

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Efecto hipoglicemiante, hipolipemiante y
antiaterogénico del extracto etanólico de las hojas de
Luma chequen (Molina.) A. Gray “rayan castilla” en
ratas dislipidemicas**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y
Bioquímica

AUTOR

Ernesto Raúl TORRES VÉLIZ

ASESOR

Jorge Luis ARROYO ACEVEDO

Lima – Perú

2017



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
 Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
 AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

Siendo las **14:00 hrs. del 28 de junio de 2017** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. María Elizabeth González Loayza e integrado por los siguientes miembros: Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (Asesor), Dr. Víctor Luis Izaguirre Pasquel, Dr. Eduardo Flores Juárez y la Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"Efecto hipoglucemiante, hipolipemiante y antiaterogénico del extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina.) A. Gray "rayan castilla" en ratas dislipidemicas"**, presentado por el Magíster en Farmacología **ERNESTO RAÚL TORRES VÉLIZ**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

muy bueno (17)

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Magíster en Farmacología **ERNESTO RAÚL TORRES VÉLIZ**, el Grado Académico de Doctor en **Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las *17* hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las *17:10* hrs. del 28 de junio de 2017.

M. Elizabeth González L.

Dra. María Elizabeth González Loayza (P.P., D.E.)
 Presidenta

Jorge Luis Arroyo Acevedo

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (P. P. T.C.)
 Miembro - Asesor

Víctor Luis Izaguirre Pasquel

Dr. Víctor Luis Izaguirre Pasquel (P. P. T.P.)
 Miembro

Eduardo Flores Juárez

Dr. Eduardo Flores Juárez (P. P. T.C.)
 Miembro

Karim Lizeth Jiménez Aliaga

Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga (P. Aux. T.C.)
 Miembro

Observaciones:

Jr. Puno 1002 - Lima 1
 Apartado Postal 4559 Lima 1

.....Teléfono: 619-7000 anexo 4812.....
 Email: upg.farmacia@unmsm.edu.pe

DEDICATORIAS.

*A la memoria de mi mamá **Miguelina** que me inculco el amor por la farmacia y siempre me alentó y me da su ayuda desde el cielo.*

*A mi papá **Anselmo**, por transmitirme su paciencia y buen humor a todo momento.*

*A mi esposa **Marlene** y mis hijos **Alonso y Miguel** por su apoyo, aliento y comprensión en los momentos más difíciles.*

*A mis hermanos **Gustavo y Ana Melba**, por su apoyo y aliento a seguir adelante.*

*A la Dra. **Carmela Ferreyra Paredes**, por brindarme la oportunidad de desarrollarme en la apasionante área de la farmacología.*

*A los Doctores **Haydee Chávez Orellana, Miguel Félix Véliz, Esther Macha Guillén, Marlene Mejía Quispe** y **Henry Jaramillo Vidal** por su apoyo en la parte fitoquímica de la investigación.*

A mis amigos y colegas de los laboratorios de Farmacología y Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM gracias por su aliento, apoyo y colaboración:

Luis Rojas Ríos

Rosario Carreño Quispe.

Javier Ramírez Cruz

Walter Rivas Altez

*A mi amigo **Reynaldo Madrid**, por su apoyo técnico en la parte farmacológica de la investigación.*

AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo
Amigo y asesor, quien me brindo su ayuda
espiritual y académica para llevar adelante
el presente trabajo de investigación.*

*A los jurados informantes de la tesis
Dr. Víctor Luis Izaguirre Pasquel. (Presidente)
Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo. (Miembro - asesor)
Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga. (Miembro)
Por sus importantes aportes y sugerencias.*

*A los miembros del Jurado Examinador y
Calificador:
Dra. María Elizabeth Gonzáles Loayza (Presidenta)
Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga. (Miembro)
Dra. Eduardo Flores Juárez (Miembro)
Dr. Víctor Luis Izaguirre Pasquel. (Miembro)
Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo. (Miembro - asesor)*

*A las personas amigas que directa o
indirectamente contribuyeron a la
realización de éste trabajo de investigación*

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	
SUMMARY	
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.	
1.1 Situación problemática.	1
1.2 Formulación del problema.	3
1.4 Justificación teórica.	3
1.5 Justificación práctica.	4
1.6 Objetivos.	4
1.6.1 Objetivo general.	4
1.6.2 Objetivos específicos.	5
CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO	
2.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación.	6
2.2 Antecedentes de investigación.	8
2.3 Bases teóricas.	12
2.3.1 Características de la planta.	12
2.3.2 Estrés oxidativo y enfermedades cardiovasculares.	14
2.3.3 Plantas medicinales y alimentos ricos en flavonoides en relación a la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares.	21
2.3.4 Potenciadores herbarios.	23
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.	
3.1 Materiales.	26
3.1.1 Material biológico.	26
3.1.2 Reactivos.	26
3.1.3 Equipos de laboratorio.	26
3.2 Identificación de los metabolitos secundarios.	27
3.2.1 Obtención del extracto etanólico por percolación.	27
3.2.2 Screening fitoquímico.	27
3.2.3 Fraccionamiento del extracto etanólico.	27
3.2.4 Aislamiento de metabolitos secundarios.	29
3.3 Métodos de estudio toxicológico y farmacológico.	32

3.3.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral en ratas.	32
3.3.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante.	33
3.3.2.1 Evaluación del efecto hipoglicemiante en dosis única en ratas normoglicémicas.	33
3.3.2.2 Tolerancia a la glucosa en ratas normoglicémicas.	33
3.3.2.3 Evaluación del efecto hipoglicemiante en ratas diabéticas por estreptozocina (STZ).	34
3.3.3 Evaluación del efecto hipolipemiante y antiaterogénico en ratas dislipidémicas por suplemento de colesterol.	35
3.3.4 Análisis estadístico.	35
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
4.1 Presentación de resultados.	36
4.1.1 Del estudio fitoquímico.	36
4.1.2 Del estudio toxicológico y farmacológico.	39
4.2 Discusión de resultados.	46
CONCLUSIONES.	51
RECOMENDACIONES.	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	53
ANEXOS.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Estrés oxidativo, su relación con la patogénesis de enfermedades y la participación de los antioxidantes en su atenuación	15
Figura 2.	Determinantes de células vasculares de la generación de superóxido y el estado redox.	16
Figura 3.	Patogénesis y complicaciones de la diabetes.	17
Figura 4.	Factores determinantes de la hiperglicemia.	17
Figura 5.	Mecanismos relacionados al estrés oxidativo implicados	18
Figura 6.	Mecanismo diabetógeno de la estreptozocina	19
Figura 7.	Especies oxidantes reactivas y la patogénesis de la aterosclerosis.	20
Figura 8.	Transporte de lipoproteínas y sitios de intervención farmacológica actúales y sitios potenciales para el	21
Figura 9.	Mecanismo de mejora de la biodisponibilidad de diferentes bioactivos naturales.	25
Figura 10	Screening fitoquímico en hojas de <i>Luma chequen</i> .	28
Figura 11	Fraccionamiento del extracto etanólico	29
Figura 12	Fraccionamiento cromatográfico del extracto acetato de etilo de <i>Luma chequen</i> .	31
Figura 13.	Espectro UV del flavonoide HTM1.	37
Figura 14.	Espectro UV del flavonoide HTM2.	38
Figura 15.	Espectro UV del flavonoide HTM3.	39
Figura 16	Efecto del extracto de <i>L. Chequen</i> sobre el peso corporal en el estudio de toxicidad aguda por vía oral en ratas.	40
Figura 17.	Efecto del extracto de <i>Luma chequen</i> administrado en dosis única sobre la glucemia en ratas.	41
Figura 18.	Efecto del extracto de <i>Luma chequen</i> sobre la glucemia de ratas normoglicémicas en la prueba de tolerancia a la glucosa.	42
Figura 19.	Efecto del extracto de <i>Luma chequen</i> sobre la glucemia de ratas hiperglicémicas por estreptozotocina.	43
Figura 20.	Efecto del extracto de <i>Luma chequen</i> en la variación de peso corporal de las ratas hiperglicémicas por STZ.	43
Figura 21.	Cortes histológicos de aorta de rata suplementada con colesterol más aceite de oliva (vehículo).	45
Figura 22.	Cortes histológicos de aorta de rata suplementada con colesterol más extracto (vehículo aceite de oliva).	45

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Metabolitos secundarios identificados en el screening fitoquímico.	36
Tabla 2. Resultado de las reacciones de coloración efectuadas sobre los extractos de <i>Luma chequen</i> .	37
Tabla 3. Efecto del extracto de <i>Luma chequen</i> sobre el peso corporal en el estudio de toxicidad aguda por vía oral en ratas.	39
Tabla 4. Efecto del extracto de <i>Luma chequen</i> administrado en dosis única sobre la glucemia en ratas normoglicémicas.	40
Tabla 5. Efecto del extracto de <i>Luma chequen</i> sobre la glucemia de ratas normoglicémicas en la prueba de tolerancia a la glucosa.	41
Tabla 6. Efecto del extracto de <i>Luma chequen</i> sobre la glucemia de animales hiperglicémicos por estreptozocina.	42
Tabla 7. Efecto hipolipemiante del extracto de <i>Luma chequen</i> en ratas.	44

RESUMEN.

Introducción: *Luma chequen* (Molina) A. Gray es una planta aromática de la familia Mirtaceae, usada en medicina tradicional de Pomabamba (Ancash – Perú) para la hipercolesterolemia. **Objetivos:** Identificar metabolitos secundarios, evaluar la toxicidad aguda y demostrar efecto hipoglucemiante, hipolipemiante y antiaterogénico del extracto etanólico de las hojas. **Diseño:** Preclínico, experimental (estudio farmacológico) y descriptivo (estudio fitoquímico). **Lugar:** Facultades de Medicina, Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Lima; San Luis Gonzaga de Ica, Perú. **Material biológico:** Ratas Holtzman hembras y machos. Hojas desecadas. **Intervenciones:** Screening fitoquímico para identificar metabolitos secundarios, se obtuvo el extracto etanólico por percolación. La estimación de la DL₅₀ se ejecutó según la prueba de la OECD 425; se evaluó el efecto hipoglucemiante del extracto (400 mg/Kg) en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas por carga de glucosa y estreptozocina; además el efecto hipolipemiante y antiaterogénico en ratas suplementadas con colesterol. **Resultados:** Se identificó flavonoides (quercetina, rutina y quercetin 3-metil éter), taninos, triterpenos, esteroides, leucoantocianidinas y catequinas. La toxicidad indica que la DL₅₀ estaría sobre 2000 mg/Kg. Disminuyó el porcentaje de glucemia inducida 12.35% (0,5 h), -7.04% (1 h) y -13.8% (2 h) con $p < 0,05$, en comparación al grupo control. Disminuyó el porcentaje de glucemia inducida por STZ (203,75%) en comparación al control (290,51%). ($p < 0,05$) Disminuyó el nivel de triglicéridos y VLDL en 25.9% y 26,1% ($p < 0,05$) respectivamente. Disminuyó el daño esclerótico en aortas de ratas suplementadas con colesterol. **Conclusiones:** Se demostró que el extracto etanólico de *Luma chequen* posee efecto hipoglucemiante, hipolipemiante y antiaterogénico, con DL₅₀ ligeramente tóxica.

