ancho, verdes oscuras lustrosas, de margen entero, se cultiva por su fruto comestible, para bebidas, mermeladas, helados y polvos azucarados (Trevor *et al.*, 2008). Se conoce en la medicina tradicional por su potencial utilidad en aplicación para tratamientos de enfermedades como la diabetes tipo II y las de origen hepáticas (Ramos *et al.*, 2014), además, en la medicina popular paraguaya se le atribuyen usos como depurativo, anti anémico, hipotensor, tónico, diurético, purgante (raíces), hepático, anti icterico, astringente, antidiarreico, antirreumático, vulnerario, antiséptico, antisifilítico, antiasmático, antirreumático, antidiabético, hipocolesterolémico, adelgazante, afrodisíaco (Hurrel *et al.*, 2016).

Un uso antiguo de *G. americana* L es el colorante violeta oscuro que se produce a partir del jugo del fruto de esta especie vegetal, empleado por los indígenas para

teñir su rostro cuando iban a combate con sus adversarios. El componente responsable de esta coloración es un principio activo denominado como genipina, el cual ha sido estudiado desde diversas perspectivas incluyendo la formulación de pigmentos de diversos colores para la industria alimenticia y de cosméticos decorativos, así como entrecruzante atóxico para la formulación de hidrogeles basados en biopolímeros con grupos amina, para la preparación de bioadhesivos usados en el tratamiento de heridas y como soporte basados en proteínas para la regeneración de nervios; también, se utiliza como reactivo forense para el levantamiento de huellas dactilares latentes en productos de papel (Hendry y Houghton, 1996; Fernández, 2001; Lárez *et al.*, 2014).

Terminalia catappa L (Almendrón) es una combretácea ampliamente distribuida en las zonas tropicales y subtropicales del planeta, se desarrolla hasta una envergadura de 35 m, con una corona de ramas simétricas horizontales dirigidas hacia arriba. Cuando el árbol envejece, la corona de ramas se hace más aplanada, hasta formar una especie de jarrón. Las hojas son grandes, de 15 a 25 cm de longitud y de 10 a 14 cm de ancho, ovoides, verde oscuro y coriáceos brillantes, desprendiéndose en la época seca, antes de caer cambian el color a rosado rojizo o amarillo parduzco; el fruto es una drupa de 5 a 7 cm de longitud y de 3 a 5,5 cm de ancho, verdes en un principio, luego cuando maduran son amarillas y adquieren tonalidades rojizas antes de su caída; su fruto contiene una sola semilla (Lin *et al.*, 1997).

Esta planta posee una amplia gama de cualidades beneficiosas para la salud, convirtiéndose en una especie que constituye un blanco importante como fuente natural para el desarrollo de formulaciones que puedan disminuir la incidencia de enfermedades (Paarakh, 2010). Debido a sus riquezas en principios activos, las hojas, e incluso la corteza, son utilizadas en medicina tradicional con distintos propósitos, para tratar algunas afecciones del hígado como hepatitis, en el riñón como ayuda para la diuresis y problemas en la circulación (Rojas *et al.*, 1984; Camacho, 2005). En

Taiwan, La India, Filipinas, Malasia e Indonesia sus hojas son empleadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la dermatitis y la hepatitis (Hernández *et al.*, 2003).

En el sudeste asiático, las hojas y cortezas del almendrón son ampliamente utilizadas como una medicina popular para el tratamiento de dermatosis, hepatitis, candidiasis, infecciones bucales y enfermedades intestinales en los niños. En la medicina moderna, se han reportado muchos estudios farmacológicos en relación a extractos de hojas y cortezas de esta especie vegetal, a los cuales se les atribuyen ciertos efectos anti-cáncer (Zhai *et al.*, 2001), antioxidante (Masuda *et al.*, 1999; Kinoshita *et al.*, 2007), sobre la replicación del VIH, porque inhiben la transcriptasa inversa VIH-124 y además inhiben la anhidrasa carbónica.²⁵; la transcriptasa inversa anti-HIV (Tan *et al.*, 1991), hepatoprotector (Masuda *et al.*, 1999; Jing *et al.*, 2004), antifúngicas contra *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii*, y *Aspergillus fumigatus* (Goun *et al.*, 2003), y antibacterianos frente a *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Kloucek *et al.*, 2005).

Según Muhammad y Mudi (2011) y (Ruiz *et al.*, 2013), las hojas de *Terminalia catappa* L. contienen varios flavonoides (como el kamferol o quercetina), taninos (tal como la punicalina, punicalagina o tercatina), saponinas y fitosteroles. Etnobotánicamente se utiliza el cocimiento de las hojas para bajar la presión arterial, mezcladas con aceite alivian los dolores de pecho, las hojas rojas se usan como vermífugas, las hojas secas son usadas para el tratamiento de los patógenos que afectan a los peces como una alternativa a los antibióticos. La corteza raspada o molida se toma para calmar la diarrea y los cotiledones de las semillas secas se comen crudo para bajar el colesterol. Tiene un fruto alimenticio, antidiarreico, útil contra las migrañas y los cólicos. La madera seca se usa como combustible en forma de leña, además la planta es utilizada en procesos de reforestación mixta en la recuperación de áreas degradadas.

T. catappa L posee un efecto antioxidante, ya que los extractos acuosos obtenidos de sus hojas inhiben la peroxidación lipídica; además, se usa para tratar la dermatitis, disentería y diarrea. Se ha afirmado que las hojas contienen agentes químicos como los taninos, que son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas, las cuales tienen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antiagregantes plaquetarios, anticarcinogénicos y quimioprotectores (Asolkar y Kakkar, 1992).

Además de beneficios medicinales, *T. catappa* posee propiedades útiles en la industria alimentaria ya que se ha demostrado que tiene una pulpa de alto rendimiento y sólidos solubles que son adecuados para su uso en la industria. Además, el análisis nutricional basado en la materia seca mostró resultados favorables debido a la presencia de carbohidratos y alto contenido de fibras, así como su alta capacidad de absorción de agua y aceite evidencia las propiedades que confirman su idoneidad para uso en la industria alimentaria (Vasconcelos *et al.*, 2016).

En la medicina tradicional *T. catappa* es usada en aldeas y tribus de muchos estados en la India, para curar fiebre, tos, enfermedades de la piel, infección del tracto urinario e infecciones de orina, además, esta planta es eficaz contra algunos microorganismos patógenos implicados en sus heridas, quemaduras e infecciones de piel. Por lo tanto, esta especie vegetal se puede utilizar en el tratamiento de estas dolencias, además de que extractos de esta resultaron ser activo contra *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, seguidos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Shinde *et al.*, 2009).

Existe información que los taninos como la punicalina y la punicalagina ejercen actividad antihepatotóxica y una fuente de acción antioxidante que, a dosis muy bajas, fue utilizado en un modelo de daño hepático inducido por tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratas; así mismo, existen investigaciones que demuestran que,

tanto la punicalina como la púnica-lagina son abundantes en el almendrón y poseen efectos sobre la replicación del VIH, porque inhiben la transcriptasa reversa y, además, inhiben la anhidrasa carbónica la Punicalina y punicalagina, también, presentan actividad antiinflamatoria a dosis bajas en modelo de inducción de inflamación por carragenina en ratas (Hernández *et al.*, 2003).

Las especies vegetales *Genipa americana* L (Caruto) y *Terminalia catappa* L (Almendrón) son utilizadas en la medicina folclórica como ayuda para disminuir los niveles de colesterol por algunos pobladores en el oriente venezolano, por esta razón, estas plantas fueron seleccionadas para evaluar su potencial anti-hipercolesterolémico y, de esa forma, contar con información científica que soporte sus usos en la etnobotánica como una elección terapéutica de origen natural con aplicaciones que se consideran valiosas en la medicina tradicional y cuya materia prima es abundante y de fácil acceso.

METODOLOGÍA

Obtención de los extractos

Las muestras de *Terminalia catappa* L. fueron recolectadas en los jardines de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, y de *Genipa americana* L. en el caserío Las Veguitas, municipio Juan Manuel Cajigal, Onoto-Estado Anzoátegui. Luego, fueron trasladadas al Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química, Núcleo de Sucre, de la Universidad de Oriente donde fueron procesadas. La identificación de las plantas fue realizada por comparación con especímenes depositados en el Herbario Isidro Ramón Bermúdez Romero (IRBR) del Departamento de Biología, de la misma institución.

Obtención de los extractos vegetales

Las hojas de *Terminalia catappa* L. y la corteza de *Genipa americana* L fueron secadas en la sombra, a temperatura ambiente; luego el material vegetal seco fue pulverizado por separado, utilizando un molino eléctrico. La materia orgánica fue pesada y colocada en envases de vidrio para la maceración en metanol (Figura 1).



Figura 1. Proceso de maceración y extracción de los constituyentes de las especies vegetales estudiadas. Maceración de: A) Almendrón B) Caruto

El macerado, de la materia orgánica, se realizó en metanol para así obtener la mayor cantidad de metabolitos secundarios. El proceso de maceración- extracción fue

realizado hasta agotamiento en ambos casos, cada proceso de extracción fue realizado entre 48 a 72 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las soluciones metanólicas tanto de *Terminalia catappa* L como *Genipa americana* L fueron concentradas a presión reducida, utilizando un rotaevaporador marca Büchi 461 (Figura 2) para eliminar el solvente y así obtener los extractos crudos.



Figura 2. Rotaevaporador marca Büchi 461

Análisis fitoquímico

A cada uno de los extractos crudos, se le realizaron pruebas químicas con ciertos reactivos de clasificación, para así poder tener una visión de la presencia o ausencia de algunas familias de metabolitos secundarios (alcaloides, polifenoles, esteroides y triterpenos, saponinas, entre otros) siguiendo la metodología de Marcano y Hasegawa (2002).

Alcaloides

Del extracto casi seco, se tomó una pequeña fracción y se colocó en un tubo de ensayo, redisolviéndola después con HCl al 10% y agitándola con un solvente inmiscible (cloroformo); la mezcla fue trasvasada a un embudo de separación, se dejó en reposo por un instante, hasta que se observaron las dos fases; la fase acuosa se alcalinizó con hidróxido de amonio (NH_4OH) al 10% y se extrajo con cloroformo, obteniéndose dos nuevas fases, las cuales, junto a la primera, fueron analizadas por separado, utilizando reactivo de Dragendorff, Meyer y Wagner los cuales detectan

alcaloides básicos, débilmente básico y sales cuaternaria, en la figura 3 se visualiza el protocolo de trabajo.

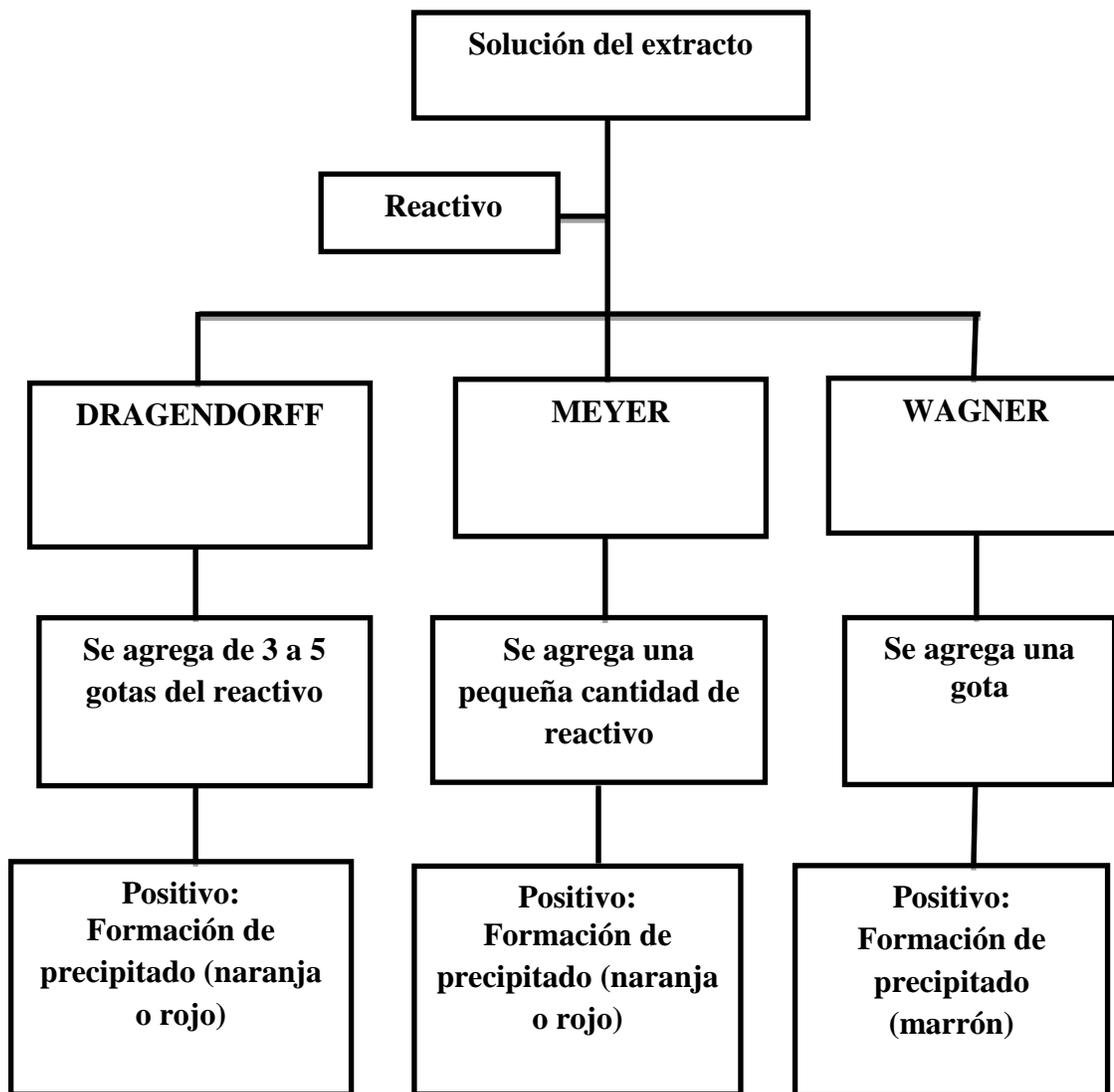


Figura 3. Esquema de trabajo para la detección de alcaloides mediante la utilización de los reactivos Dragendorff, Meyer y Wagner.

Flavonoides

Del extracto crudo, disuelto en agua destilada, se tomó un ml, se desgrasó con éter de petróleo, se filtró y el residuo se analizó para flavonoides, empleando los siguientes métodos: se tomó parte del residuo y se colocó en un tubo de ensayo. Se

agregaron 5 gotas de HCl concentrado y virutas de magnesio. El “test” se considera positivo para flavonoides si se produce una coloración roja al dejar en reposo la reacción por unos 10-20 minutos.

Una gota del extracto se colocó sobre un papel de filtro y se roció con una solución de cloruro de aluminio al 1% en etanol. La aparición de una mancha fluorescente amarilla bajo luz ultra violeta (UV) indica la presencia de flavonoides.

Taninos

En tubos de ensayo se añadieron de 6 a 10 gotas de los extractos crudos, luego se agregó un ml de agua destilada y varias gotas (4-6) de reactivo de gelatina al 1% en NaCl al 1%, la prueba es positiva con la presencia de un precipitado blanco.

Glicósidos cianogénicos

Para detectar glicósidos cianogénicos, al material fresco macerado se le añadieron unas gotas de cloroformo y se calentó entre 50 y 70°C en un tubo de ensayo cerrado, los vapores fueron puestos en contacto con un papel de filtro impregnado en una solución al 1% de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10%. Los compuestos cianogénicos se manifiestan como una mancha roja sobre el papel.

Antraquinonas

Se agitaron 3 ml de los extractos con 5 ml de NaOH al 5%, la mezcla se observó a simple vista y bajo luz ultravioleta, si se observa una fase acuosa roja o amarilla con fluorescencia roja hay antraquinonas presentes.

Saponinas

A una pequeña cantidad de los extractos crudos previamente colocados en tubos de ensayo, se le agregó una gota del reactivo de vainilla en etanol y una gota de ácido sulfúrico, se asumió la presencia de saponinas si se evidencia una coloración violeta.

Hay una prueba simple que consiste en agitar una solución acuosa del extracto y si se forma una espuma consistente por 20 min es positivo para saponinas.

Esteroles y triterpenos

Una parte del crudo total se hidrolizó con HCl al 10%, luego el hidrolizado se concentró y se extrajo con cloroformo. Tanto el crudo como el extracto orgánico provenientes de la hidrólisis, se analizaron para esteroles y triterpenos, ensayándose con la fase orgánica con un ml de anhídrido acético y unas gotas de H_2SO_4 agregado por las paredes del tubo. Una coloración azul o verdosa es indicativo de la presencia de esteroles, mientras que una coloración roja o violeta se considera positivo para triterpenos.

Polifenoles

Para la detección de polifenoles, el extracto crudo se evaporó a sequedad, se retomó en agua destilada y se filtró. Seguidamente, se hizo reaccionar con una solución de cloruro férrico ($FeCl_3$), el cambio hacia una coloración parda indica la presencia de fenoles.

Cumarinas

Se agregó una pequeña cantidad de los extractos a tubos de ensayos, luego se añadieron 2 ml de etanol, se tapó el tubo con papel de filtro previamente impregnado con NaOH. Se calentaron los tubos a ebullición aproximadamente por 5 minutos en baño de María, se dejó secar el papel y se observó bajo luz ultravioleta; las cumarinas se evidencian con la presencia de manchas fluorescentes verdes, amarillas o rojas.

Lípidos

Se agregaron de (1-3) gotas de los extractos en papel de filtro y se dejó secar a temperatura ambiente; luego se expuso el papel a vapores de yodo. La aparición de

mancha de colores marrón-naranja indican la existencia de lípidos.

Bioensayos

Preparación del alimento rico en grasa e inducción de hipercolesterolemia

El procedimiento para la determinación del efecto anti-hipercolesterolémico de los extractos metanólicos de *Terminalia catappa* L y *Genipa americana* L fue realizado en dos etapas; en primer lugar ratones en condiciones normales fueron alimentados durante 30 días con una dieta rica en grasa para garantizar el aumento del contenido lipídico en su organismo. La dieta suministrada fue un alimento convencional estándar para roedores, con un contenido nutricional balanceado, como es presentado en la tabla 1; el cual fue suplementado con grasa de pollo en una relación de 80% de alimento estándar para roedores y 20% de grasa de pollo. Se prepararon porciones de 2 kg de alimento para asegurar su preservación, en la relación de aproximadamente 1600 g de alimento por cada 400 g de grasa absorbida, para ello los *pellet* del alimento fueron sumergidos en aceite de la grasa de pollo por un lapso de tiempo de 2 horas, luego fueron separados y almacenados para que se escurriera el remanente de aceite no absorbido por los mismos, finalmente, fueron pesados para cuantificar el contenido de grasa absorbida.

Tabla 1. Contenido nutricional del alimento comercial para ratones (PROTINAL).

Nutrientes	%
Proteínas	19,53
Fibra	3,24
Cenizas	4,73
Energía bruta (kcal/g) *	3,99
Energía metabolizable (kcal/g)*	3,30
Grasa	1,0

*Kcal: kilocalorías * g: gramos

La población de animales utilizada en esta investigación fue de 28 ratones albinos machos, con edad de 4 semanas y una masa entre 23,75 a 25,90 g en el

momento de inicio del experimento; los roedores fueron mantenidos en jaulas de metal especial para cría de ratones 43x23x22 cm, con capacidad para cinco animales. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar a temperatura promedio de 25°C, humedad relativa de 75% y ciclos luz/oscuridad de 12 horas. Los ratones fueron separados en grupos de 4 animales por jaula como se muestra en la figura 4; seis grupos de cuatro ratones fueron mantenidos con alimento estándar para roedores suplementados con 20% de grasa de pollo y el otro grupo fue alimentado sólo con alimento estándar para roedores.



Figura 4. Separación de los ratones albinos machos en grupos durante el suministro de la alimentación rica en grasa.

Dosificación de los animales con los extractos

En base a la metodología de Nagarajan (2005), en la segunda fase de la investigación, se llevó a cabo la administración del tratamiento a base de los extractos de las plantas a los ratones. Cada extracto fue dosificado a dos concentraciones diferentes, una por grupo de animal, 125 y 250 mg extracto/kg ratón por día, administrados por vía oral en dosis de 100 o 200 μ l por día; tomando en consideración que en promedio los ratones tenían 30 g de masa después del periodo de la alimentación suplementada con grasa. Adicionalmente, a un grupo de ratones alimentados con dieta estándar y a otro grupo alimentado con dieta suplementada con

grasa de pollo, denominados como controles normales e hipercolesterolémico, fueron tratados sólo con 200 µl de agua destilada, para asegurar que no hubo ninguna perturbación en el contenido lipídico de los animales por agentes externos y tener una buena relación de este parámetro entre los animales tratados o no con los extractos. Además, un grupo de ratones fue tratado con dosis de 8,3 mg rosuvastatina/kg ratón por día, como un control anti-hipercolesterolémico, dosificada por vía oral en 250 µl.

El tratamiento fue administrado durante 30 días, una dosis diaria y a la misma hora (10 am); en esta etapa los grupos fueron divididos de acuerdo a cada una de las dosis y los extractos administrados, almendrón y caruto, así como controles estándar, hiperlipídico y antihiperlipídico. Se consideró como control positivo al grupo al cual se le administró el fármaco comercial (Crestor) cuyo principio activo es la rosuvastatina, el cual reduce el colesterol en sangre; en la tabla 2 son presentados los grupos formados para esta fase. Durante esta etapa de tratamiento fue suspendida la alimentación rica en grasa y se usó el alimento estándar en la condición nutricional indicada en la tabla 1.

Tabla 2. Separación de los grupos de ratones para la administración de una dosis diaria de los extractos de *Terminalia catappa* L (Almendrón) y *Genipa americana* L (Caruto) y el fármaco rosuvastatina.

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg muestra /kg ratón por día)*
I Control Normal	Agua	-
II Control Hiperlipidémico	Agua	-
III	Almendrón	125
IV	Almendrón	250
V	Caruto	125
VI	Caruto	250
VII Control Antilipidémico	Rosuvastatina	8,3

*mg: miligramos. *kg: kilogramos.

El tratamiento con los extractos y el fármaco a los ratones se le aplicó de forma oral a cada uno con una jeringa para insulina, para así garantizar la ingesta de la dosis deseada, como se muestra en la figura 5.



Figura 5. Dosificación de los extractos y el fármaco rosuvastatina vía oral a los ratones albinos durante el tratamiento (30 días).

Toma y procesamiento de las muestras sanguíneas

Una vez culminado el tratamiento de los ratones con los extractos y la rosuvastatina, se realizó la toma de muestra de sangre. Para realizar la toma de muestra, los animales fueron sedados con cloroformo, luego, mediante una incisión ventral con prolongación a la región pectoral permitió observar el corazón, y mediante una punción con una inyectora en el ventrículo derecho del corazón se extrajo la muestra de sangre, como se observa en la figura 6. Finalizada la extracción, las muestras fueron trasladadas al laboratorio clínico María Sofía ubicada en el Peñón, Cumaná, estado Sucre, para su procesamiento.

Las diferentes muestras sanguíneas fueron centrifugadas en tubos de vidrio a 6000 rpm, el suero sobrenadante fue utilizado para determinar los valores séricos de colesterol y HDL-colesterol. Para el colesterol, se utilizó un kit comercial marca Helfa siguiendo la técnica de punto final o equilibrio que se fundamenta en incubar la muestra y el reactivo durante 5 minutos a 37°C para que se complete la reacción; si no fuese así y quede parte de la sustancia sin reaccionar, al realizar la medida del complejo formado, se estaría midiendo menor cantidad de la que realmente hay; por esta razón se mide al final de un tiempo fijo de incubación establecido de tal forma

que haya reaccionado todo el contenido lipídico; se realizó el método de colesterol esterasa en donde la enzima colesterol-esterasa (CE) hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos. En presencia de oxígeno, el colesterol libre es oxidado por el colesterol Oxidasa (CO) a colesterol-4-en-3-1 y peróxido de hidrógeno; y para el HDL-colesterol se utilizó un kit comercial Stambio de igual manera siguiendo la técnica de punto final o equilibrio con el método directo, en el cual se solubiliza y consume el colesterol libre o unido a proteínas distintas de la HDL en una reacción que involucra a colesterol oxidasa (CHO), peroxidasa (POD) y N-etil-N-(2-hidroxipropil)-3-toluidina disódica (TOOS) dando lugar a un producto no coloreado. En una segunda etapa, un detergente solubiliza específicamente las HDL. El HDL-colesterol es liberado para reaccionar con colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa. Las muestras se procesaron de forma manual en un equipo Millennium III Stat fax. Las lecturas de los valores del contenido lipídico se obtuvieron en concentraciones de mg/dl.



Figura 6. Extracción de sangre mediante una punción en el ventrículo derecho del corazón en ratones albinos.

Purificación de los extractos

En el extracto de *Genipa americana* L precipitó un sólido, el cual fue separado mediante lavados sucesivos con metanol; posteriormente, fue recristalizado con metanol a ebullición y enfriamiento a temperatura ambiente varias veces hasta

obtener un sólido lo más puro posible. Al sólido se le determinó el punto de fusión, el cual estuvo entre 149 – 153°C.

Caracterización de la estructura de los compuestos obtenidos

Análisis de resonancia magnética nuclear

Los cristales obtenidos del extracto metanólico de *Genipa americana* L (caruto) fueron analizados por RMN de carbono trece y de protones. La muestra fue disuelta en dimetil sulfoxido deuterado (DMSO_6) y la solución resultante fue colocada en un tubo de resonancia de 5 mm de diámetro, para luego ser introducidas en un espectrómetro Bruker Advance de 300 MHz. Los análisis de RMN en una y en dos dimensiones, homo y heteronuclear (COSY, HMQC, HMBC) fueron realizados en el laboratorio de RMN del centro de Química en el IVIC.