Palabras clave: *Luma chequen*, Rayan castilla, hipoglucemiante, hipolipemiante, flavonoides.

SUMMARY.

Introduction: *Luma chequen* (Molina) A. Gray is an aromatic plant of the family Mirtaceae, used in traditional medicine of Pomabamba (Ancash - Peru) for hypercholesterolemia. **Objectives:** To identify secondary metabolites, to evaluate the acute toxicity and to demonstrate the hypoglycemic, hypolipidemic and antiatherogenic effect of the ethanolic extract of the leaves. **Design:** Preclinical, experimental (pharmacological study) and descriptive (phytochemical study). **Place:** Faculties of Medicine, Pharmacy and Biochemistry, Major National University of San Marcos de Lima; San Luis Gonzaga of Ica, Peru. **Biological material:** Holtzman female and male rats. Dried leaves. **Interventions:** Phytochemical screening to identify secondary metabolites, the ethanolic extract was obtained by percolation. The estimation of the LD50 was performed according to the test of OECD 425; the hypoglycemic effect of the extract (400 mg / kg) was evaluated in normoglycemic and hyperglycemic rats by loading of glucose and streptozocin; In addition to the hypolipidemic and antiatherogenic effect in rats supplemented with cholesterol. **Results:** Flavonoids (quercetin, rutin and quercetin 3-methyl ether), tannins, triterpenes, steroids, leucoanthocyanidins and catechins were identified. Toxicity indicates that the LD50 would be above 2000 mg / kg. The percentage of glycemia induced was 12.35% (0.5 h), -7.04% (1 h) and -13.8% (2 h) with $p < 0.05$, compared to the control group. The percentage of STZ-induced glycemia decreased (203.75%) compared to control (290.51%). ($P < 0.05$). The level of triglycerides and VLDL decreased in 25.9% and 26.1% ($p < 0.05$), respectively. Sclerotic damage decreased in aortas of rats supplemented with cholesterol. **Conclusions:** It was demonstrated that the ethanolic extract of *Luma chequen* (Molina) A. Gray has a hypoglycemic, hypolipemic and antiatherogenic effect, with slightly toxic LD50.

Key words: *Luma chequen* (Molina) A. Gray, Rayan castilla, hypoglycemic, hypolipidemic, flavonoids.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación Problemática.

Alrededor de 250 millones de personas en la región de las Américas padecen alguna enfermedad crónica no transmisible (ECNT). En el 2007, 3,9 millones de personas murieron por ECNT. Los riesgos compartidos para las ECNT son el consumo de tabaco, el uso nocivo de alcohol, la mala alimentación y la inactividad física. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte por ECNT. La diabetes causa en la región de las Américas alrededor de 242.000 muertes anuales, de las cuales 22.000 (8%) se estima que son evitables, considerando que ocurrieron en personas menores de 50 años de edad. Se proyecta que el número de personas con diabetes en las Américas se incrementará de 62,8 millones en 2011 a más de 91 millones en 2030 (OPS, 2012).

En el Perú en el 2007 la tasa de mortalidad por enfermedades crónicas no transmisibles fue de 443.8 muertes por 100 mil habitantes. En este grupo las enfermedades que producen mayor mortalidad son la enfermedad isquémica del corazón y las cerebro vasculares, las que tuvieron un mayor incremento entre 1987 y 2007 (MINSa, 2010).

La dislipidemia es un poderoso factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular. En la práctica clínica, los componentes que habitualmente se manejan para valorar el riesgo cardiovascular de los pacientes y para tomar decisiones terapéuticas son el colesterol total, el colesterol LDL, el colesterol HDL y, en menor medida, los triglicéridos. (Millán et al, 2011).

La morbilidad por cardiopatía coronaria (CHD) es dos a cuatro veces más alta en pacientes con diabetes que en aquellos que no la padecen y la mortalidad

por CHD es hasta 100% más alta en diabéticos que en no diabéticos en el transcurso de un periodo de seis años. La dislipidemia de origen diabético regularmente se caracteriza por triglicéridos altos, HDL-C bajo, y aumentos moderados del colesterol total y del LDL-C. (Bersot, 2012).

La estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 afirma que la medicina tradicional y complementaria (MTC) es una parte importante y con frecuencia subestimada de la atención de salud. Se la practica en casi todos los países del mundo, y la demanda va en aumento. La medicina tradicional de calidad, seguridad y eficacia comprobadas contribuye a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud (OMS, 2014).

En un sentido amplio, se puede decir que la validación de una planta medicinal envuelve todos los procedimientos necesarios para la demostración cabal de su efectividad como medicamento y que su índice terapéutico es compatible con el uso humano, incluyendo para ello los ensayos preclínicos y clínicos con la planta (Lapa et al, 2001).

La OMS y la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) recomiendan un consumo diario de al menos 400 g o 5 porciones de frutas y verduras para ayudar en la prevención de enfermedades crónicas tales como enfermedades del corazón, cáncer, diabetes y obesidad. (Rodriguez-Fragoso et al, 2011). La ingesta de flavonoides encontrados en el vino, el té y varios alimentos vegetales se correlaciona inversamente con la mortalidad por enfermedad coronaria atribuido a la actividad antioxidante de sus compuestos polifenólicos, y la modificación oxidativa de lipoproteínas de baja densidad (LDL) como paso clave en la formación de una lesión aterosclerótica (Benito et al, 2002). Una revisión de Lakhanpal et al, 2007, reporta estudios que correlacionan inversamente la ingesta de quercetina y la concentración de colesterol en plasma, acción antiagregante plaquetaria e inhibición de la proliferación y migración de musculo liso aórtico, además de acciones implicadas en la prevención de las complicaciones de la diabetes como la inhibición de la aldosa reductasa, una enzima que convierte glucosa en sorbitol (su acumulación se relaciona a neuropatía, retinopatía y nefropatía).

Luma chequen (Molina.) A. Gray es una planta aromática usada en la medicina tradicional de Pomabamba (Áncash) para el tratamiento de hipercolesterolemias. Con resistencia natural hacia la predación relacionado a la presencia de lumaflavanonas (Labbé et al, 2002); sus aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana (Goncalves et al, 2006) y antioxidante evaluado en varios modelos (Carhuapoma, 2006), sus constituyentes fenólicos derivados de flavonoles y antocianinas con alta capacidad antioxidante en el ensayo de DPPH, apoyan al menos en parte, su uso como medicamento botánico (Simirgiotis et al, 2013). El deterioro de su hábitat ha generado investigaciones agrarias relacionadas a evitar su deforestación ya que es considerada una planta con alto potencial para uso medicinal y en la industria de los nutraceuticos (Mancilla et al, 2013; Minsal Chile, 2010). Teniendo en cuenta estos antecedentes se planteó la interrogante que motivo la presente investigación.

1.2 Formulación del problema.

¿El extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray administrado por vía oral tendrá efectos hipoglicemiantes, hipolipemiantes y antiaterogénicos en ratas dislipidémicas?

1.3 Justificación teórica.

El estudio ha permitido validar una planta medicinal de uso tradicional (Lapa et al, 2001) y su posible uso como nutraceutico aromático preventivo de enfermedades cardiovasculares y la vez tener datos de toxicidad. Los flavonoides presentes en el extracto serían los posibles responsables de los efectos encontrados, además de la contribución de los aceites esenciales (Carhuapoma, 2006), en esta planta nativa peruana usada en la medicina complementaria en relación a sus efectos hipoglicemiantes, hipolipidémicos y antiaterogénicos (Fidele et al, 2017). Evalúa la posibilidad de usar el extracto como tratamiento complementario coadyuvante a los medicamentos de

elección en dislipidemia y diabetes mellitus tipo 2. (Rodrigues–Fragoso et al, 2011).

Actualmente hay múltiples artículos de investigación preclínica (Fidele et al, 2017; Downing et al, 2016; Oliveira et al, 2016) y clínica (Messina et al 2015), que abordan la validación de las propiedades hipolipemiantes, hipoglucemiantes y antiaterogénicas de plantas utilizadas en medicina tradicional en forma de extractos o mezcla de extractos estandarizados, e identifican la presencia cuantitativa y/o cualitativa de los principios activos asociados a las actividades terapéuticas mencionadas.

1.4 Justificación práctica

En el aspecto práctico, aplica metodologías actuales en la investigación y desarrollo de fitofármacos con actividad hipoglicemiante, hipolipidémica y antiaterogénica, en el marco del registro sanitario de medicamentos herbarios según el Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios (MINSA - DIGEMID, 2011).

Este trabajo es conveniente para varios sectores involucrados en el biocomercio y producción de fitofármacos porque brinda datos específicos sobre la eficacia y seguridad preclínica de *Luma chequen* (Molina.) A. Gray “rayan castilla”. Para los pobladores de las zonas de cultivo de la planta, el fomento del cultivo de esta especie, generará empleo y mejora de la calidad de vida, en el marco del uso sostenible de la biodiversidad. (MINAN, 2013).

1.5 Objetivos.

1.5.1 Objetivo general.

Determinar el efecto hipoglicemiante, hipolipemiente y antiaterogénico del extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina.) A. Gray “rayan castilla” en ratas dislipidemicas.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Identificar los metabolitos secundarios y principales tipos de núcleos de flavonoides en el extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “rayan castilla”.
2. Evaluar la toxicidad aguda del extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “rayan castilla” en ratas por vía oral.
3. Determinar el efecto hipoglicemiante del extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “rayan castilla” en ratas.
4. Determinar el efecto hipolipemiante y antiaterogénico del extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “rayan castilla” en ratas dislipidemicas.

CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO.

2.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación.

Kuhn (1962) uno de los más influyentes filósofos de la ciencia del siglo XX, obtuvo fama por sus polémicos presupuestos, concernientes a la noción de revolución científica y paradigma, totalmente expuestos en uno de los libros más citados de todos los tiempos: *La estructura de las revoluciones científicas*. En una versión bien sintética, este connotado filósofo de la ciencia consideró que: “el desarrollo de la ciencia transitaba por 5 fases: establecimiento de un paradigma - ciencia normal – crisis - revolución científica y establecimiento de un nuevo paradigma”. En esta concepción la noción de paradigma resulta fundamental y lo definió como realizaciones científicas universalmente reconocidas que, durante cierto tiempo, proporcionan modelos de problemas y soluciones a una comunidad científica.