El método se basa en la absorción de energía por el cambio del espín nuclear de átomos sometidos a un campo magnético externo. El análisis del espectro de RMN ofrece evidencias bastantes explícitas sobre las características de los núcleos que conforman una molécula, y los más frecuentes analizados son ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , y ^{31}P . Los desplazamientos químicos de los núcleos atómicos en un análisis de RMN de ^1H (0- 10 ppm) y de ^{13}C (0- 200 ppm) dan información acerca de la naturaleza de hidrógenos (alifáticos, aromáticos, olefinicos, geminales y/o unidos a heteroátomos) y de carbono (alifáticos, olefinicos, aromáticos, carbonílicos oxigenados, etc.). Por la integración de las señales y el acoplamiento espín-espín que comúnmente se observa en el espectro de protones, se deduce el número de hidrógenos y el modo de distribución en la molécula, mientras que el número de señales presentes en el espectro de carbono indica el número de carbonos presentes en la estructura, si no existen átomos simétricos. En los espectros donde se preserva el acoplamiento C-H, la multiplicidad de la señal evidencia el número de átomos de hidrógenos unidos al carbono responsable de la señal (Marcano y Hasegawa, 2002).

El HMQC es un experimento de correlación heteronuclear que permite correlacionar protones y carbonos unidos directamente a un enlace con una alta sensibilidad, mientras que el HMBC establece la correlación entre protones y carbonos separados por 2 ó 3 enlaces. El HMBC es esencialmente un experimento HMQC adecuado a la detección de correlaciones a través de acoplamientos débiles. Una de las ventajas de este experimento es que permite detectar los carbonos cuaternarios acoplados a protones. Esta técnica de correlación heteronuclear a 2 ó 3 enlaces permite obtener información importante en la determinación estructural; los datos que suministra el HMBC lo convierte en un experimento muy utilizado para ensamblar una estructura desconocida a partir de fragmentos conocidos (Adams, 2001).

Espectrometría de masas por electronebulización

Esta técnica es la más sencilla para determinar la masa molar de un compuesto, e incluso, la fórmula molecular correspondiente. La ionización por electronebulización o electrospray es una técnica de espectrometría de masas de ionización “blanda” (EM-IEN) que genera solo iones moleculares, sin fragmentación. Es especialmente útil en la producción de iones a partir de macromoléculas, pues supera la propensión de éstas a fragmentarse cuando se ionizan. Para llevarse a cabo, en un principio, se introduce el analíto (a ionizarse) disuelto en un solvente más volátil a través de un capilar de metal muy pequeño y cargado; debido a la repulsión de las cargas eléctricas, el líquido sale del capilar y se forma un aerosol, una nube o niebla de pequeñas gotas (10 μm) altamente cargadas (Fenn *et al.*, 1990)

El proceso se repite hasta que el analíto esté libre de solventes, de modo que no quede más que iones moviéndose hacia el analizador de masas. Estos análisis de espectrometría de masas, mediante ionización por electronebulización o EM/IEN de sus siglas en inglés fueron realizados en un espectrómetro de masas cuadrupolar QMS Finnigan TSQ Quatum ThermoScientific-Scientificinstrumenst, en el laboratorio

de Espectrometría de Masas del Centro de Química en el IVIC.

Análisis estadístico

El ensayo de productos naturales bioactivos demanda comparaciones, ya sea de abundancia de estos compuestos en el material del cual se aíslan, como de su potencia en diversos materiales biológicos. En estos estudios se trata de minimizar el número de ensayos por economía, tanto de los productos aislados como del material biológico de ensayo, que puede ser costoso o experimentar sufrimiento. En las muestras experimentales, necesariamente pequeñas por las razones antes señaladas, no es posible determinar la función de distribución de probabilidad de los datos, por ello los análisis estadísticos en este trabajo se hicieron usando procedimientos estadísticos no paramétricos, también llamados libres o independientes de distribución (Hollander y Wolfe, 1973).

Los resultados se representan como medianas y su intervalo de confianza (IC) del 95% calculado por el método de Hodges y Lehmann, según Hollander y Wolfe (1973).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados experimentales generados del procesamiento del material vegetal, de las especies vegetales *T. catappa* L (Almendrón) y *G. americana* L (Caruto), con metanol para obtener los extractos crudos y posterior análisis químicos de los mismos, así como producto del tratamiento de ratones albinos hipercolesterolémico con los extractos son presentados a continuación.

Obtención de los extractos

Para el inicio del desarrollo de este trabajo investigativo, se realizó un proceso de extracción con las muestras de las hojas de almendrón y la corteza de caruto, previamente lavadas, deshidratadas y molidas. Es importante resaltar que, para la conservación de las muestras, las condiciones de almacenamiento fueron muy controladas para evitar alteraciones posteriores. El almacenamiento se realizó en un lugar fresco a temperatura ambiente, teniendo presente que la temperatura es un factor importante en la conservación debido a que el calor puede producir pérdidas y alteración de los constituyentes químicos bien sea por fragmentaciones moleculares o por reacciones químicas que puedan tener lugar. El material obtenido de ambas plantas fueron pesadas en una balanza analítica y conservado en envases de vidrios, con tapa hermética; se procesaron 207 y 230 g de corteza de caruto en dos porciones respectivamente, y de almendrón 170 g.

El proceso de extracción se llevó a cabo con metanol que es un solvente de polaridad creciente, para poder obtener extractos con diferentes polaridades, arrastrando metabolitos secundarios con diferente polaridad; lográndose así una separación inicial-parcial, facilitando la eficacia en el desarrollo de las técnicas de separación aplicadas posteriormente; luego de este proceso se obtuvo como precipitado del caruto 0,0991 g mientras que de almendrón se obtuvieron 98,43 g.

Análisis fitoquímico

El análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de *Terminalia catappa* L (Almendrón) y la corteza de *Genipa americana* L (Caruto), se realizó partiendo de extractos metanólicos, ya que este solvente tiene la capacidad de extraer compuestos de una amplia gama de polaridades. La metodología seguida para este análisis fue la previamente estandarizada por Marcano y Hasegawa (2002), la cual contempla la detección de familias de metabolitos secundarios utilizando reactivo accesible y alta sensibilidad de detección. A continuación, en las figuras (7-14) se observan los resultados.

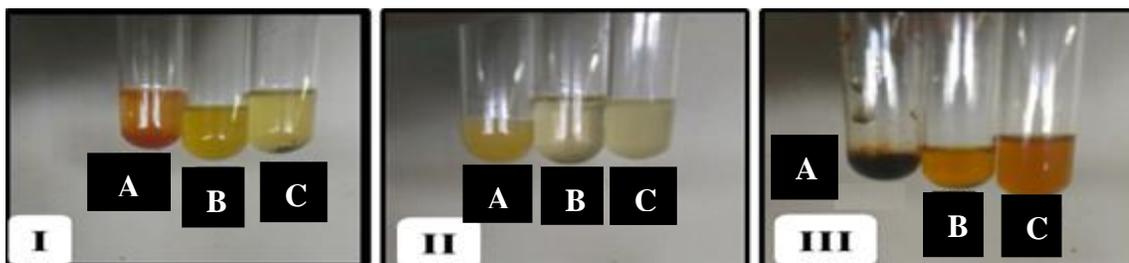


Figura 7. Prueba de detección alcaloides. I: reactivo de Dragendorff (A) Control positivo (B) Extracto almendrón (C) Extracto caruto; II: Reactivo Meyer (A) Control positivo (B) Extracto almendrón (C) Extracto caruto; III: Reactivo Wagner (A) Control positivo (B) Extracto almendrón (C) Extracto caruto.



Figura 8. Prueba de detección flavonoides con virutas de magnesio. Prueba positiva si se observa una coloración roja.

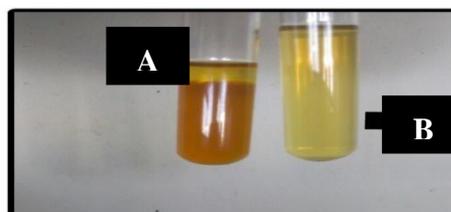


Figura 9. Prueba de detección taninos, usando reactivo de gelatina. (A) Extracto almendrón (B) Extracto caruto. Prueba positiva la presencia de un precipitado blanco.

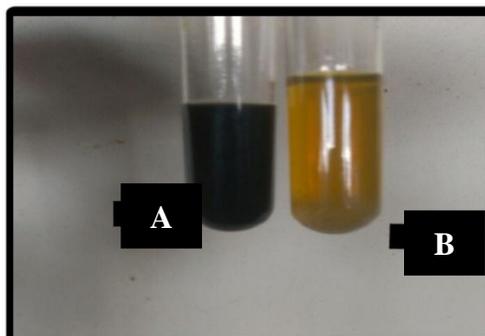


Figura 10. Prueba de detección antraquinonas. (A) Extracto almendrón (B) Extracto caruto. La prueba es positiva si se observa una fase acuosa con fluorescencia roja.

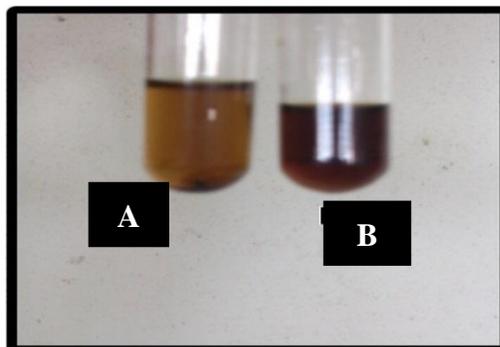


Figura 11. Prueba de detección polifenoles, usando cloruro férrico (FeCl_3). (A) Extracto caruto (B) Extracto almendrón. Una coloración parda evidencia la presencia de polifenoles.

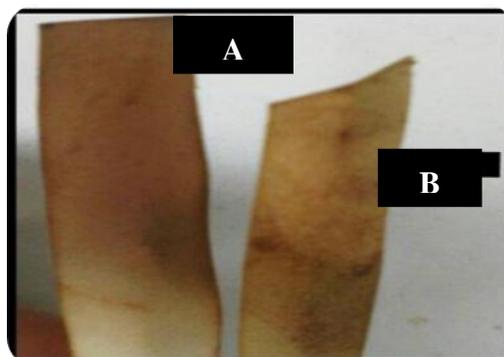


Figura 12. Prueba de detección de lípidos. (A) Extracto almendrón (B) Extracto caruto. La aparición de mancha de color marrón-naranja la prueba es positiva.

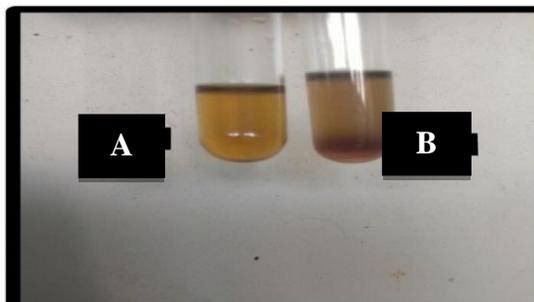


Figura 13. Prueba de detección saponinas. (A) Extracto almendrón (B) Extracto caruto. La prueba es positiva si se evidencia una coloración violeta.

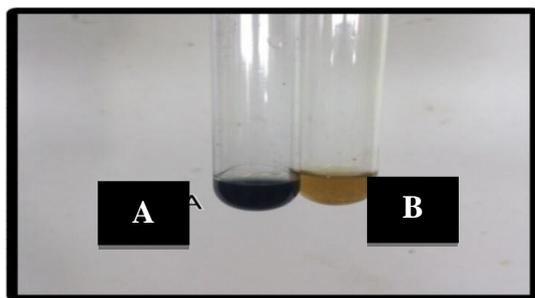


Figura 14. Prueba de detección esteroides y triterpenos. (A) Extracto almendrón (B) Extracto caruto. La aparición de un color verde es indicativo de la presencia de esteroides; así como de un color purpura - rojizo indica triterpenos.

Los resultados de las pruebas químicas indican que alcaloides, glicósidos cianogénicos y cumarinas no fueron detectados en los extractos; en el caso de los flavonoides, la prueba con virutas de magnesio evidenció su ausencia, mientras que la exposición a vapores de amoníaco y visualización con luz ultravioleta evidenció presencia relativamente abundante en el extracto de almendrón y escasa en el extracto de caruto. En cuanto a la prueba de taninos, tanto en el extracto de almendrón como en el de caruto, se detectó presencia escasa de esta familia de metabolitos secundarios, resultado similar se obtuvo en el caso de los lípidos. De forma semejante, se observó presencia escasa de antraquinonas en el extracto de almendrón y no se detectó en el de caruto; se evidenció presencia de abundantes saponinas y polifenoles en almendrón, pero no se detectaron en el caruto; no se detectó presencia de triterpenos, pero sí de esteroides en ambos extractos. En la tabla 3 se consignan los resultados de acuerdo a la presencia escasa, moderada o abundante, con signos +

según su abundancia.

Tabla 3. Familias de metabolitos secundarios detectados en las pruebas químicas realizadas a los extractos metanólicos de *Terminalia catappa* L (Almendrón) y *Genipa americana* L (caruto).

Metabolito	Almendrón	Caruto
Alcaloides:		
*Dragendorff	-	-
*Meyer	-	-
*Wagner	-	-
Flavonoides:		
*Virutas de magnesio	-	-
*Luz ultravioleta	++	+
Taninos	+	+
Antraquinonas	+	-
Glicósidos cianogénicos	-	-
Polifenoles	+++	+
Lípidos	+	+
Saponinas	+++	+
Esteroles y triterpenos	Solo Esteroles	Solo Esteroles
Cumarinas	-	-

+ Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante. +++ Presencia abundante, - No detectada

*Prueba química

Las hojas de *Terminalia catappa* L contienen varios flavonoides, como el kaempferol o quercetina, varios taninos como punicalina, punicalagina o tercatina, saponinas y esteroles, principios activos que se usan en varias medicinas tradicionales con distintos propósitos, para tratar las enfermedades del hígado, enfermedades renales, contra la disentería y la diarrea y se ha afirmado que también contienen agentes para prevenir el cáncer (Masuda *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2000).

De acuerdo a lo anterior, se puede inferir que la presencia de estos metabolitos secundarios en las plantas estudiadas, las familias de compuestos comunes en ambos extractos fueron flavonoides, taninos, polifenoles, esteroles y saponinas; de éstos, los más abundantes fueron polifenoles y saponinas en el extracto de almendrón y una presencia escasa en el caruto.

Bioensayos

En las últimas décadas, se han diseñado algunos bioensayos de gran utilidad y eficacia que requieren pequeñas cantidades de muestra y permiten la evaluación rápida de extractos crudos, conduciendo con seguridad a los principios activos y descartando todo lo que no sea de interés. Hay que indicar claramente la diferencia entre un estudio de productos naturales convencional, cuyo objetivo es el conocimiento de los componentes químicos de una planta, y la búsqueda de nuevos productos bioactivos que dependen siempre de los ensayos biológicos, que requieran del fraccionamiento biodirigido y el aislamiento final de los componentes activos. En muchas ocasiones, el factor clave que ha impedido el descubrimiento rápido de nuevos constituyentes bioactivos, ha sido el uso insuficiente de extractos e inadecuada tecnología de bioensayo (Fatope *et al.*, 1993; McLaughlin *et al.*, 1998).

Inducción de hipercolesterolemia

La utilización de ratones albinos para la realización de cualquier tipo de investigación que proporcione datos para consecuentes aportes científicos, siempre son de vital importancia biológica; para ello, es importante tomar en consideración que la población estudiada sea lo más pequeña posible ya que al término del experimento es casi siempre inminente el sacrificio de los roedores y por razones éticas, económicas y por la poca disponibilidad de las sustancias en prueba se utiliza el menor número de animales.

La permeabilización del alimento para roedores con grasa de aceite de pollo, se realizó por un periodo de tiempo de 2 horas, posterior a esto se separó en un envase para que el remanente de aceite no absorbido se escurriera; provocando una absorción de 20 % de grasa por el alimento, asegurando así una dieta rica en grasa. Una vez estandarizado el proceso de absorción de esta grasa por los *pellet*, y posterior alimentación de los diferentes grupos de animales durante 30 días continuos, se pudo

observar un aumento en masa apreciable en los ratones en comparación con los ratones alimentados con dieta normal, es decir alimento comercial estándar, sin suplemento graso. En la tabla 4 se muestra la masa promedio de cada grupo de animales. No obstante, se observó un pequeño incremento en masa en los ratones mantenidos con alimento convencional, lo cual puede deberse a que los animales aumentaron de tamaño y como consecuencia de ello sufrieron un pequeño aumento en masa.

Tabla 4. Masa promedio de los grupos de animales empleados en el experimento de determinación de efecto anti-hipercolesterolémico de extractos *Terminalia catappa* L (Almendrón) y *Genipa americana* L (caruto).

Grupo	Masa promedio		
	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Diferencia(g) (Mf-Mi)
I Control S/G*	23,75	25,35	1,60
II Control C/G*	23,93	28,67	4,74
III	24,85	29,99	5,14
IV	25,35	28,95	3,60
V	25,90	29,12	3,22
VI	23,97	28,56	4,59
VII	25,26	29,30	4,04

*S/G: Sin complemento graso, *C/G: Con complemento graso * g: Gramos

La dieta suplementada con grasa de pollo permitió un aumento en masa promedio de ~4 g, determinado mediante la diferencia entre la masa final menos la masa inicial de los animales. Este aumento en masa debe ser proporcional a un aumento del contenido lipídico, aun cuando no necesariamente un aumento de masa tenga relación con un ascenso de lípidos en la sangre, esta suposición fue confirmada mediante la cuantificación del contenido de colesterol en suero sanguíneo de los animales, una vez transcurrido el tratamiento con los extractos vegetales (Tabla 6).

Dosificación con los extractos

La dosificación diaria de los extractos vegetales, a las concentraciones de 125 y

250 mg extracto/kg ratón, y del fármaco comercial Crestor (8,3 mg rosuvastatina/kg ratón), a los grupos de ratones durante 30 días, completo el ciclo experimental de tratamiento. La toma de muestra de suero sanguíneo y posterior cuantificación del contenido de colesterol total y de lipoproteínas de alta densidad (HDL), mediante reacciones con kit comerciales permitieron determinar que la dieta suplementada con grasa induce aumento en los contenidos lipídicos en los animales, así como los tratamientos de los animales con los extractos y Crestor reducen los valores de colesterol y de HDL, si se compara con los valores de los animales alimentados con dieta suplementada con grasa, además de tener como referencia los valores considerados como normales para ratones albinos, presentados en la tabla 5 (León *et al.*, 2011).

Tabla 5. Rango del contenido del perfil lipídico normal en ratones albinos.

Parámetro	Valor (mg/dl*)
Colesterol Total	44,4 – 96,9
Triglicéridos	26,7 – 121,5
HDL*	15- 35
LDL*	<60 Valor Deseable

*mg/dl: miligramos/ decilitro. *HDL: High density lipoprotein. * LDL: Low density lipoprotein.

Contenido de colesterol total en suero de ratones albinos

El contenido de colesterol en los ratones tratados con extractos de *G. americana* y *T. catappa* L, así como en los ratones control y en los hiperlipidémicos, determinado mediante reacción con el reactivo Helfa, es reportado en la tabla 6. Como puede observarse, los animales control, alimentados con dieta estándar, presentaron un contenido de colesterol promedio en suero de $82,8 \pm 6,7$ mg/dl, mientras que los ratones hiperlipidémicos, alimentados con dieta rica en grasa (dieta estándar + 20 % de grasa de pollo), presentaron un contenido de colesterol de $114,9 \pm 8,6$ mg/dl, valor este que sale del rango normal del perfil lipídico para ratones albinos. Estos resultados revelan un aumento en el contenido de colesterol en sangre de los

animales hiperlipidémicos de 32,1 mg/dl, en comparación con los niveles de este componente en sangre de los ratones control, en la tabla 6 se pueden detallar estos resultados. El tratamiento de los animales con dosis de los extractos metanólicos de la corteza de *G. americana* L o de hojas de *T. catappa* L evidenciaron similaridad en el contenido de colesterol. Los análisis del suero sanguíneo de los animales tratados con dosis de 125 y 250 mg extracto/kg ratón x día de de hojas de *T. catappa* L y corteza de *G. americana* L dieron valores promedios de colesterol de $85,7 \pm 3,1$ y $72,2 \pm 0,8$ mg/dl para *T. catappa* L y de $89,0 \pm 8,3$ y $72,6 \pm 14,4$ mg/dl para *G. americana* L, respectivamente. Como puede observarse, el contenido de colesterol en ratones hiperlipidémicos tratados con la dosis de 125 mg extracto/kg ratón x día es un poco superior al que presentaron los ratones control, alimentados con dieta sin complemento graso, $82,8 \pm 6,7$ mg/dl. Sin embargo, cuando los animales son tratados con las dosis de 250 mg extracto/kg ratón por día, los niveles de colesterol ($72,2 \pm 0,8$ mg/dl para *T. catappa* L y $72,6 \pm 14,4$ mg/dl para *G. americana* L) caen por debajo del que presentaron los ratones control.

Contrariamente, los valores de colesterol en el suero sanguíneo de los ratones alimentados con dieta suplementada con grasa de pollo, pero sin tratamiento de extracto, revelaron valores promedio de $114,9 \pm 8,6$ mg/dl, lo cual demuestra una clara reducción de los niveles de colesterol por efecto de los extractos metanólicos de hojas de *T. catappa* L o de la corteza de *G. americana* L, efecto que es más notorio cuando los animales son sometidos a dosis más altas de los extractos. Esto sugiere que la reducción de los niveles de colesterol en ratones tratados con los extractos es inducida por un componente antilipidémico presente en éstos; además, los resultados corroboran lo que la población viene usando empíricamente durante mucho tiempo para reducir el contenido de colesterol o la hipertensión, demostrándose así que hay una relación directa entre colesterol e hipertensión y un efecto importante de los extractos sobre estos parámetros.

Tabla 6. Contenido de colesterol total en suero de ratones albinos, con hipercolesterolemia inducida por una dieta rica en grasa, tratados a diferentes dosis de extractos metanólicos de *Terminalia catappa* L (almendrón), *Genipa americana* L (caruto) respectivamente (125 y 250 mg Extracto/kg ratón/día) y fármaco comercial

Ratones	Control	Control	Almendrón		Caruto		Rosuvastatina
	s/g	c/g	125 mg	250 mg	250 mg	125 mg	8,3 mg*
1	75,9	120,9	84,4	72,0	96,2	59,3	110,0
2	89,9	102,7	89,4	71,2	80,0	74,3	83,0
3	78,3	121,1	83,7	72,8	91,6	88,1	98,8
4	87,2	114,9	85,3	73,1	88,5	68,7	87,3
Media	82,8	114,9	85,7	72,2	89,0	72,6	94,7
Desviación estándar	6,7	8,6	3,1	0,8	8,3	14,4	13,5

(Crestor = rosuvastatina 8,3 mg/kg/día).

*mg: miligramos. s/g: sin grasa. c/g: con grasa.

Con relación a los animales hiperlipidémicos tratados con el medicamento Crestor 8,3 mg/kg ratón x día, cuyo principio antilipidémico es la rosuvastatina, se obtuvo un valor promedio de colesterol de $94,7 \pm 13,5$ mg/dl, contenido de colesterol muy superior al que presentan los ratones hiperlipidémicos tratados con los extractos vegetales a las diferentes concentraciones. Esto sugiere que tal vez el principio activo en los extractos interactúa más efectivamente con el colesterol que la rosuvastatina. Es importante destacar que, estos ensayos permiten cuantificar el contenido de colesterol, no así la forma de interacción de los extractos con el colesterol para causar esa reducción de su contenido a diferentes dosis de extractos.

Contenido de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en suero de ratones albinos

El contenido de HDL en el suero de ratones albinos hipercolesterolémicos o no, fue determinado por reacción con el reactivo comercial Stamboi. Los animales hipercolesterolémicos tratados con dosis acuosas de los extractos metanólicos de hojas de *T. catappa* L (almendrón) y corteza de *G. americana* L (caruto) presentaron niveles de HDL mucho menor, en comparación con los valores obtenidos para los

ratones hipercolesterolémicos tratados en ausencia de extractos, resultados presentados en la tabla 7. Como puede observarse en la tabla, los ratones que fueron alimentados con dieta estándar sin suplemento graso, control normal, presentaron una concentración media de HDL 20,6 mg/dl, mientras que los ratones que tuvieron ingesta de la dieta rica en grasa presentaron un aumento significativo en el valor de las HDL, 28,7 mg/dl. Esto evidencia que la dieta con suplemento graso induce aumento del contenido de HDL en los animales, en comparación con los niveles cuantificados para ratones estándar, lo cual sugiere que la composición de la dieta influye en la variación de los niveles séricos de HDL.

Los resultados demuestran que, la administración de dosis de 125 y 250 mg extracto/kg ratón por día de hojas de *T. catappa* L y de corteza de *G. americana* L inducen reducción en los niveles de HDL en comparación con los valores obtenidos para los animales tratados con dieta suplementada con grasa de pollo. Los valores promedio de HDL para los ratones tratados con el extracto de *T. catappa* L fueron $21,7 \pm 0,7$ y $18,1 \pm 0,2$ mg/dl a las concentraciones de 125 y 250 mg extracto/kg ratón, respectivamente, mientras que en el caso de los animales tratados con el extracto de la corteza de *G. americana* L fueron de $22,0 \pm 2,1$ y $18,8 \pm 3,6$ mg/dl. Estos valores de HDL son similares a los resultados de contenido de colesterol, en cuanto a que a la concentración más baja del extracto se obtienen niveles de HDL y de colesterol un poco por encima de los valores obtenidos para los ratones control ($20,6 \pm 1,7$ mg/dl), mientras que a la mayor concentración de extracto se obtienen niveles de HDL y colesterol inferiores. En la tabla 8 se encuentra promediado las concentraciones de colesterol total y HDL por cada grupo estudiado.