Datos de fuentes reconocidas indican crisis en el sistema sanitario debido a cambios importantes en las características de las poblaciones. La Organización Internacional del Trabajo (OIT) manifiesta que el sistema de salud peruano presenta un elevado grado de fragmentación, una importante proporción de la población no cubierta y grandes diferencias de cobertura entre los individuos efectivamente alcanzados por la prestación (OIT, 2013). Según plantea el Colegio Médico del Perú (CMP) el Sector Salud atraviesa una grave crisis relacionada a conflictos laborales permanente en el sector, falta de implementación de hospitales y centros de salud, falta de recursos humanos sobre todo especialistas, cifras de cobertura de vacunación cada vez menores, desnutrición y anemia crónica (CMP, 2014). Adicionalmente Foro Salud (2013) expresa que la salud atraviesa una situación muy compleja en el país, con innumerables problemas, como el inadecuado abordaje de la discapacidad y del envejecimiento poblacional, lo cual viene distanciando al

gobierno de los usuarios, profesionales y trabajadores, sin que las autoridades del sector estén en capacidad de viabilizar una salida adecuada.

En relación a cambios importantes en las características de las poblaciones, la OPS (2012), estima que entre 2000 y 2010 la esperanza de vida para ambos sexos en las Américas pasó de 72,2 a 76,2 años –cuatro años de aumento en una sola década– y se proyecta un aumento adicional de 6,5 años hasta 2050. Si bien estas tendencias son sin duda un reflejo de los principales éxitos de la salud pública alcanzados en el último siglo, el envejecimiento acarrea un aumento en las enfermedades crónicas y las discapacidades. En base a las tendencias registradas, se estima que un significativo número de las personas mayores estarán en situaciones de pobreza, en particular mujeres, tanto por su mayor longevidad como por sus condiciones históricas de exclusión social. En los países en desarrollo, donde el envejecimiento de la población está ocurriendo con mayor rapidez, será especialmente desafiante lidiar con estos cambios demográficos y epidemiológicos. Un envejecimiento saludable permite romper con el estereotipo de que las personas mayores son receptoras pasivas de servicios sociales y de salud. No obstante, para llegar a un envejecimiento saludable, basado en programas de “autogestión y autocuidado”, se requieren acciones e inversiones bien definidas y planificadas a lo largo de la vida de los individuos, un enfoque que hasta el momento en general no ha recibido la debida atención, sobre todo en aquellos países donde los sistemas de pensiones y de seguridad social son insuficientes y desfinanciados.

Esta crisis en los sistemas de salud y los cambios dramáticos que están sucediendo en las características de la población están obligando a nuevos modelos de solucionar los problemas sanitarios. Una de las estrategias (OMS, 2013) plantea que la medicina tradicional y complementaria (MTC) es una parte importante y con frecuencia subestimada de la atención de salud. Se la practica en casi todos los países del mundo, y la demanda va en aumento. La medicina tradicional de calidad, seguridad y eficacia comprobadas contribuye a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud. Muchos países reconocen actualmente la necesidad de elaborar un enfoque coherente e integral de la atención de salud, que facilite a los gobiernos, los profesionales

sanitarios y, muy especialmente, a los usuarios de los servicios de salud, el acceso a la MTC de manera segura, respetuosa, asequible y efectiva. Una estrategia mundial destinada a promover la integración, reglamentación y supervisión apropiadas de la MTC será de utilidad para los países que desean desarrollar políticas dinámicas relativas a esta parte importante, y con frecuencia vigorosa y expansiva, de la atención de salud. Esta estrategia engloba la validación científica de una planta medicinal (Lapa et al, 2001) que envuelve todos los procedimientos necesarios para la demostración cabal de su efectividad como medicamento y que su índice terapéutico sea compatible con el uso humano, incluyendo para ello los ensayos preclínicos y clínicos con la planta.

2.2. Antecedentes de investigación.

- Labbé et al (2002), en la búsqueda de nuevos biopesticidas para un manejo integrado y racional del control de las plagas a partir de plantas con resistencia natural hacia la predación, realizaron un estudio químico guiado del extracto metanólico de las hojas frescas de *Luma chequen* que guio al aislamiento de Lumaflavanonas A, B y C. cuyas estructuras fueron propuestas sobre las bases de espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR). Encontraron respuestas positivas en la evaluación de su actividad antialimentaria en *Spodoptera littoralis*, una oruga que se alimenta de las hojas, acción fungistática sobre *Botrytis cinérea*, un hongo que pudre las uvas, y toxicidad en *Brine shrimp (Artemia salina)*.
- Jaramillo et al (2004) identificaron la presencia de taninos, flavonoides, esteroides y/o triterpenoides, leucoantocianidinas y/o catequinas en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Luma chequen*, y demostraron efecto hipocolesterolemico de la fracción acetato de etilo en ratas con dieta hiperlipídica.

- Goncalves et al (2006) estudiaron la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Luma chequen* de Perú. Se observó actividad antimicrobiana significativa contra *Proteus vulgaris*, *Cryptococcus neoformans* y *Cladosporium cladosporioides*.
- Carhuapoma M (2006) caracterizó la composición química y determinó la actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* de Perú. Elucidó las estructuras de 40 compuestos y comprobó su actividad antioxidante en tres modelos *in vitro*. Además encontró una DL50 en ratones de 906.1140 mg/Kg.
- Simirgiotis et al (2013), Investigaron las partes aéreas y las bayas de *Luma apiculata* y *Luma chequen* por los constituyentes fenólicos y capacidad antioxidante, se detectaron en *L. apiculata* doce compuestos fenólicos en frutas y doce en las partes aéreas mientras que *L. chequen* rindió 10 compuestos en las frutas y 16 en las partes aéreas, respectivamente. De los compuestos que ocurren en ambas especies *Luma*, siete fueron identificados como los taninos o sus monómeros, 15 fueron derivados de flavonoles (derivados de miricetina, quercetina, laricitrina y isorhamnetina) y cinco antocianinas. Toda la baya y extractos de las partes aéreas presentan alta capacidad antioxidante en el ensayo de DPPH, que puede estar relacionado con el rango diverso de compuestos fenólicos detectados. La capacidad antioxidante junto con los altos contenidos polifenólicos y compuestos identificados puede apoyar al menos en parte, su uso como medicamentos botánicos.
- Mancilla et al (2013), desarrollaron un procedimiento eficaz de establecimiento al cultivo *in vitro* para la especie nativa chilena *Luma chequen*, la que tiene un alto potencial para uso medicinal y en la industria de los nutraceuticos. *Luma chequen* es una especie que tiene ciertas propiedades medicinales, y está considerada en la lista de hierbas consideradas medicinas naturales por el Ministerio de Salud de Chile. Tiene fruto comestible como otras especies, lo cual puede ser una fuente de ingresos alternativa para los agricultores.

- Brito et al, (2014) estudiaron la composición fitoquímica de seis pequeñas bayas endémicas de la región VIII de Chile entre *ellas Luma Chequen* (Chequen) y *Luma apiculata* (Arrayan). Entre las antocianidinas identificadas destacan delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina. También se identificaron tres ácidos fenólicos (ácidos feruloylquinic, ácido clorogénico y ácido neoclorogénico) y cinco flavonoles (hiperósido, isoquercitrina, quercetina, rutina, miricetina y isorhamnetin). Se probó la actividad antioxidante de los frutos mediante los ensayos FRAP, DPPH y el ensayo de actividad de captación de anión superóxido (SA).
- Torres J (2014) demostró que el extracto etanólico de *Luma chequen* “arrayán” presentó la mayor actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas de referencia, así como a patógenos Gram positivos, Gram negativos y levaduras, aislados de origen hospitalario en comparación con los extractos de hexano y diclorometano que no mostraron actividad inhibitoria significativa.
- Gupta et al (2005) estudiaron el efecto hipoglicémico, antidiabético y antidislipidémico del extracto etanólico de *Annona squamosa* (350 mg/Kg) en ratas y conejos normoglicémicos e hiperglicémicos por estreptozotocina (STZ). Asociando los efectos a sus compuestos bioactivos, entre ellos a los flavonoides. Encontrando que dosis 15 veces superiores no producían mortalidad.
- Hirunpanich et al (2006). Investigaron el efecto hipolipidémico y antioxidante (oxidación de LDL-colesterol) del extracto acuoso liofilizado *Hibiscus sabdariffa* L. (roselle) en ratas suplementadas con colesterol (2 g/Kg). Varios componentes antioxidantes se encuentran en el cáliz de Roselle, tales como antocianinas, quercetina, ácido L-ascórbico y ácido protocatequico, a los cuales se les atribuye en parte los efectos observados.
- Anila et al (2002). Investigaron el efecto antidislipidémico de los flavonoides de *Emblica officinalis* y *Mangifera indica* en ratas. Se encontró que los flavonoides de *Emblica officinalis* (10 mg/Kg/día) inhibe a la HMG CoA

reductasa por lo tanto inhibe la síntesis de colesterol. Los flavonoides de *Emblica officinalis* y *Mangifera* aumentan la excreción fecal de ácidos biliares, relacionado al aumento de la actividad de la LCAT (Lecitina Colesterol Aciltransferasa) implicada con el transporte de colesterol desde los tejidos extra hepáticos hasta el hígado para su degradación.

- Muruganandan S et al (2005). Investigaron el efecto de mangiferina (un glucósido xantona, aislado de las hojas de *Mangifera indica*) sobre el potencial aterogénico de la diabetes inducida por estreptozotocina (STZ). Además se determinó el efecto de mangiferina en la tolerancia oral a la glucosa en ratas normales. La administración intraperitoneal crónica (ip) de mangiferina (10 y 20 mg/kg) una vez al día por 28 días exhibieron actividad antidiabética al reducir considerablemente el nivel de glucosa en ayunas en plasma a diferentes intervalos de tiempo en ratas diabéticas por STZ. Disminuyó el nivel de índice aterogénico en ratas diabéticas. Las evidencias sugieren que tanto, mecanismos pancreáticos y extrapancreáticos podrían estar involucrados en su acción hipoglucemiante.
- Cho W et al (2006) demostraron que el ginsenosido Re de *Panax ginseng* CA Meyer tiene efecto hipoglicémico, hipololesterolémico y reductor de triglicéridos en ratas estreptozotonizadas. En relación al estrés oxidativo, implicado en la patogénesis de la diabetes y sus complicaciones, se encontró que el tratamiento por ginsenosido Re restauró los niveles de glutatión y de malonilaldehído en el ojo y el riñón a los encontrados en las ratas de control. Este es el primer informe que demuestra que el ginsenosido Re tiene una eficacia antioxidante significativa en la diabetes, y evita la aparición de estrés oxidativo en algunos tejidos vasculares.
- Benito S et al (2002) demostraron que una dieta rica en vino tinto de-alcoholado (VTD) incrementa la vasorelajación inducido por acetilcolina y que la ingestión de VTD o dietas ricas en quercetina o catequina modifica la vía del GMP cíclico dependiente de Óxido Nítrico (NO), en ratas alimentadas con dietas semipurificada que contenían 35% DRW, 0,3% quercetina ó 0,3% catequina durante 10 días. La anillos de aorta de ratas

alimentadas con la VTD, quercetina, o las dietas ricas en catequinas mostraron mayor actividad de NOS, producción de NO y contenido de GMP cíclico que los de las ratas alimentadas con la dieta control. No se observaron cambios en la producción de O_2^- . El aumento en la vía del GMP cíclico dependiente de NO explica el efecto benéfico de los flavonoides a nivel vascular.

- Furchgott RF et al (1980) demostraron que para que se produzca la vasodilatación mediada por la acetilcolina (ACh) en preparaciones de aorta aislada debe estar intacta la capa de células endoteliales, ya que éstas poseen receptores muscarínicos, que al ser estimulados por acetilcolina inducen en la célula endotelial la liberación de una sustancia (s) que provoca la relajación de la músculo liso vascular. También dedujeron que, si por error durante la preparación del experimento se rozaba el endotelio la preparación perdía la capacidad de relajarse, más bien se producía contracción también mediada por receptores muscarínicos en músculo liso.

Del análisis de las referencias mencionadas, se puede deducir que un denominador común de las enfermedades cardiovasculares, es el daño oxidativo por radicales libres. También se puede deducir que los compuestos antioxidantes como los flavonoides pueden prevenir la aparición o agravamiento de dichas enfermedades. Varias plantas medicinales de uso terapéutico tradicional en estas enfermedades han sido validadas científicamente y asociado su eficacia a la presencia de compuestos flavonoides u otros compuestos que tengan actividad antioxidante. Por lo tanto, *Luma chequen* podría ser útil en el tratamiento de dichas enfermedades por la comprobada presencia de compuestos antioxidantes.

2.3 Bases Teóricas.

2.3.1 Características de la planta.

2.3.1.1 Clasificación taxonómica.

La muestra vegetal fue clasificada por el Mg. Hamilton Beltrán. En el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988): (Anexo 1)

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA.

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE.

ORDEN: MYRTALES.

FAMILIA: MYRTACEAE

GENERO: *Luma*.

ESPECIE: *Luma chequen* (Molina) A. Gray

Nombre vulgar: Rayan castilla, arrayán, rayán.

2.3.1.2 Distribución geográfica.

Crece desde los 2500 a los 4000 m.s.n.m., en los andes de Sudamérica Central, entre Perú, Bolivia y Chile. En el Perú, se distribuye entre los departamentos de Ancash, Pasco, Lima, Junín, Ayacucho, Arequipa y Cusco, con predilección hacia el Sur. Su población se ve favorecida en lugares de alta humedad, a orillas de los ríos. (Cronquist A, 1981)

2.3.1.3 Aspectos fitoquímicos, bioquímicos, farmacológicos y terapéuticos.

Varios estudios mencionan la presencia de compuestos fenólicos: derivados flavanonas (Labbé et al, 2002); derivados de flavonoles (hiperósido, isoquercitrina, quercetina, rutina, miricetina y isorhamnetin), ácidos fenólicos (ácidos feruloilquinico, ácido clorogénico y ácido neoclorogenico) y antocianinas (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina) y taninos o sus monómeros (Simirgiotis et al, 2013) (Brito et al, 2014); Aceite esencial con 40 compuestos monoterpenos y sesquiterpenos (Goncalves et al, 2006; Carhuapoma, 2006).

Los estudios bioquímicos resaltan la actividad antioxidante *in vitro* en *in vivo* relacionadas a compuestos fenólicos (Simirgiotis et al, 2013) (Brito et al, 2014) y al aceite esencial (Carhuapoma, 2006), actividad inhibidora de xantina oxidasa (Busti et al 2009).

Ensayos farmacológicos indican actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial (Goncalves et al, 2006) y del extracto etanólico frente patógenos Gram negativos y Gram positivos así como levaduras aislados de origen hospitalario (Torres, 2014). Labbé et al, (2002) determinó la actividad fungistática sobre *Botrytis cinérea*, un hongo que pudre las uvas, actividad antialimentaria en *Spodoptera littoralis*, una oruga que se alimenta de las hojas, toxicidad en *Brine shrimp (Artemia salina)*. Jaramillo et al, (2004) probó el efecto hipolcolesterolemico en ratas con dieta hiperlipídica.

Usos terapéuticos tradicionales: tratamiento de gota, reumatismo, tos y diarrea (Labbé et al, 2002); dolores de muela, desórdenes gastrointestinales, infecciones posparto, antiséptico, astringente, balsámico, hemostático, vasoconstrictor, antineurálgico, antiinflamatorio y analgésico (Carhuapoma 2006) (Brito et al, 2014)

Otros usos tradicionales se relacionan a su uso para evitar la putrefacción de los tejidos postmortem. Las hojas frescas son usadas como condimento y aromatizante para preparar embutidos. (Carhuapoma, 2006).

2.3.2 Estrés oxidativo y enfermedades cardiovasculares.

Evidencias a partir de la investigación muestran que el Estrés Oxidativo (EO) está asociado con la patogénesis de la diabetes, obesidad, cáncer, envejecimiento, inflamación, desordenes neurodegenerativos, apoptosis y enfermedades cardiovasculares, resaltando el rol de los antioxidantes como una forma de atenuarlas. (Georgiev et al, 2014). (Figura 1).

El EO, sucede por producción excesiva de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) o Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS), o por disminución de los sistemas antioxidantes. El daño celular se debe a la capacidad que tienen los

radicales libres de actuar sobre las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos de la célula. Cuando los radicales libres interactúan con estos componentes celulares, se originan alteraciones estructurales y funcionales. Como consecuencia de ello, se produce un deterioro de la homeostasis de la célula y la aparición de diferentes enfermedades crónicas, e incluso la muerte celular (Cuerda et al, 2011; Cruz et al, 2011) (Figura 2)

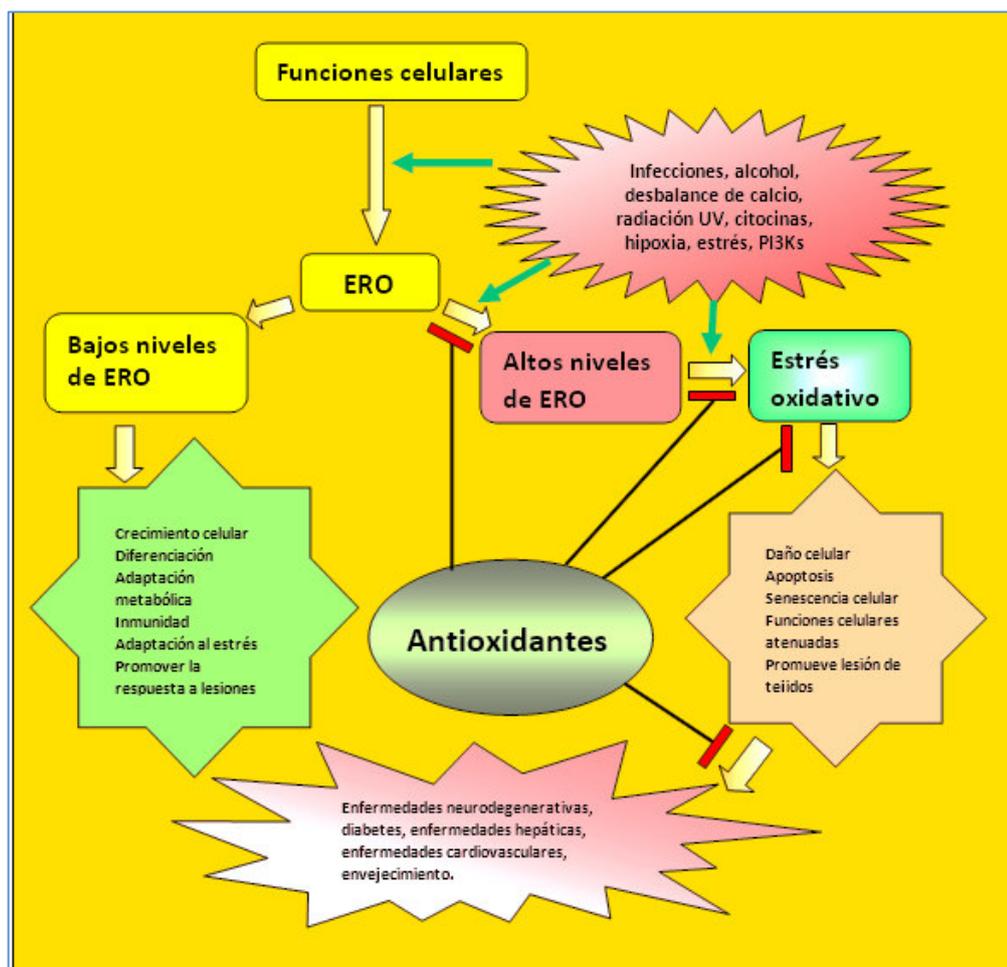


Figura 1. Estrés oxidativo, su relación con la patogénesis de enfermedades y la participación de los antioxidantes en su atenuación. (Adaptado de Georgiev et al, 2014)

ROS es un término colectivo que describe especies químicas que son formadas por una reducción incompleta de oxígeno, incluye al anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical oxidrilo ($HO\bullet$). Por otro lado RNS se refiere a todos los estados de oxidación y aductos reactivos de nitrógeno producidos por la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) a partir de óxido

nítrico (NO), nitroxilo (NO⁻), Snitrosotiol (RSNO) y peroxinitrito (OONO⁻), como productos de la reacción entre NO y O₂. (Afanasev, 2010, Yan et al, 2014).