Si se comparan los resultados de HDL de los animales alimentados con suplemento graso con los obtenidos para los ratones tratados con los diferentes extractos, se observa que hay una reducción del contenido de las HDL por inducción de los extractos; el valor promedio de HDL para los ratones hiperlipidémicos fue de

28,7 ± 2,1 mg/dl, mientras que para los animales tratados con los extractos los valores promedio de HDL fueron aproximadamente 20 mg/dl.

Tabla 7. Efecto de extractos metanólicos de *Terminalia Catappa* L (almendrón), *Genipa americana* L (Caruto) y fármaco comercial Crestor sobre la concentración de HDL en suero de ratones albinos hipercolestéroleemicos.

Ratones	Control s/g*	Control c/g*	Almendrón		Caruto		Rosuvastatina
			125 mg	250 mg	125 mg	250 mg	8,3 mg*
1	18,9	30,2	21,1	18,0	24,1	14,8	27,5
2	22,4	25,6	22,3	17,8	20,0	18,5	20,7
3	19,5	30,3	20,9	18,2	22,9	22,0	24,7
4	21,8	28,7	22,5	18,5	23,3	20,1	25,2
Media	20,6	28,7	21,7	18,1	22,0	18,8	24,5
Desviación estándar	1,7	2,1	0,7	0,2	2,1	3,6	3,4

*s/g: Sin grasa. c/g: Con grasa. *mg: miligramos

Dado que las lipoproteínas de alta densidad se encargan de transportar el colesterol desde los tejidos del cuerpo (arterias) hasta el hígado para su excreción, una reducción de los niveles de éstas, traería como consecuencia el aumento de los niveles de colesterol en el organismo. Los altos niveles de HDL en suero de los ratones hiperlipidémicos pueden deberse a una mayor producción de esta clase de sustancias por el organismo de los ratones, como una medida de contrarrestar los altos valores de contenido de colesterol producto de la ingesta de la dieta rica en grasa, cosa que no ocurre en los animales alimentados con dieta sin suplemento graso, porque el organismo no lo requiere debido a que los niveles de colesterol no son tan elevados; es decir, que a mayor presencia de colesterol mayor será la biosíntesis de las HDL para eliminar más eficientemente el exceso de colesterol en el organismo y reducir de esta forma posibilidades de enfermedades cardiovasculares, lo cual está en correlación con estudios realizados por Nagarajan (2005).

Tabla 8. Resumen del colesterol total y HDL-colesterol en ratones albinos tratados con extractos metanólicos de *G. americana* L y *T. catappa* L.

Grupos	Colesterol	HDL*
I Control Normal	82,9	20,7
II Control Hipercolesterolemico	114,9	28,7
III Tratado con almendrón 125 mg*	85,7	21,7
IV Tratado con almendrón 250 mg	72,2	18,1
V Tratado con caruto 125 mg	89,0	22,6
VI Tratado con caruto 250 mg	72,6	18,8
VII Tratados con Rosuvastatina	94,7	24,5

HDL: High density lipoprotein mg: miligramos.

El efecto antilipidémico determinado al extracto metanólico de hojas de *T. catappa* L, sobre ratones albinos hiperlipidémicos, sugiere que éste no depende de la región en la cual se recolecte la especie vegetal, debido a que se ha encontrado que extractos de ésta utilizados en otras investigaciones han generado resultados similares (Ahmed *et al.*, 2005; Bejarano *et al.*, 2006), además del uso empírico que se le da en diferentes regiones del mundo (Hurrell *et al.*, 2016).

Similarmente, el efecto antilipidémico ejercido por el extracto metanólico de la corteza de *G. americana* L confirma el uso etnobotánico que se le atribuye a esta otra especie vegetal. Esto, tal vez, está en correlación con la presencia de genipina, principio activo característico en *G. americana* L, al cual se le han determinado múltiples efectos, entre ellos antidiabético (Shen *et al.*, 2016). Esto es tomando en consideración que la diabetes resulta en un desorden metabólico de carbohidratos, lípidos y proteínas en el organismo, además de que hay relación entre esta enfermedad y las lipidemias.

Otros estudios demuestran la eficacia de extractos de especies vegetales en la reducción de los niveles del perfil lipídico. Parab y Mengi (2002) evaluaron el efecto hipolipidémico de *Acorus calamus* y saponinas, demostrando así una significativa actividad hipolipidémica, sobre todo de las saponinas (10 mg/kg) y el extracto

acuoso, a una dosis de 200 mg/kg. Similarmente, Daher (2006) cuantificó el efecto del extracto acuoso de las partes aéreas de *Urtica dioica* sobre el perfil lipídico en ratas, encontrando una reducción significativa del colesterol total, colesterol LDL y la relación colesterol LDL/HDL, a una dosis de 150 mg/kg/día.

De igual manera, Nagarajan (2005) demostró que una misma especie vegetal puede ejercer efecto antilipidémico y antidiabético, lo cual evidencia acción biológica que permite aliviar estos males. Los resultados muestran que extractos de *Cleomeo felina*, a la concentración de 300 mg/kg/día, reducen significativamente los niveles de colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL y VLDL en ratones, evidenciando disminución significativa, por ejemplo, en los niveles de colesterol total de 366,2 a 186,2 mg/dl, de ratones diabéticos control y diabéticos, tratados con extracto en hexano, respectivamente. Estos estudios demuestran que ciertas especies vegetales son posibles fuentes promisorias de agentes hipolipidémicos, que requieren de más estudios para aislar el principio activo.

En cuanto a la variación de los valores de HDL en los ratones control, comparado con el de los ratones hiperlipidémicos, de $20,7 \pm 1,7$ a $28,7 \pm 2,1$ mg/dl, respectivamente, puede verse como una respuesta del organismo a generar mayor cantidad de las lipoproteínas encargadas de transportar el colesterol hacia los tejidos para la síntesis de esteroides y así reducir el contenido de colesterol en sangre y posibles efectos cardiovasculares. Respuesta ésta que estaría relacionada con los aumentos del contenido de colesterol total, de $82,8 \pm 6,7$ mg/dl en ratones control a $114,9 \pm 8,6$ mg/dl en ratones hiperlipidémicos, y como consecuencia de esto, un aumento también por parte del organismo en los niveles de las HDL, debido a que una baja concentración de HDL puede acelerar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en los ratones. Otra posibilidad sería que los extractos vegetales favorecieran la producción de las HDL en los ratones, lo que haría que estas plantas actuaran como fuente de un prometedor agente cardioprotector en el tratamiento de

enfermedades coronarias.

En relación con la actividad antilipídica-extracto, podría decirse que ésta puede ser atribuida a alguna de las familias de compuestos presentes en los extractos, fundamentalmente a aquellas que son comunes, debido a que ambos extractos ejercieron efectos biológicos similares. Las familias de compuestos presentes en ambos extractos fueron taninos, polifenoles, flavonoides y saponinas, la mayoría de estos son de naturaleza fenólica. No obstante, estudios muestran efectos antilipídico de fracciones enriquecidas en saponinas; de acuerdo con esto se podría sugerir que, la presencia de esta familia de compuestos sería la responsable de la actividad biológica observada (Daher, 2006).

Los resultados obtenidos en este estudio corroboran el beneficioso efecto de ingerir infusiones de *T. catappa* L o *G. americana* L como tratamiento para reducir altos niveles de colesterol y la hipertensión arterial, además de confirmar el conocimiento empírico sobre estas especies vegetales.

Análisis de resonancia magnética nuclear

Los análisis de RMN ^1H (300 MHz, DMSO) del sólido purificado a partir del extracto metanólico de *G. americana* generó un espectro que presenta señales en la región entre 3,3 y 4,5 ppm, las cuales son características de compuestos de naturaleza glicosídica, de acuerdo a sus desplazamientos químicos (figura 15). En la ampliación de esta región del espectro, se observan, en la parte de campo bajo, tres señales con desplazamientos químico de 4,41 (d, $j = 5,2836$ Hz), 4,35 (t, $j = 5,6738$ y $5,4936$ Hz) y 4,1435 (d, $j = 6,9646$ Hz), además en la región entre 3,3 y 3,6 ppm se observan multipletes que se solapan entre sí (figura 15).

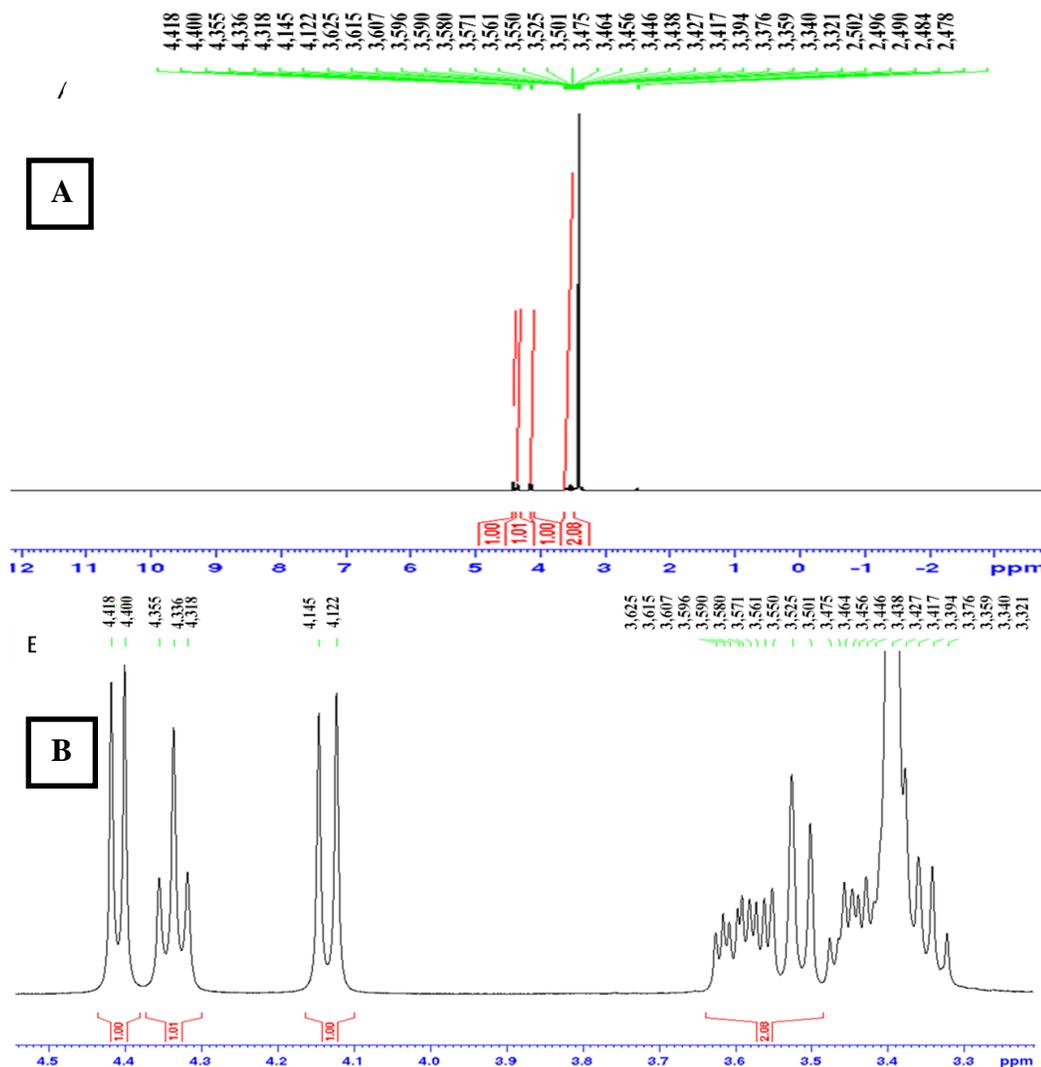


Figura 15. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones, RMN ^1H , (DMSO d_6 , 300 MHz). A) Del sólido purificado a partir del extracto metanólico de *Genipa americana* L, B) ampliación de la región entre 3,2 – 4,5 ppm (ppm: partes por millón).

Los análisis de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO) del sólido purificado a partir del extracto metanólico de *G. americana* L generó un espectro que presenta solo tres señales en la región entre 63 - 72 ppm, reafirmando lo deducido del análisis de protones. Esto sugiere que dichos átomos de carbono, que además de ser saturados, están unidos a átomos muy electronegativos como oxígeno o nitrógeno, señales

características de compuestos de naturaleza glicosídica de acuerdo a sus desplazamientos químicos (figura 16). En la ampliación de la región del espectro donde aparecen las tres señales, se observa que los desplazamientos químicos son 63,88, 69,77 y 71,39 ppm (figura 16 B).

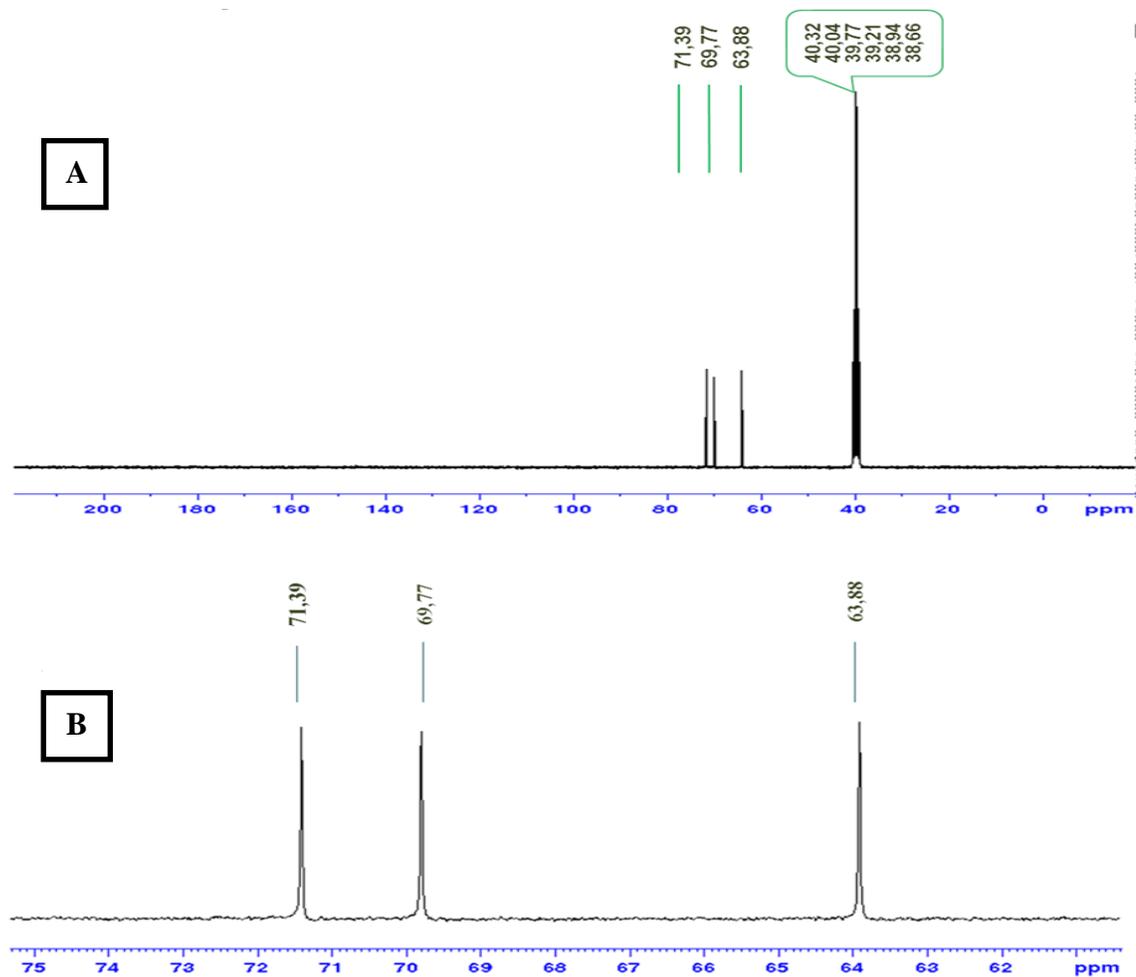


Figura 16. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece, RMN ^{13}C , (DMSO d_6 , 75 MHz). A) Del sólido purificado a partir del extracto metanólico de la corteza de *Genipa americana* L, B) ampliación de la región entre 63 – 72 ppm (ppm: partes por millón).

Los análisis de RMN ^{13}C por transferencia de polarización DEPT 135 (75 MHz, DMSO) del sólido purificado a partir del extracto metanólico de la corteza de *G. americana* L generó un espectro que presenta dos señales en sentido positivo y una

en sentido negativo. Esto sugiere que existen dos grupos, posiblemente, tipo CH unidos a elementos muy electronegativos, como oxígeno (69,76 y 71,35 ppm), por su desplazamiento químico, y un grupo CH₂ (63,86 ppm), también unido a un elemento electronegativo; estas deducciones son determinadas por las orientaciones de las señales en el espectro (figura 17). Estos resultados están en correlación con los de un compuesto como el manitol, el cual tiene dos grupos CH enlazados a oxígeno y un grupo CH₂, también enlazado a oxígeno, por lo que los núcleos de los carbonos están desapantallados y generan señales en el espectro de RMN entre 60 y 75 ppm.

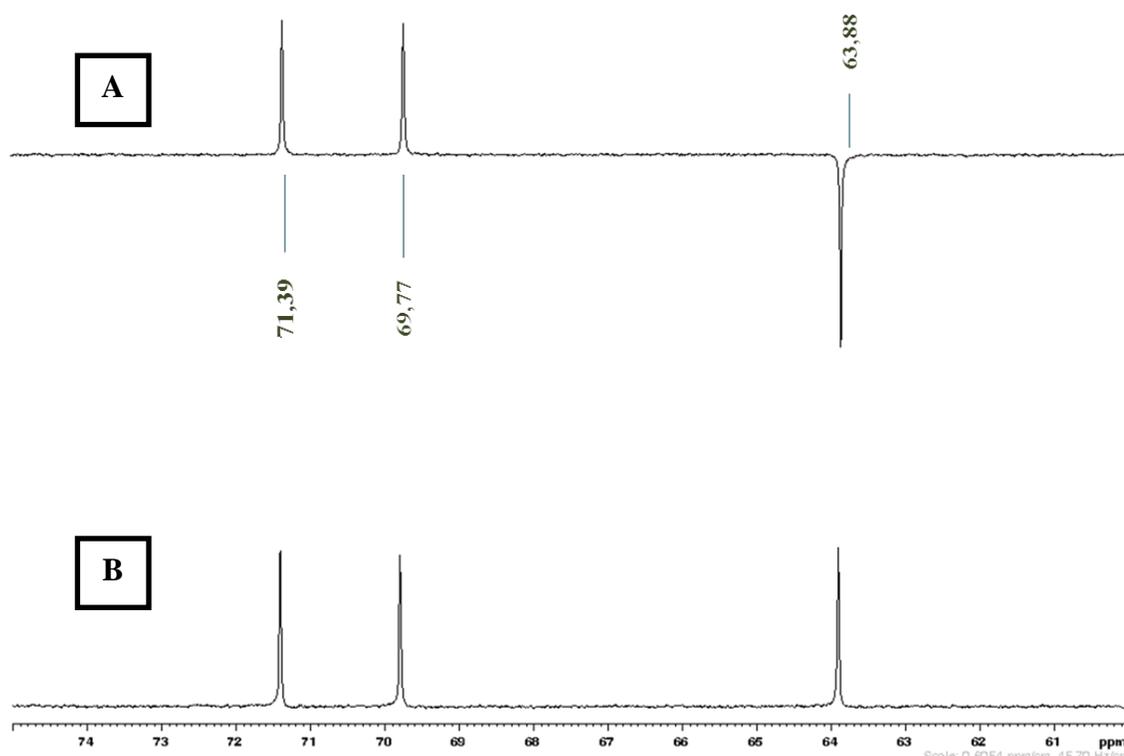


Figura 17. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece mediante transferencia de polarización, RMN ¹³C DEPT 135, (DMSO d₆, 75 MHz). A) Del sólido purificado a partir del extracto metanólico de la corteza de *Genipa americana* L, B) Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece, RMN ¹³C, normal (ppm: partes por millón).

Los espectros de RMN de carbono trece dan indicios de que el sólido purificado a partir del extracto metanólico de la corteza de *G. americana* es un compuesto glicosídico, semejante al manitol. Haciendo un análisis comparativo de los espectros

de RMN ^{13}C de la muestra analizada con el del manitol, se observa que hay similitud en los desplazamientos químicos y el número de señales (figura 19), por lo que a priori se asumiría que fuesen una misma sustancia. No obstante, hay diferencias en los puntos de fusión, el sólido purificado presenta punto de fusión de $149 - 152^\circ\text{C}$, mientras que el punto de fusión reportado para el manitol es de $165 - 169^\circ\text{C}$, esto hace suponer que son compuestos diferentes, con similitud estructural, para que exista semejanza espectroscópica. En la tabla 9 se presentan los desplazamientos químicos de RMN ^{13}C del sólido purificado y los del manitol, además en la figura 18 se muestra la estructura química del manitol.

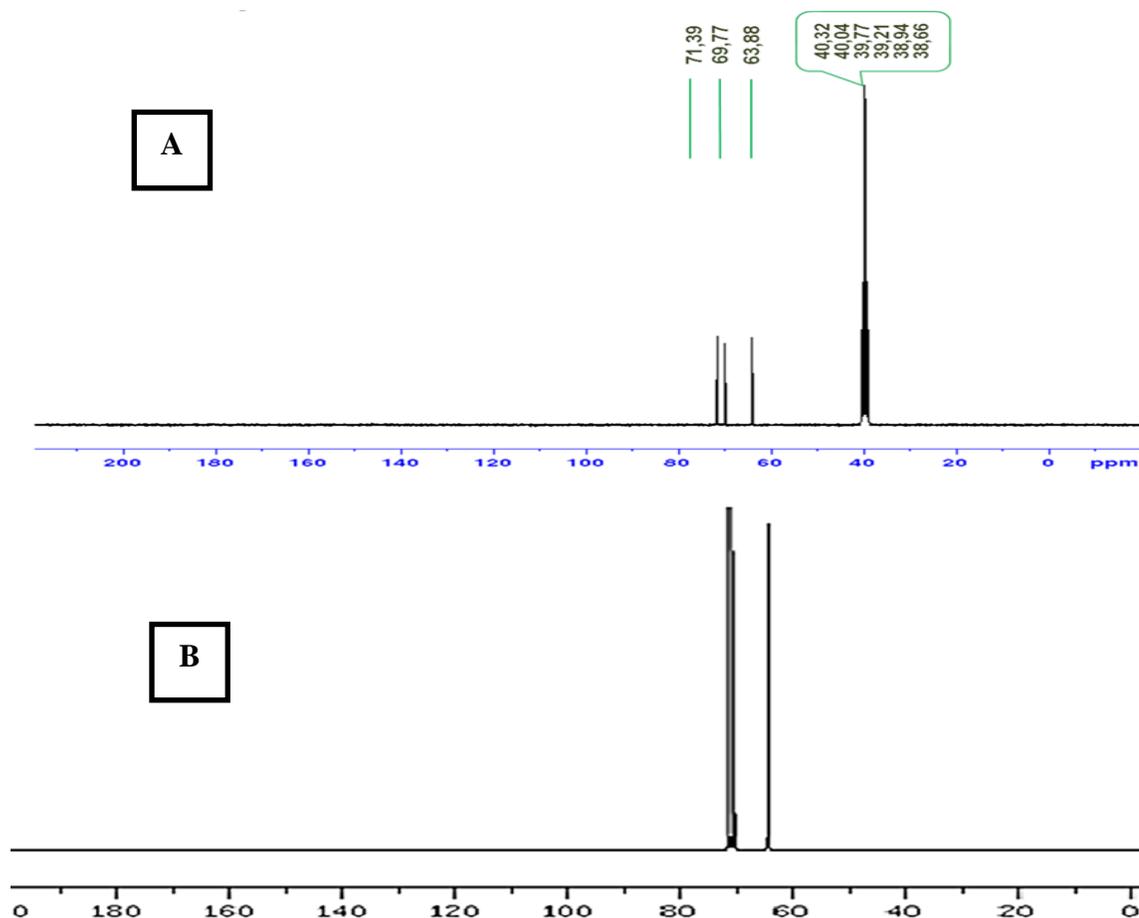


Figura 18. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece, RMN ^{13}C . A) Del sólido purificado a partir del extracto metanólico de *Genipa americana* L., (DMSO d_6 , 75 MHz), B) del manitol (ppm: partes por millón).

Tabla 9. Desplazamientos químicos de RMN C del sólido purificado y valores reportados para el manitol.

Carbono	Sólido purificado (δ_C ppm)	Manitol (δ_C ppm)
C1/C6	63,86	65,919
C2/C5	69,76	71,926
C3/C4	71,35	73,493

δ_C ppm: desplazamiento químico en partes por millón

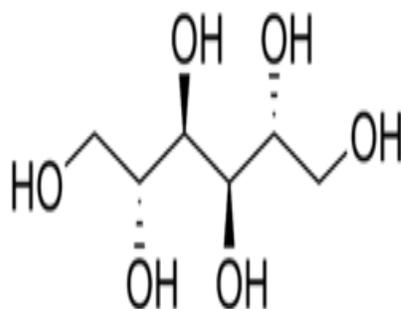


Figura 19. Estructura química del manitol.