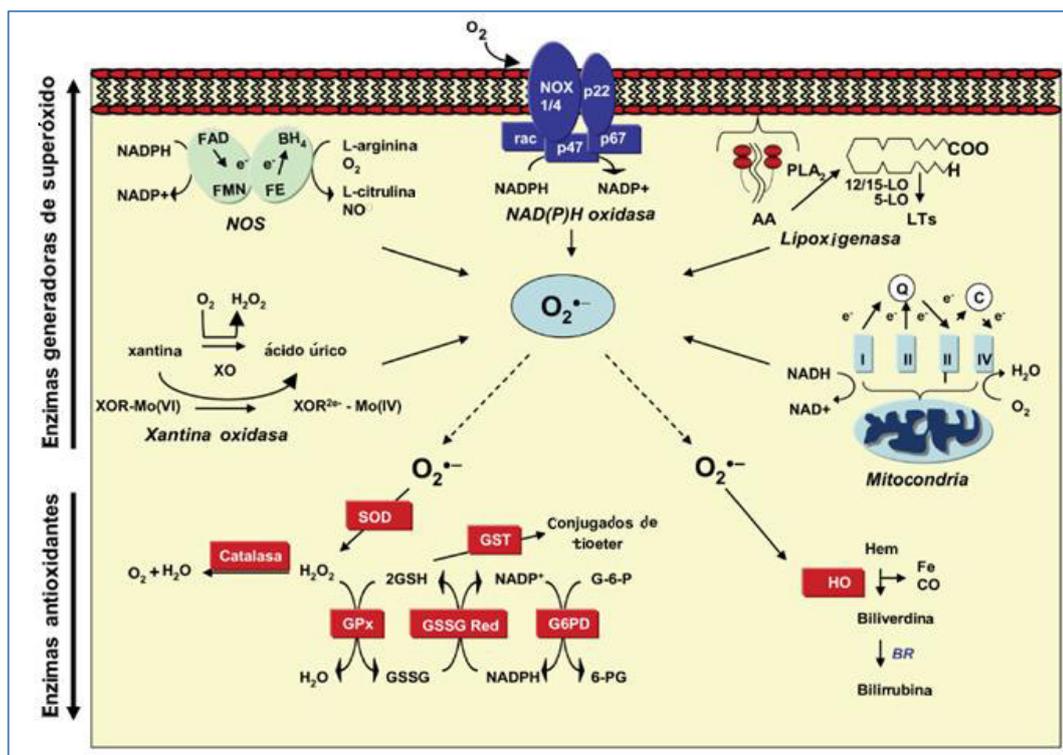


Figura 2. Determinantes de células vasculares de la generación de superóxido y el estado redox. El medio redox vascular se rige por el balance neto entre la generación de oxidantes y el metabolismo por enzimas antioxidantes y moléculas pequeñas. En las células vasculares, O₂^{•-} se sintetiza por las enzimas NAD(P)H oxidasa, xantina oxidasa, lipoxigenasa, eNOS, iNOS desacoplada y como un subproducto de la respiración mitocondrial. Los niveles de O₂^{•-} intracelulares, a su vez, están estrechamente regulada por las actividades de varias enzimas antioxidantes, incluyendo SOD, catalasa, GPXS, GSH reductasa, G6PD, GSH-S-transferasa, y HO-1. De esta manera, el flujo oxidante a través de la célula es regulada para mantener los niveles dentro del rango requerido para los procesos de señalización celular ambiental y el estrés oxidante límite. En contraste, un estado de estrés oxidante no compensado se produce cuando hay un aumento en la producción de oxidantes en ausencia de estímulos fisiológicos y/o una disminución en la capacidad antioxidante celular que resulta en exceso de acumulación de especies oxidantes. (Adaptado de Leopold et al, 2009)

El EO interviene en la patogénesis de la diabetes y en las complicaciones vasculares asociadas a la hiperglicemia, (Pitoco et al, 2010; Wu Yanling et al, 2014), (Figura 3).

A su vez la hiperglucemia se relaciona con disfunciones a diferentes niveles, que orienta a sus enfoques farmacoterapéuticos actuales (Cornell, 2015) (figura 4).

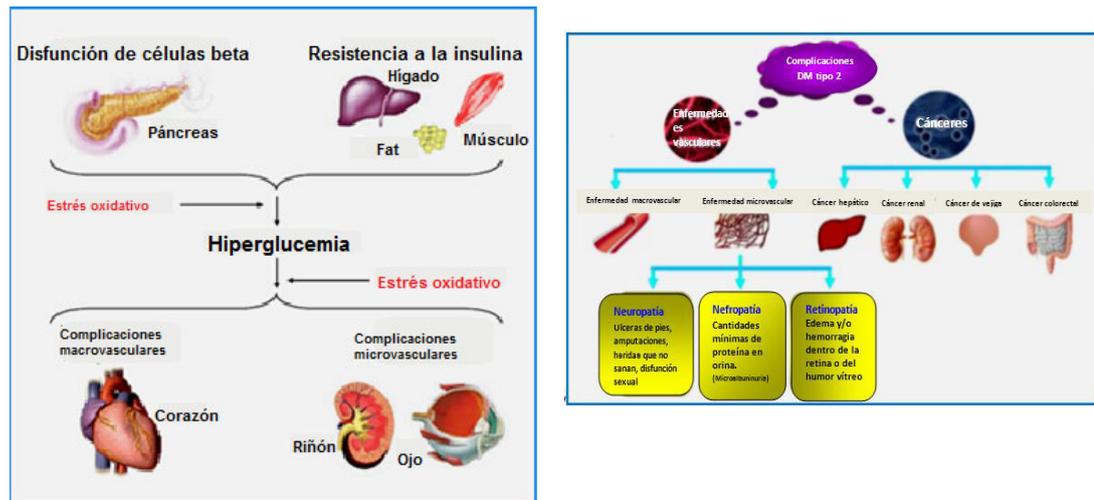


Figura 3. Patogénesis y complicaciones de la diabetes (Adaptado de Pitoco et al, 2010 y Wu Yanling et al, 2014)

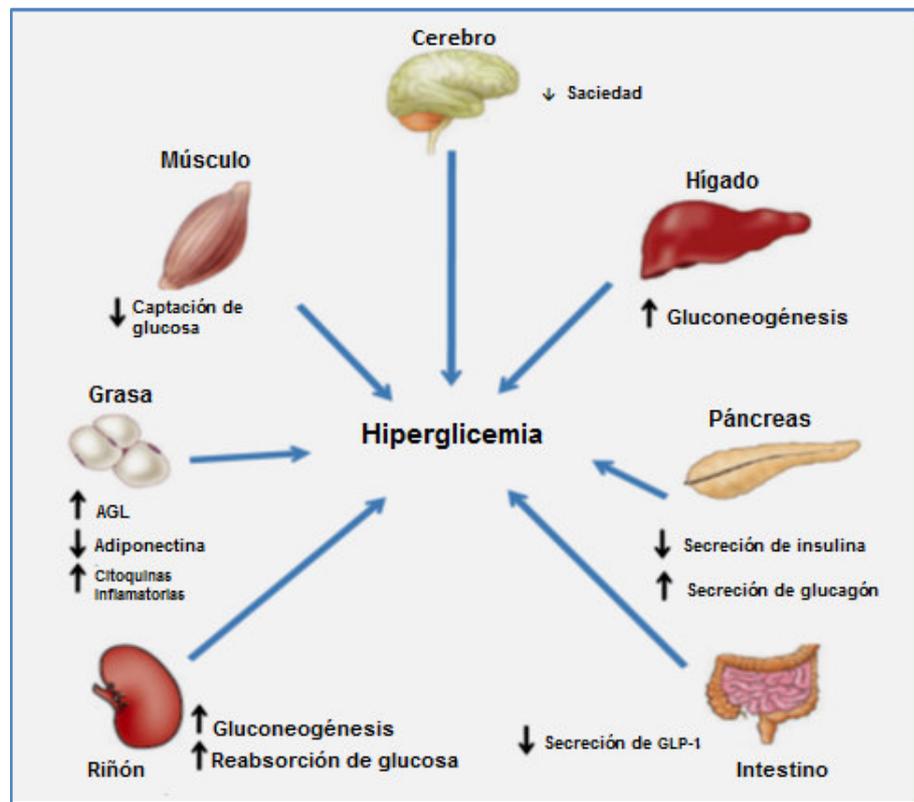


Figura 4. Factores determinantes de la hiperglucemia. (Adaptado de Cornell, 2015)

Los daños tisulares causados por la hiperglucemia se basan en cuatro mecanismos relacionados al EO: 1) aumento del flujo de la vía de poliol, 2) activación de PKC, 3) aumento de la producción intracelular de los AGE

(Advanced Glycation End Products) y 4) sobreactivación de la vía de la hexosamina (Wu Ying et al, 2014) (figura 5).

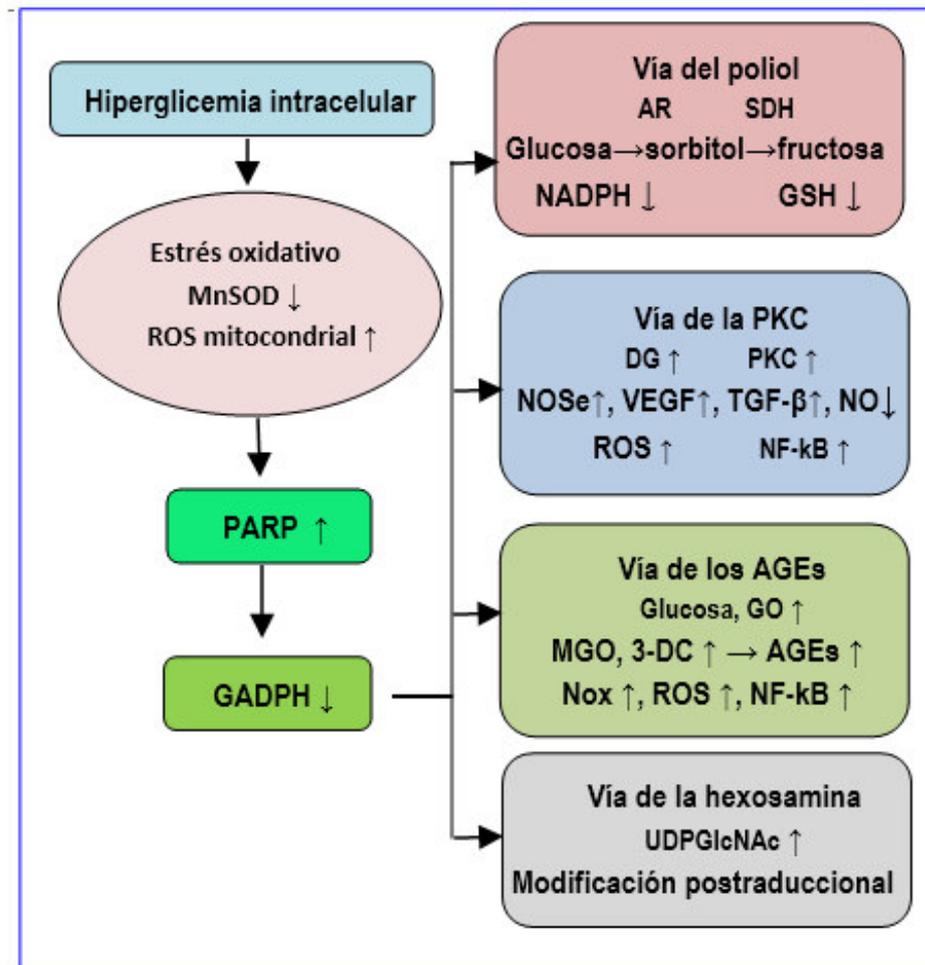


Figura 5. Mecanismos relacionados al estrés oxidativo implicados en las complicaciones de la DM2. (Adaptado de Wu Ying et al 2014)

Por otro lado, los modelos farmacológicos preclínicos incluyen la administración de aloxano y estreptozocina (King, 2012; Szkudelski, 2001) como agentes inductores de diabetes. Los mecanismos diabetógenos incluyen efectos oxidativos. (Figura 6).

Leopold (2009) relaciona la enfermedad cardiovascular aterotrombótica con el riesgo oxidativo, en la cual intervienen la dislipidemia, la disfunción endotelial y la inflamación (figura 7).

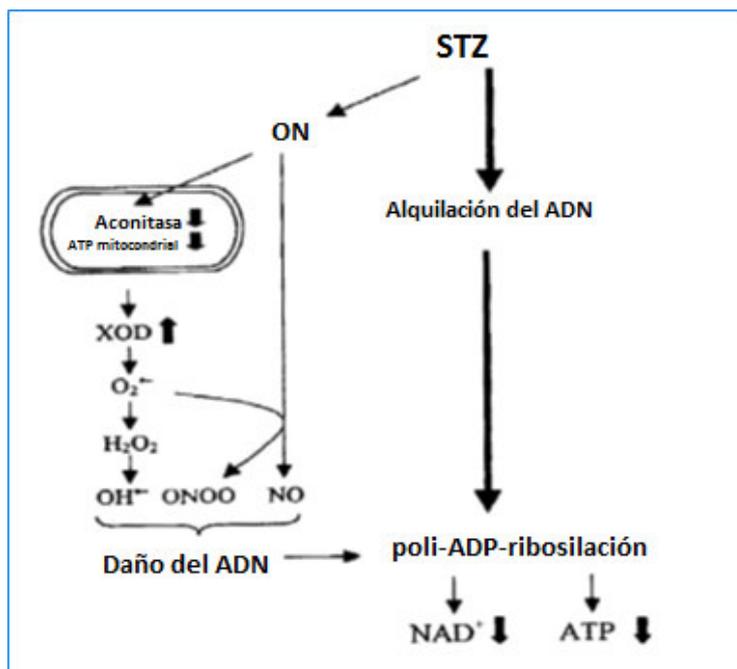


Figura 6. Mecanismo diabetógeno de la estreptozocina. La Estreptozocina (STZ) entra a la célula beta pancreática vía GLUT-2. La acción intracelular de STZ resulta en cambios de ADN en células B pancreáticas que comprende su fragmentación, siendo la principal razón de la muerte de las células B inducida por STZ la alquilación del ADN. El daño en el ADN inducido por STZ activa la poli ADP-ribosilación. Este proceso conduce al agotamiento de NAD⁺ celular, una mayor reducción del contenido de ATP y la posterior inhibición de la síntesis y secreción de insulina. La STZ puede generar especies reactivas de oxígeno, que también contribuyen a la fragmentación del ADN y evocan otros cambios perjudiciales en las células. La formación de aniones superóxido resulta de una acción de la STZ sobre la mitocondria y el incremento de la actividad de la xantina oxidasa. La STZ es un donador de óxido nítrico (NO), El cual también destruye células de los islotes pancreáticos, esta molécula contribuye al daño del ADN inducido por STZ por varios mecanismos, uno es el aumento de la actividad de la guanilato ciclasa y una mayor formación de GMPc. Se encontró que la restricción de la generación de ATP mitocondrial está parcialmente mediada por NO, esta molécula se une a la aconitasa que contiene hierro, inhibiendo la actividad de la enzima. Entonces, la xantina oxidasa cataliza la reacción en la que se forma el anión superóxido. Como resultado de la generación del anión superóxido se forma peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. El NO y las especies reactivas de oxígeno pueden actuar por separado o forman el peroxinitrito altamente tóxico (ONOO). Por lo tanto, los antioxidantes intracelulares o barredores de NO atenúan sustancialmente la toxicidad STZ. (Adaptado de Szkudelski, 2001.)

La dislipidemia es un poderoso factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular. En la práctica clínica, los componentes que habitualmente se manejan para valorar el riesgo cardiovascular de los pacientes y para tomar decisiones terapéuticas son el colesterol total, el

colesterol LDL, el colesterol HDL y, en menor medida, los triglicéridos. (Millan et al, 2011; Bersot TP, 2012).

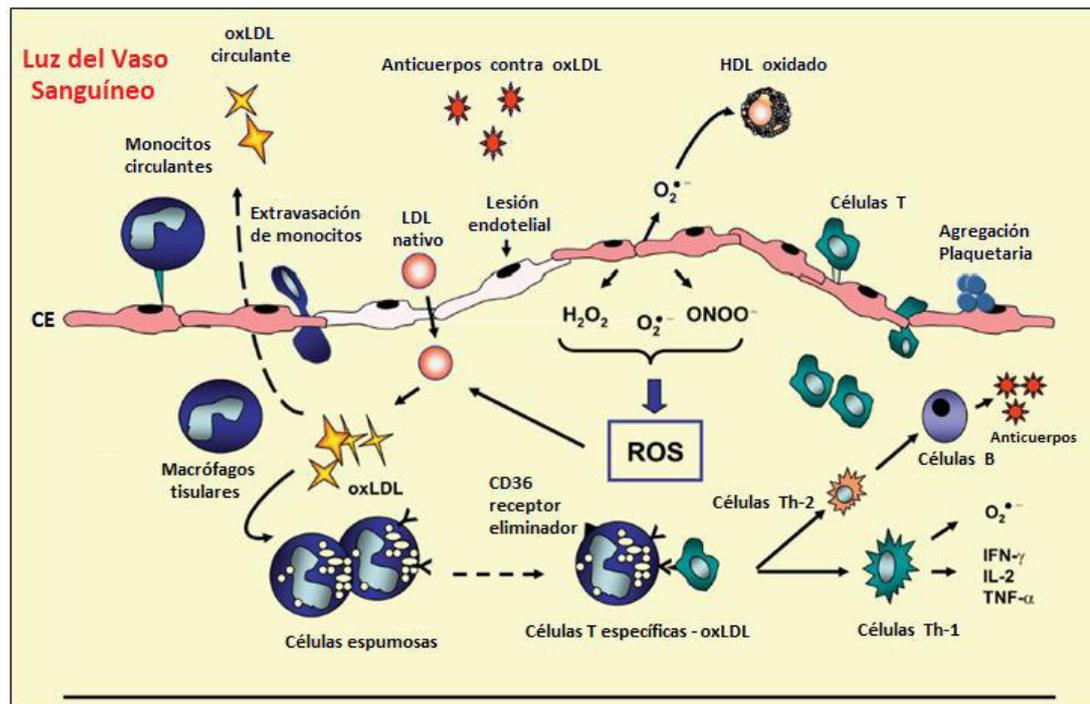


Figura 7. Especies oxidantes reactivas y la patogénesis de la aterosclerosis.

En la pared del vaso, los oxidantes acumulados promueven la lesión de células endoteliales y oxidan LDL nativa (oxLDL). Estas oxLDL son quimiotácticas para monocitos circulan, son absorbidos por macrófagos residentes para formar células espumosas, y servir como nido para la formación de la lesión aterosclerótica. Un exceso de oxidantes aumenta estos efectos por la oxidación de componentes de HDL para que sea disfuncional. El aumento de los niveles de oxidantes también funciona como un enlace entre la respuesta inmune innata y adaptativa a la aterosclerosis. Estos oxidantes promueven la agregación de plaquetas y son quimiotácticas para las células T circulantes, median el reconocimiento de células T de epítopos sobre oxLDL, y activan las células T para convertirse en células T helper-1 y T helper-2, que secretan mediadores inflamatorios y estimulan la formación de anticuerpos mediada por células B, respectivamente. Además, cuando los niveles de oxidantes son elevados, las células T están menos reactivas a los estímulos que limitan la respuesta inmune. (Adaptado de Leopold et al, 2009)

Para entender las estrategias hipolipemiantes hay que revisar lo relacionado al transporte de lipoproteínas, en la cual intervienen varias enzimas (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A [HMG-CoA] reductasa), lipoproteína lipasa, (ACAT: acil coenzima A colesterol acetiltransferasa, que aparece en dos isoformas, cataliza la síntesis intracelular de ésteres de colesterol en macrófagos, corteza

suprarrenal, intestino y el hígado), (LCAT: lecitina colesterol acetiltransferasa, que sintetiza éster de colesterol en las partículas HDL), (CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol y PLTP: proteína de transferencia de fosfolípidos, que intervienen en la transferencia de colesterol entre distintos tipos de partículas lipoproteínas en el plasma, transportadores (NPC1L1), receptores (PPAR α) y mecanismos no específicos (secuestro de ácidos biliares) que pueden ser inhibidas o activados con el fin de favorecer un equilibrio adecuado de los componentes lipídicos. (Rang, et al 2012) (Figura 8).

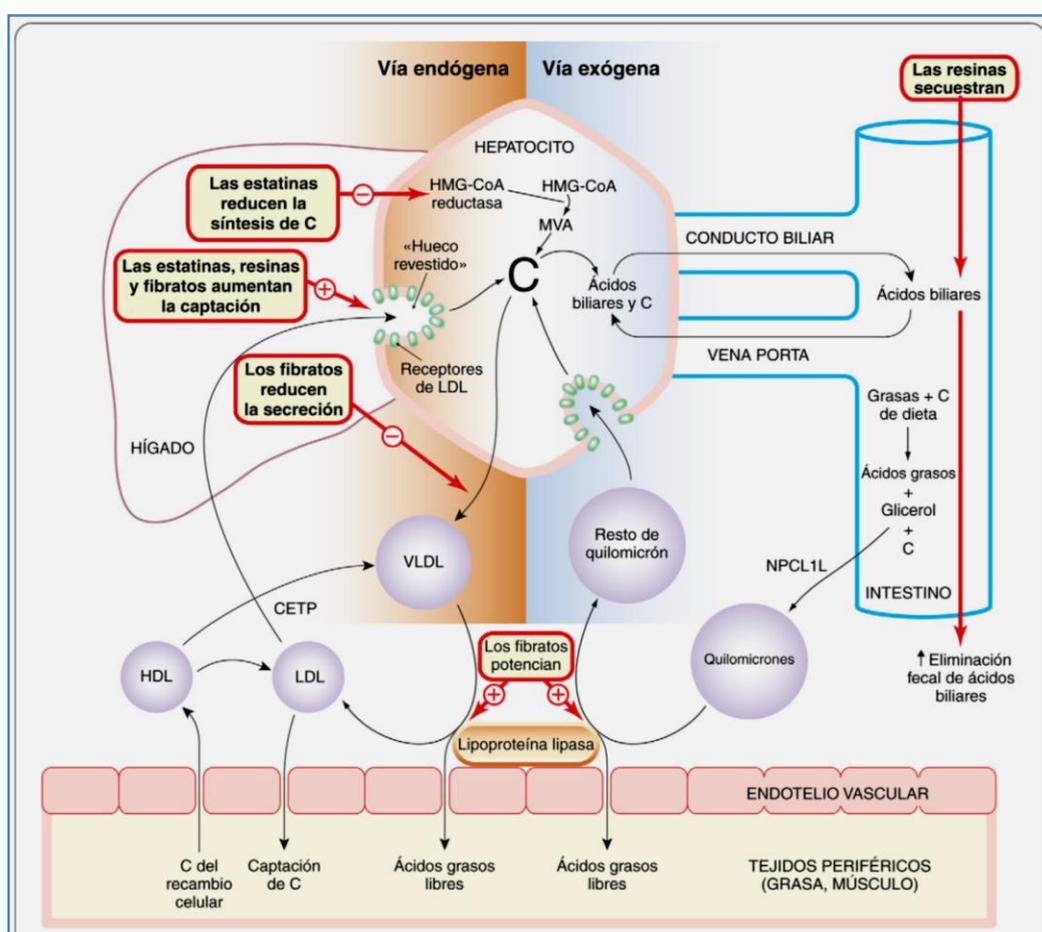


Figura 8. Transporte de lipoproteínas y sitios de intervención farmacológica actuales y sitios potenciales para el tratamiento de dislipidemias. (Adaptado de Rang et al, 2012).