Análisis de espectrometría de masas mediante ionización por electronebulización

El análisis mediante EM-IEN del sólido purificado a partir del extracto metanólico de la corteza de *G. americana* L generó un espectro que presenta picos de iones moleculares mayoritarios con relación m/z de 200,30 y 387,37 uma, además de señales de menor intensidad con relación m/z de 205,28 y 382,24 uma (figura 20). Estas señales de iones moleculares se relacionan entre sí mediante la generación de iones fragmentos en el análisis de EM/EM o EM en tándem de las señales 387,37 y 382,24 uma (figura 21). Se puede apreciar que el ion molecular 387,37 genera el ion fragmento 205 y que el ion de relación m/z de 382,24 produce los iones fragmentos de 200,12, en ambos casos hay una diferencia de 182 uma. Esta diferencia

en masa de 182 una concuerda con un compuesto de fórmula $C_6H_{14}O_6$, que coincide con la de un glicósido no cíclico como el manitol, esto hace sugerir que debe existir alguna relación de un compuesto de naturaleza glicosídica en esta muestra, coincidiendo así con los análisis de RMN. Esta suposición se ve reforzada con el pico del ion molecular con relación m/z de 183,24 una que se observa en el espectro de masas, que concuerda con la masa de $182 + 1$, es decir el compuesto de fórmula $C_6H_{14}O_6 + H$. Estas relaciones de diferencia en masa y la existencia de los iones moleculares con relaciones m/z de 183,24. 200,30 y 205,28 hace sugerir que, biosintéticamente, ocurre una reacción entre el compuesto con relación m/z de 183 con los iones de relación m/z de 200 y 205 una para producir los compuestos con relación m/z de 382,24 y 387,37 una, respectivamente (Wakai *et al.*, 2007).

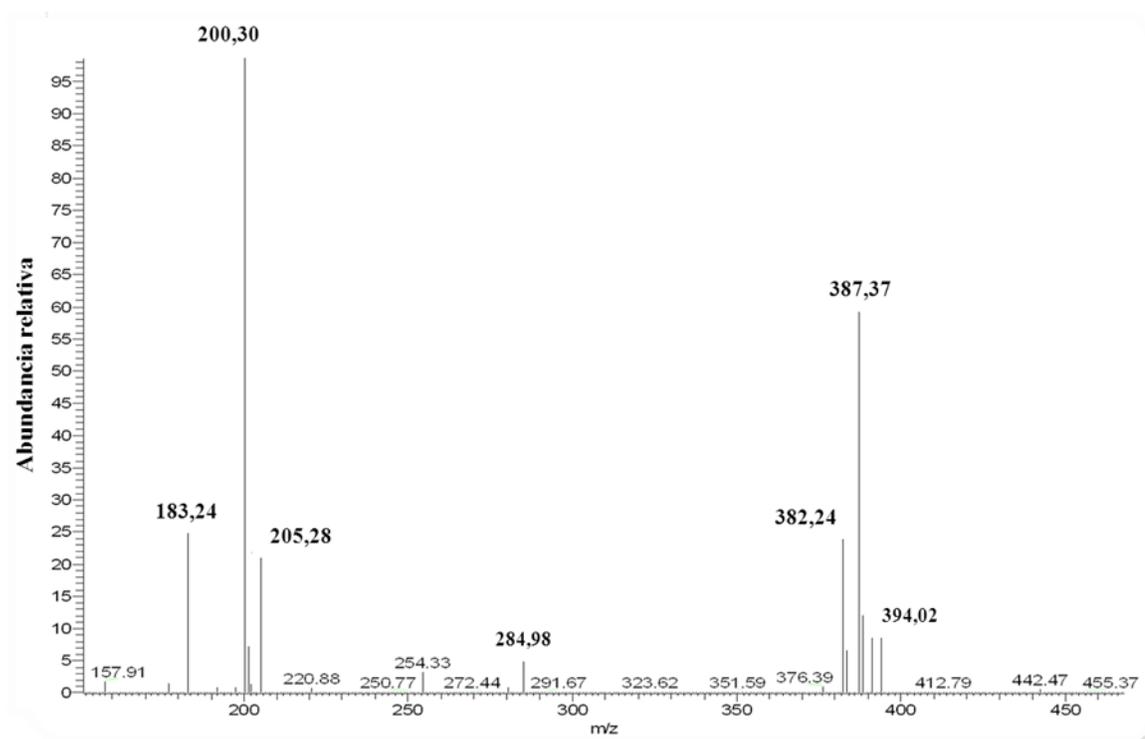


Figura 20. Espectro de masas mediante ionización por electronebulización, EM-IEN, del sólido purificado a partir del extracto metanólico de la corteza de *Genipa americana* L.

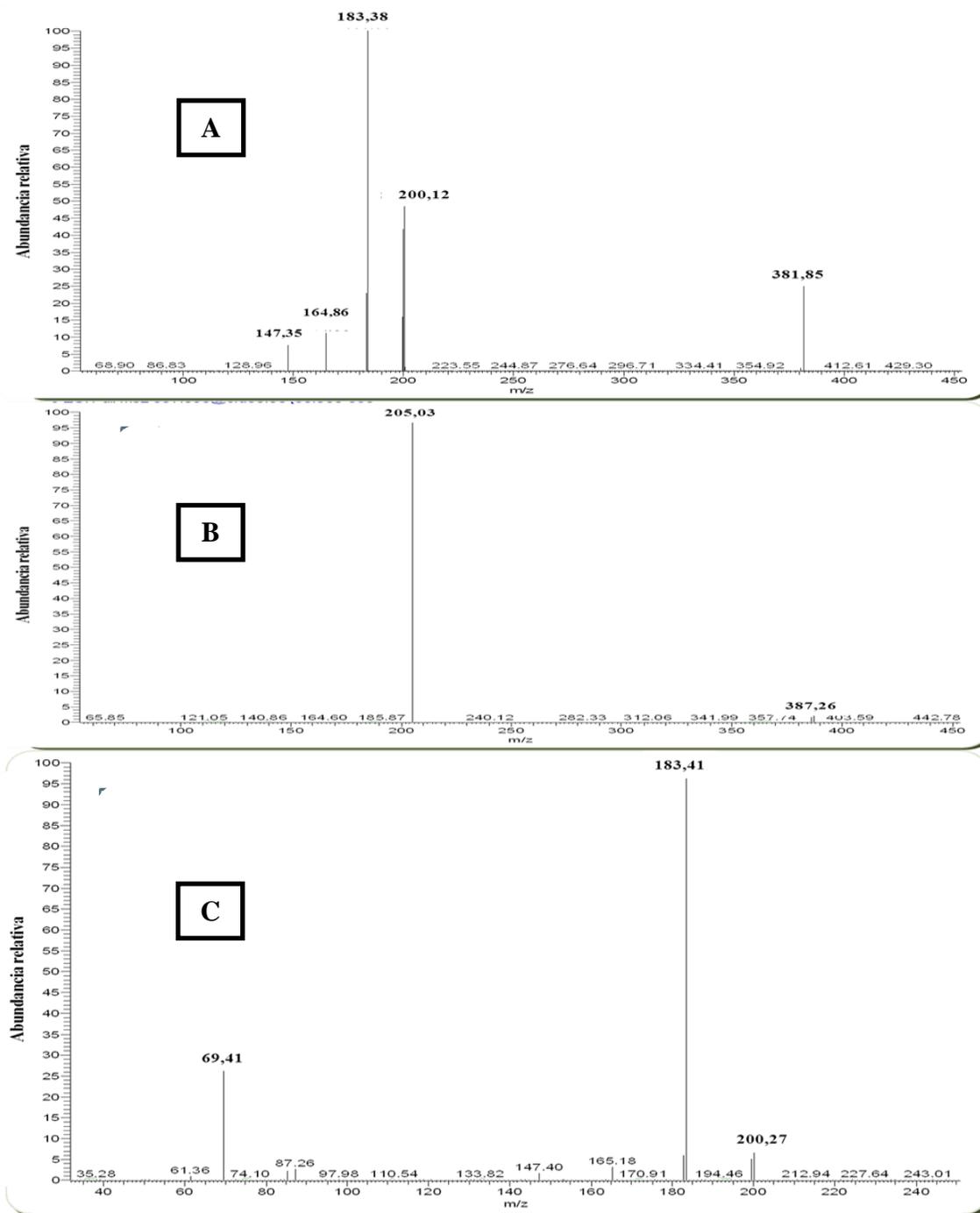


Figura 21. Espectro de masas en Tándem mediante ionización por electronebulización, EM-ESI, de iones moleculares del sólido purificado a partir del extracto metanólico de *Genipa americana* L. A) Espectro de EM/EM del ion con relación m/z 382, B) Espectro de EM/EM del ion con relación m/z 387 y C) Espectro de EM/EM del ion con relación m/z 200.

A pesar de que el análisis de RMN conlleva a una estructura química semejante al manitol ($C_6H_{14}O_6$) y el espectro de masas, EM-IEN, presenta una señal de un ion molecular de relación m/z de 183 uma que concuerda con una fórmula $C_6H_{14}O_6 + H$, no obstante, el espectro de masas presenta iones moleculares mayoritarios con relación m/z de 382 y 387 uma, que se fragmentan y pierden 182 uma, de alguna manera estos iones tienen relación con un resto de fórmula $C_6H_{14}O_6$, que concuerda con la del manitol o un isómero de éste, lo que sugiere también alguna relación con un alditol semejante al manitol.

Por todo lo anteriormente expuesto, puede considerarse a ambas especies, como potenciales fuentes de compuestos con propiedades anticolesterolémicas, lo cual constituye un excelente punto de partida en la búsqueda de novedosas alternativas terapéuticas para el tratamiento de estos parámetros sanguíneos.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de familias de metabolitos secundarios, como flavonoides, taninos, polifenoles, esteroides y saponinas, en los extractos metanólicos de los órganos en estudio de las especies vegetales *T. catappa* L y *G. americana* L.

Los extractos metanólicos de hojas de *T. catappa* L y corteza de *G. americana* L ejercieron marcado efecto antilipidémico en ratones albinos previamente alimentados con dieta rica en grasas.

La cuantificación del efecto antilipidémico ejercido por los extractos sobre los ratones es superior al de la rosuvastatina, medicamento de uso clínico para reducir los niveles de colesterol en humanos.

El efecto antilipidémico cuantificado al extracto metanólico de hojas de *T. catappa* L, sobre ratones albinos hiperlipidémicos, sugiere que éste no depende de la región en la cual se recolecte la especie vegetal, debido a que se ha encontrado que extractos de esta especie vegetal en otras investigaciones generaron resultados similares.

Las familias de compuestos comunes en ambos extractos, taninos, polifenoles, flavonoides y saponinas, posiblemente sean las responsables del efecto antilipidémico.

Se demostró que el conocimiento etnobotánico sobre estas especies vegetales, en cuanto a control de los niveles de colesterol y tensión arterial, está bien fundamentado, además de que *T. catappa* L y *G. americana* L son plantas promisorias para continuar el proceso de evaluación de posibles agentes antilipémicos.

Los análisis espectroscópicos de RMN y de EM-IEN realizados al precipitado de la corteza *G. americana* L sugieren que se trata de un compuesto glicosídico

semejante al manitol, no obstante existen diferencias en los puntos de fusión entre el de la muestra y el reportado para el manitol.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, R. 2001. Identification of essential oils by gas/ quadrupole mass spectroscopy. *Allured*. 45: 65-69.

Ahmed, S.; Swamy, V.; Dhanapal, P. y Chandrashekara, V. 2005. Anti- diabetic activity of *Terminalia catappa* linn. Leaf extracts in alloxan-induced diabetic rats. *Iranian Journal Pharmacol y therapeutics* 41: 36-39.

Añez, N.; Crisante, G y Parada, H. 2007. Nuevos casos de enfermedades cardiovasculares en Latinoamérica. *Salus*, 11: 87-90.

Asolkar, K. y Kakkar, O. 1992. Supplement to glossary of indian medicinal plants with active principals. *Natural Products From Plants*, 18: 450- 454.

Avedaño, M. 2010. “Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos”. <http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/viewFile/1150/1196> (20/01/2015)

Bejarano, E.; Navarro, J.; Paladines, M.; Palacios, M. y Gutiérrez, O. 2006. Efecto hipolipemiente del extracto de *Terminalia catappa* en un modelo animal. *Biomédica*, 19:19-25.

Buckner, F.; Stone, N. y Lichtenstein, A. 1998. Characterization of triacylglycerols and cholesterol of *Moringa oleifera* seed oil: “Oleic-Vaccenic Acid”. *Chemical*, 47: 3688-3692.

Camacho, J. 2005. *Manual engorda de ovinos en sistema semiestabulado*. Salvat. México.

Carratala, M. 2007. “Hipercolesterolemia” <http://www.medigraphic.com/pdfs/pt2007> (25/01/2016).

Castleman, M. 1991. *Las Hierbas que Curan*. Rodale Press, Emmaus, Pennsylvania, USA.