2.3.3 Plantas medicinales y alimentos ricos en flavonoides en relación a la prevención de enfermedades cardiovasculares y su seguridad.

Los antioxidantes de la dieta juegan un papel importante en la defensa frente al envejecimiento (Schmitt-Schilling et al, 2005) y frente a las enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, el cáncer y la enfermedad cardiovascular. Sin embargo, los resultados obtenidos con estas sustancias (Vitamina C y vitamina E) en los diferentes estudios de intervención han sido controvertidos (Cuerda et al, 2011; Cruz et al, 2011) en relación a los resultados positivos observados en estudios sobre marcadores de estrés oxidativo en modelos animales (Jain et al, 2009).

Por otro lado los flavonoides son los más comunes y ampliamente distribuidos compuestos fenólicos de las plantas, que ocurren virtualmente en todas sus partes, particularmente en las células fotosintetizantes. Los flavonoides son una parte integral de la dieta animal y humana, siendo los flavonoles los más abundantes en los alimentos. Los flavonoides en los alimentos son generalmente responsables del color, sabor, prevención de la oxidación de las grasas y protección de vitaminas y enzimas. (Kumar 2013).

En relación a enfermedades cardiovasculares se destaca que el consumo de polifenoles limita el desarrollo de lesiones ateromatosas, inhibiendo la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL colesterol) lo cual se considera un mecanismo clave en las lesiones que ocurren en la aterosclerosis, además previene la disfunción endotelial y vascular, disminuyendo el tono vascular y la expresión de genes y crecimiento celular relacionados a un ambiente proinflamatorio y protrombótico (Grassi, 2010). También se ha analizado la potencial utilidad de los flavonoides en la prevención de las cataratas (Steepek, 2011).

En relación a la seguridad de los flavonoides, Kiselova (2011), manifiesta que el uso de medicinas tradicionales, principalmente derivados de plantas (suplementos dietéticos basados en compuestos fenólicos) para el manejo de varias enfermedades de estilo de vida es una práctica común, muchos pacientes demandan cada vez más la sustitución de los medicamentos recetados por seguros, a menudo con alternativas naturales menos costosas. Observa que existe un modo dual de acción potencial de los compuestos fenólicos, es decir que sus acciones pueden variar de acuerdo a la dosis o las

condiciones experimentales, lo cual puede significar riesgos potenciales si se usan en dosis elevadas. Los posibles impactos perjudiciales de la utilización de compuestos fenólicos se relacionan con: 1) actividades pro-oxidantes, 2) actividades estrogénicas, 3) actividades cancerígenas, citotóxicas, 4) actividades inductoras de apoptosis y 5) riesgo de interacciones medicamentosas.

2.3.4 Potenciadores herbarios.

Un biopotenciador es un agente que no posee por sí mismo actividad farmacológica inherente propia, pero cuando se coadministra con el fármaco, aumenta su biodisponibilidad y eficacia. Fue descrita por primera vez por Bose en 1929 que informó el aumento del potencial antiasmático de las hojas vasaka (*Adhatoda vasica*), combinando la pimienta larga con ella. El concepto de "potenciadores de la biodisponibilidad" de origen natural se ha obtenido del conocimiento antiguo del sistema de medicina ayurvédica. (Dudhatra et al, 2012; Ajazuddin et al, 2014)

"Trikatu" es una de las preparaciones ayurvédicas usadas entre el 7mo siglo antes de Cristo y el siglo VI después de Cristo para el tratamiento de una variedad de dolencias. Es una combinación de pimienta negra (*Piper nigrum* Linn.), pimienta larga (*Piper longum* Linn.) y jengibre (*Zingiber officinale* Rosc.), que contiene el componente activo piperina, que aumenta la biodisponibilidad de drogas, nutrientes. Varios fármacos debido a su baja lipofilicidad o carácter zwitteriónico a pH fisiológico, o debido a la hidrofilia pobre o eflujo por glicoproteína P, son incapaces de cruzar las membranas biológicas. (Dudhatra et al, 2012; Ajazuddin et al, 2014)

Por lo tanto, el uso de biopotenciadores naturales ha ganado importancia en el escenario actual para mejorar los parámetros farmacocinéticos y por tanto, la biodisponibilidad y eficacia de varios medicamentos potentes. (Dudhatra et al, 2012; Ajazuddin et al, 2014)

2.3.4.1 Mecanismos de acción.

Los diferentes mecanismos por los cuales actúan los biopotenciadores naturales son:

- a) Disminución de la secreción de ácido clorhídrico y aumento del suministro de sangre gastrointestinal,
- b) Dificultan el tránsito gastrointestinal, el tiempo de vaciado gástrico y la motilidad intestinal,
- c) Modificaciones en la permeabilidad de la membrana celular del epitelio gastrointestinal.
- d) Efecto colagogo.
- e) Propiedades bioenergéticas y termogénicas y
- f) Supresión del metabolismo de primer paso e inhibición de enzimas metabolizadoras de fármacos y estimulación de la actividad de la enzima gamma glutamil transpeptidasa (GGT) enzima que potencia la captación de aminoácidos. (Dudhatra et al, 2012; Ajazuddin et al, 2014)

Estos mecanismos pueden reducir la dosis de fármaco, acortar la duración del tratamiento, reducir los problemas de resistencia a los fármacos, minimizar la toxicidad de los fármacos y las reacciones adversas y reducir el coste de los medicamentos. Los diversos agentes que poseen la capacidad de aumentar la biodisponibilidad del Ingrediente farmacéutico activo (IFA) son piperina (principal alcaloide vegetal presente en *Piper nigrum* Linn (pimienta negra) y *Piper longum* Linn (pimienta larga), quercetina, naringina (principal glucósido flavonoide que se encuentra en el pomelo, las manzanas, las cebollas y el té), glicirrizina (un glucósido obtenido a partir de raíces y estolón de Regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), jengibre (*Z. officinale*) es un rizoma que contiene potentes componentes activos conocidos como gingeroles), capsaicina (componente activo de los chiles *Capsicum annuum*), genisteína (Isoflavona que se encuentra en una serie de plantas dietéticas como la soja (*Glycine max*) y el kudzu (*Pueraria lobata*), niaziridina (glicósido de *Moringa oleífera*), curcumina, un polifenol de *Cúrcuma Longa* "palillo"; sinomenina, un alcaloide obtenido de *Sinomenium acutum*. (Dudhatra et al, 2012; Ajazuddin et al, 2014) (Figura 9).

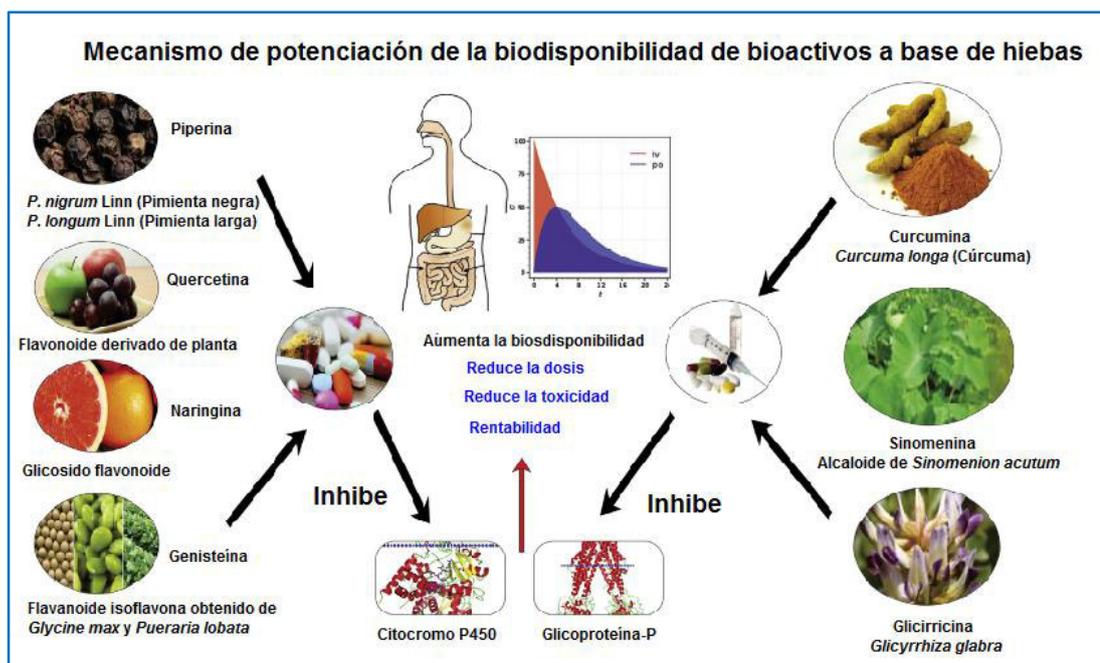


Figura 9. Mecanismo de mejora de la biodisponibilidad de diferentes bioactivos naturales. (Adaptado de Ajazuddin et al, 2014).

La quercetina, en pruebas preclínicas ha demostrado mejorar la biodisponibilidad de paclitaxel (antineoplásico), verapamilo (antianginoso), diltiazem (antianginoso), tamoxifeno (antineoplásico antiestrógeno), fexofenadina (antihistamínico H1), etopósido (antineoplásico), epigallocatequina galato (flavonol mayoritario del extracto del té verde), doxorubicina, un antineoplásico y pioglitazona, un antidiabético. (Dudhatra et al, 2012; Ajazuddin et al, 2014)

CAPITULO 3: METODOLOGÍA.

3.1 Materiales.

3.1.1 Material biológico.

Hojas de *Luma chequen* (Molina.) A. Gray “rayan castilla”. La planta fue recolectada en la comunidad de Gueushaj, Pomabamba, Ancash (2,948 msnm). La identificación taxonómica fue realizada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Dicha ubicación sistemática fue ratificada mediante constancia N° 040-USM-2007 (anexo 1) siendo determinada por el Mg. Hamilton Beltrán.

Se empleó ratas albinas hembras (220 ± 10 g) y machos (320 ± 20 g) cepa Holtzman (*Rattus norvegicus*) procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud del Ministerio de Salud; con agua y comida a libertad; luz/oscuridad de 12 h.

3.1.2. Reactivos:

- Aceite de oliva extra virgen. El olivar
- Colesterol al 97% Sigma
- Etanol absoluto Sigma
- Glucosa anhidra Sigma.
- Estreptozocina Sigma.
- Atorvastatina 20 mg/comp (Lab. AC Farma).
- Glibenclamida 5 mg/comp (Lab. Marfan).
- Reactivos necesarios para el screening fitoquímico y para realizar el fraccionamiento del extracto etanólico.

3.1.3. Equipos de laboratorio.

Percolador, embudo de decantación, columna cromatográfica de vidrio, evaporador rotatorio (HEIDOLPH LABORATORA 4000).