Chen, J.; Li, T. y Lin, C. 2000. Folk medicine *Terminalia cattapa* and its major tannins component, punicalagin, are effective against bleomyciniduced genotoxicity in chinese hamster ovary cells. *Cancer research mar*. 152:115-22.

Craig, W. 1999. Heath- promoting properties of common herbs. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70 (3): 491-499.

Daher, C. 2006. Effect of *Urtica dioica* extract intake upon blood lipid profile in the rats. *Fitoterapia*, 77: 183-188.

De La Cruz B. 2005. Caracterización de Cinco Extractos De Plantas Medicinales Nativas de Guatemala, validas Científicamente. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de San Carlos, Guatemala.

Durrington, P. 2003. Dyslipidoemia. *Lancet*, 362(9385): 717-731.

Fatope, M.; Ibrahim, H. y Takeda, Y. 1993. Screening of higher plants reputed as pepticides using brine shrimp lethality assay. *International Journal of Pharmacognosy*, 4:250-254.

Fenn, J.; Mann, M.; Meng, C.; Wong, S. y Whitehouse, C.. 1990. Electrospray ionization principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews* 9 (1): 37-70.

Fernández, R. 2001. *Historia natural y general de las Indias*. Octava edición. Ediciones Omega S.A. Sevilla, España.

Goun, E.; Cunningham, G.; Chu, D.; Nguyen, C. y Miles, D. 2003. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedicalplants. *Fitoterapia*, 74: 592-596.

Harvey, A. 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13: 894- 901.

Hendry, G. y Houghton, J. 1996. *Natural Food Colorants*. Segunda Edición. Chapman & Hall. London.

Hernández, M.; García, L.; Rojo, D. y Olivares, D. 2003. Almendrón de la India: potencial biológico valioso. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 22: 41-47.

Herrera, E. y Barbas C. 2001. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal Physiology Biochemistry*, 1: 43-56.

Hollander, M. y Wolfe, D. 1973. Nonparametric statistical procedures. Editorial John Wiley and Sans. New York. 503 pp.

Hurrel, J.; Puentes, J. y Arenas, P. 2016. Estudios etnobotánicos en la conurbación Buenos Aires- La Plata, Argentina: productos de plantas medicinales introducidos por inmigrantes paraguayos. *Bonplan*, 1: 43-52

Jing, G.; Huan, D.; Xin-Hui, T.; Li-Zhi, X.; Yi- Mei, F. y Xiao- Ning, Z. 2004.

Inhibitory effects of TCCE on CC14- induced overexpression of IL-6 in acute liver Injury. *ACTA 3611*: 767- 772.

Kaul, N.; Devaraj, S. y Jialal, I. 2001. Tocopherol and atherosclerosis. *Experiment Biology Medical*, 226 (2): 5-12.

Kinoshita S.; Inoue, Y.; Nakama S.; Ichiba T. y Aniya Y. 2007. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin, *Phytomedicine*, 14: 755-762.

Kloucek, P.; Polesny, Z.; Svobodova, B.; Vlkova, E. y Kokoska, L. 2005. Antibacterial Screening of some Peruvian medicinal plants used in calleria district. *Journal Ethnopharmacol*, 993: 309-312.

Lárez C.; Rivas A. y Santos, I. 2014. Obtención de Genipina a partir de frutos de caruto (*Genipa americana* L.) del llano venezolano. *Avances en Química. Saber*, 9(2): 75-86.

León, A.; Blanco, D.; Peña, A.; Ronda, M.; Gonzales, B.; Arteaga, M.; Bada, A.; Gonzales, Y. y Mancebo, A. 2011. Hematological and biochemical parameters in sprange dawiey laboratory rats breedin cenpalab. *Redvet*, 10: 5-7.

Lietava, J. 1992. Medicinal plants in a middle palaeolithic grave Shanidar IV. *Journal Ethnopharmacol*, 35: 263-266.

Lin, C.; Chen, Y.; Lin, J. y Ujiie, T. 1997. Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective activity of *Terminalia catappa* L. *Journal China Medical*, 252: 61-153.

Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica Organica*. Caracas (Venezuela): CDCHT. UCV. 451 p

Masuda, T.; Yonemori, Y.; Oyama, Y.; Takeda, T. y Tanaka, T. 1999. Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal Agric Food Chem*, 47: 1749-54.

Mclaughlin, J.; Lingling, L. y Anderson, J. 1998. The use of biological assays to evaluate botonicals. *Drug information Journal*, 32: 513-524.

Morales, T.; Cubero, J.; Lanz, Z.; Gómez, Y. y Segnini, M. 2000. Actividad antimicrobiana de extractos orgánicos aislados de *Genipa americana* L. *Revista de Biología Tropical*, 48 (1): 199- 206.

- Muhammad, A. y Mudi, S. 2011. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activities of *Terminalia catappa*, Leaf Extracts. *Biokemistri Volume 23*, No. 1.
- Nagarajan, N. 2005. Antidiabetic and antihyperlipemic effects of *Cleomea felina*. *Fitoterapia*, 76: 310-315.
- Paarakh, P. 2010. *Terminalia Arjuna* (Roxb.) *International Journal of Pharmacology*, 5: 515-534.
- Parab, R. y Mengi, S. 2002. Hypolipidemic activity of *Acorus calamus* L in rats. *Fitoterapia*, 70: 451-455.
- Pencina, M.; Navar-Boggan, A.; D'Agostino, R.; Neely, B.; Sniderman, A. y Peterson, E. 2014. Application of new cholesterol guidelines to a population- Based sample. *Engle Journal Medical*, 370: 1422-1431.
- Qureshi, A.; Qureshi, N.; Wright, J.; Shen, Z.; Kramer, G. y Gapor, A. 2002. Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (palmvitee). *Journal Clinical Nutritional*, 102 (57): 70-78.
- Ramos, A.; Renard, C., Montañez, J.; Reyes, M. y Contreras, J. 2014. A review through recovery, purification and identification of genipin. *Elsevier*, 111: 83-93.
- Rodríguez, A.; Santana, P.; Maggi, L. y Pizzorno, C. 1981. Enfermedades cardiovasculares causadas por obesidad. *Reverte*, 172: 206-212.
- Rojas, J.; De Chávez, M. y Fernández, R. 1984. Capacidad comparativa de digestión entre ovinos y caprinos. *Zootecnia Tropical*, 2: 20-29.
- Ron, D.; Oren, I.; Aviram, M.; Better, O. y Brook J. 1983. Accumulation of lipoprotein remnants in patient's with chronic renal failure. *Atherosclerosis*, 46: 67-75.
- Ruiz, J.; Roque, M.; Salazar, M.; Gamarra, E.; Arias, G.; Whu, D.; Acosta, E.; Irey, J.; Guadalupe, L.; Llahuilla, J.; Chávez, J.; Solis, D.; Basualdo, G. y Cruz, O. 2013. Actividad antiestafilocócica y antibiopelícula de los extractos de *Juglans neotroica*. *Diels*, 165: 32-37.
- Shen, K.; Liu, H.; Xiang, H.; Qin, X.; Du, G. y Tian, J. 2016. Combining biochemical with HNMR base metabolomics approach unravels the diabetic activity of genipin and its possible mechanism. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 129: 80-89.
- Shinde, S.; Junne, S.; Wadje, S. y Baig, M. 2009. The diversity of antibacterial

compounds of *Terminalia species* (Combrataceae). Pakistan. *Journal of biology*, 122: 1483-1486.

Tan, G.; Pezzulo, J.; Kinghom, A. y Hughes, S. 1991. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *Journal Natural Products*, 54: 143-154.

Trevor, S.; Butler, M.; Adams, S.; Laity, P.; Burley, J. y Cameron, R. 2008. Structure and phase transition of genipin, an herbal medicine and naturally occurring cross-linker. *Crystal Growth y Design*, 85: 1748-1753.

Vasconcelos, O.; Lorenzo, N. y Dasilva, S. 2016. Chemical, morphological, and thermogravimetric of *Terminalia catappa* Lin. *Technol Campinas*, 361:151-158.

Wakai, A.; Roberts, I. y Schierhout, G. 2007. Mannitol for acute traumatic brain injury. *Journal of Chemistry*, 250: 60- 67.

Warnick, G.; Knopp, R.; Fitzpatrick, V. y Branson, L. 1990. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clinical Chemistry*, 36: 15-19.

Zhai, Y.; Yao, J.; Fan, Y.; Xy, L.; Gao, J. y Zhao, X. 2001. Inhibitory effects of LR-98 on proliferation of hepatocarcinoma cells. *Natural Sciences*, 372: 213- 217.

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Evaluación De La Actividad Anti-Hipercolesterolémica De Las Plantas <i>Terminalia Catappa</i> L (Almendrón) Y <i>Genipa Americana</i> L (Caruto) En Ratones Albinos
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
CENTENO ANTÓN, DANIELA CAROLINA	CVLAC	V- 19.346.578
	e-mail	centenod016@gmail.com
	e-mail	
SÁNCHEZ ZERPA, PEDRO ELÍAS	CVLAC	V- 19.081.448
	e-mail	pedrosz8873@gmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Terminalia catappa, Genipa americana, actividad anti- hipercolesterolémica, metabolitos secundarios.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	BIOANÁLISIS
	PRODUCTOS NATURALES

Resumen (abstract):

Se evaluó el efecto anti-hipercolesterolémico de la hoja de *Terminalia catappa* y la corteza de *Genipa americana* L, las cuales son especies vegetales empleadas en la medicina tradicional para reducir altos niveles de colesterol e hipertensión arterial. En los extractos metanólicos obtenidos de las plantas *T. catappa* L (Almendrón) y *G. americana* L (Caruto), recolectadas en los jardines del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente (*T. catappa*) y en el caserío Las Veguitas, municipio Juan Manuel Cajigal, Onoto-estado Anzoátegui (*G. americana* L), se detectó la presencia flavonoides, taninos, polifenoles, esteroides, saponinas y lípidos. Ambos extractos fueron sujetos a evaluación de efecto hipocolesterolémico en ratones albinos, el proceso fue desarrollado en dos etapas, en una primera fase se les indujo hiperlipidemia a los animales mediante el suministro de alimento suplementado con grasa de pollo en proporción 80/20, para garantizar el aumento del colesterol en sangre; en una segunda etapa los ratones fueron tratados con una solución acuosa de extracto de almendrón o de caruto a dosis de 125 o 250 mg extracto/kg ratón/día por vía oral. Similarmente, otro grupo de animales fue tratado con una dosis de 8,3 mg rosuvastatina/kg ratón/día, como control hipolipidémico. La evaluación del efecto anticolesterolémico evidenció una reducción de los niveles de colesterol de $82,8 \pm 6,7$ mg/dl en ratones hiperlipidémicos a $72,2 \pm 0,8$ y $72,6 \pm 14,4$ mg/dl en ratones tratados con extractos de almendrón y de caruto a la dosis de 250 mg extracto/kg ratón/día, respectivamente. Valores que están muy por debajo del contenido de colesterol en los ratones alimentados con alimento estándar para roedores, $82,8 \pm 6,7$ mg/dl. Estos resultados corroboran el uso empírico que se les da a estas especies vegetales para regularizar los niveles de colesterol y la hipertensión arterial. Adicionalmente, se purificó un sólido, que precipitó en el extracto metanólico de la corteza de *G. americana* L, mediante lavados sucesivos y procesos de recristalización, para el cual los análisis espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de carbono trece y protones, así como los de espectrometría de masas, mediante ionización por electronebulización, coinciden para una sustancia tipo alditol semejante al manitol, aunque con diferencia de $\sim 12^{\circ}\text{C}$ en el punto de fusión. Estos resultados indican que *T. catappa* y *G. americana* L son plantas promisorias para continuar el proceso de evaluación y aislamiento de posibles agentes antilipémicos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Henríquez Willian	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8 249 952
	e-mail	whenriquez66@gmail.com
	e-mail	
Lanza Vilma	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	10 948 805
	e-mail	vlanzacastillo@yahoo.es
	e-mail	
Herrera Hernando	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5 872 352
	e-mail	hherrera@udo.edu.ve
	e-mail	
Fariñas Milagros	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8 440 052
	e-mail	Milyfari2006@gmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

Colocar fecha de discusión y aprobación:

2017	05	31
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-CentenoD-SanchezP.doc	Application/word

Alcance:

Espacial: NACIONAL

Temporal: TEMPORAL

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado (a) en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo:

Licenciatura

Área de Estudio:

Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

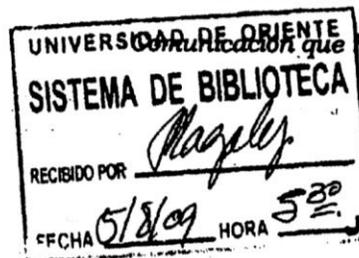
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CURVELO
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.


Centeno Daniela
Autor


Sánchez Pedro
Autor


Henríquez Willian
Asesor


Dra. Vilma Lanza
Co-Asesora