3.2 Identificación de los metabolitos secundarios.

3.2.1 Obtención del extracto etanólico por percolación. (Suñe, 1993)

El secado de la planta se realizó en un ambiente con buena ventilación y acondicionado para evitar el ingreso de insectos y aves, el material vegetal fue puesto sobre una malla a unos 40 cm. del nivel del suelo, removiendo tres veces al día por un periodo de 15 días. Posteriormente solamente las hojas se separaron y se trozaron de forma manual y conservaron en frascos de vidrios herméticos de color ámbar.

Se colocó 1 Kg. de hojas secas pulverizadas en un recipiente, humectando con una cantidad apropiada de menstruo (etanol 96%) y se dejó reposar por espacio de 4 horas en un recipiente cerrado. Después de lo cual se colocó ésta en el percolador adicionándole suficiente menstruo para saturar la masa, se cerró herméticamente y se dejó macerar la muestra durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a percolar a goteo lento añadiendo suficiente menstruo y percolando hasta agotamiento. El extracto fue concentrado hasta evaporar el disolvente en un evaporador rotatorio a una temperatura no mayor de 40°C; una parte se reservó para el estudio fitoquímico y la otra para el estudio farmacológico y toxicológico.

3.2.2 Screening fitoquímico.

Se realizó para detectar los metabolitos secundarios, mediante una marcha fitoquímica basándose en la extracción por solventes de diferente polaridad, según figura 10. Separadas las fracciones se procedió a realizar las reacciones de coloración y precipitación para identificar flavonoides, grupos fenólicos libres, taninos, triterpenos y esteroides, leucoantocianidinas y catequinas, naftoquinonas y/o antraquinonas, alcaloides, saponinas y aminoácidos. (Lock, 1994; Domínguez, 1985)

3.2.3 Fraccionamiento del extracto etanólico.

El extracto etanólico seco (95 g) se sometió a una partición con una mezcla de diclorometano:agua (1:1) y se procedió a extraer con porciones de diclorometano hasta agotamiento, obteniéndose el extracto de diclorometano. (Figura 11).

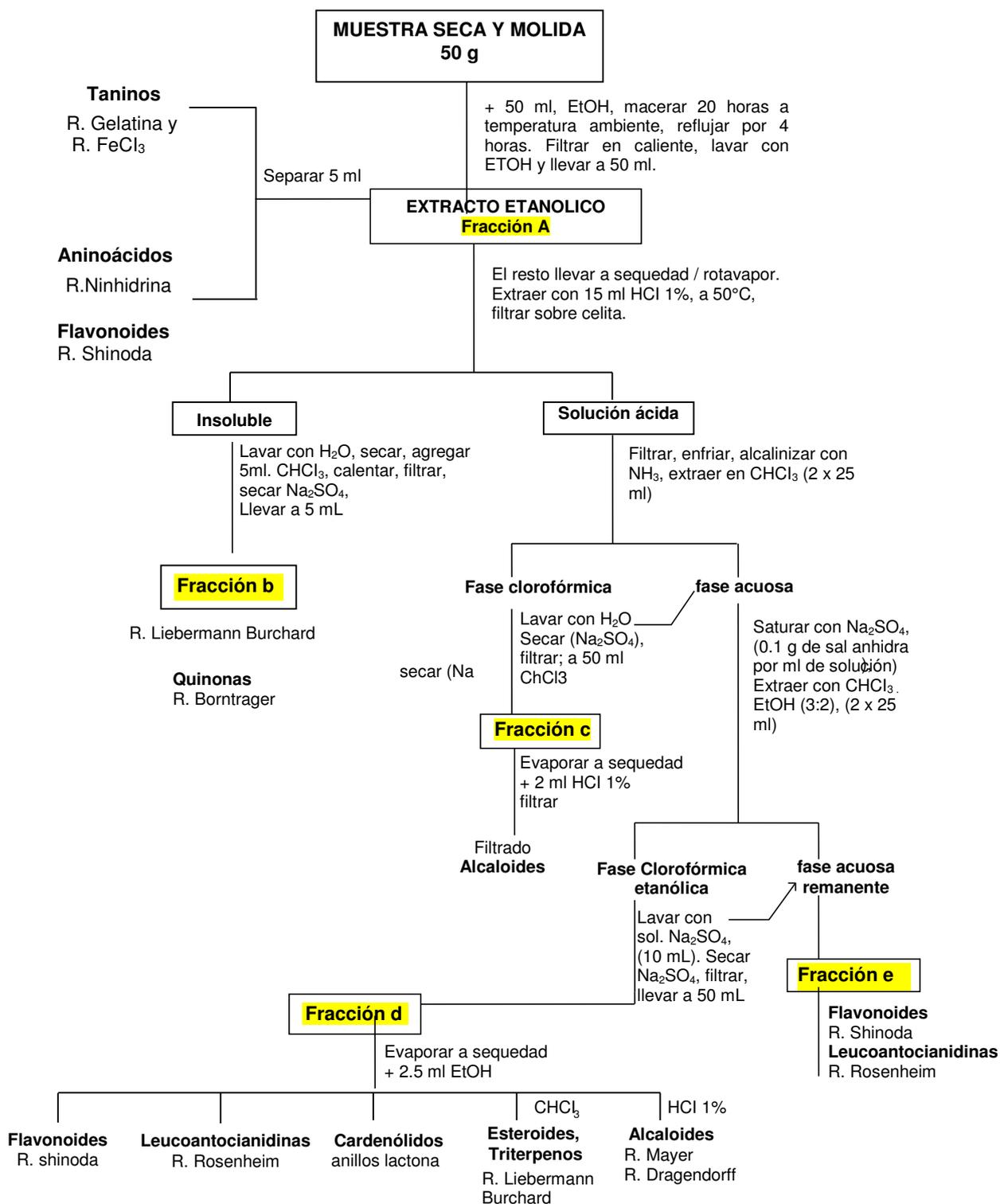


Figura 10. Screening fitoquímico en hojas de Luma chequen.

Seguidamente se procedió a extraer la fase acuosa remanente con acetato de etilo, esto constituye el extracto de acetato de etilo y finalmente se obtiene un residuo acuoso, los extractos obtenidos se llevaron a sequedad y se realizaron

en ellos ensayos de coloración y/o precipitación para identificar los metabolitos secundarios presentes.

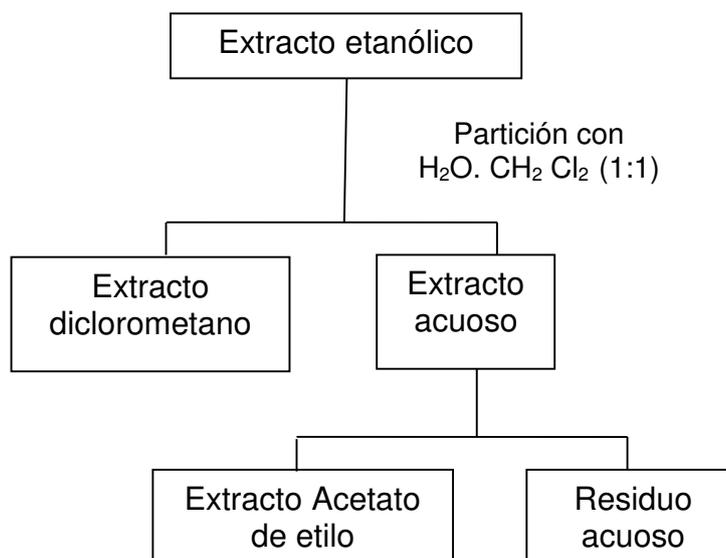


Figura 11. Fraccionamiento del extracto etanólico.

3.2.4 Aislamiento de metabolitos secundarios.

3.2.4.1 Técnicas cromatográficas empleadas.

- **Cromatografía en capa fina (CCF).**

Las cromatografías en capa fina se realizaron sobre cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo G, de 0.25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de las empresas Schleicher & Schuell, F 1500/LS 254 y Panreac 60-250 UV₂₅₄. Las placas se revelaron con óleum (disolución de H₂SO₄ 4%, CH₃COOH 80%, H₂O 16%) y posterior calentamiento a 120 °C.

- **Cromatografía preparativa en capa fina (CCFP)**

Se utilizaron placas (20 x 20 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador fluorescencia a 254 nm, de las empresas Schleicher & Schuell G 1510/LS 254, Merck Silica gel 60 f₂₅₄ y Macherey-Nagel SIL G-100 UV₂₅₄. La cantidad de muestra a sembrar en estas placas es de unos 40 mg, usándose para la elusión diferentes tipos de mezclas de disolventes. La detección de los productos sobre las placas se realizaron por fluorescencia

con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o pulverizando óleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio, y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

- ***Cromatografía en columna***

En la realización de columnas cromatográficas (secas, húmedas) se emplea gel de sílice fina, de 0.063 – 0.200 nm de diámetro, de la empresa Merck. En este caso se empleó el método de columnas húmedas, las cuales se montaron vertiendo el gel suspendido en un disolvente, con posterior compactación por presión, la mezcla a resolver se coloca, como cabeza de columna, adsorbida en gel de sílice gruesa, de 0.2 – 0.5 nm de diámetro, de la empresa Merck. Las columnas que usan como soporte Sephadex LH – 20, que suministra la empresa Pharmacia Fine Chemicals, requieren una previa estabilización del polímero en suspensión con metanol (4.1 ml/gr) durante, al menos, doce horas; luego se vierte en la columna y se deja reposar durante una hora, aproximadamente. Esta columna se estabiliza, posteriormente en la disolución que se va a usar como eluyente, para lo cual se eluye tres veces la cantidad correspondiente el volumen muerto. El eluyente utilizado fue n-hexano – cloroformo – metanol (2:1:1). La muestra a cromatografiar se coloca en la cabeza de la columna disuelta en una cantidad de eluyente no superior al 5 % del volumen muerto de la columna.

3.2.4.2 Tratamiento del extracto de acetato de etilo (12 g).

El extracto de acetato de etilo que dio positiva la reacción de Shinoda, se fraccionó cromatográficamente por columna utilizando Sephadex LH- 20 como medio adsorbente, y como eluyente se utilizó una mezcla de metanol:n-hexano:diclorometano (2:1:1), se obtuvieron 48 fracciones las cuales se analizaron y compararon por cromatografía en capa fina, lo que permitió agruparlas en 5 fracciones: A, B, C, D y E. Según se puede apreciar en la figura 12.

Tratamiento de la fracción B.

Por ser la fracción que presentó mayor actividad hipocolesterolémica en un estudio piloto, fue nuevamente cromatografiada en columna utilizando Sephadex LH-20. Para aislar el o los metabolitos responsables de la actividad.

Se obtuvieron 20 fracciones, que se agruparon de la siguiente manera B₁, B₂, B₃, B₄ y B₅. De las fracciones B₁ y B₂, se obtuvo un pp de color amarillo que dio positiva la reacción de Shinoda y al que denominamos HTM₁.

Los productos de las fracciones B₃, B₄, B₅ fueron aislados por cromatografía de capa fina preparativa, obteniéndose otros compuestos con estructura flavonoide a los que denominamos HTM₂, HTM₃.

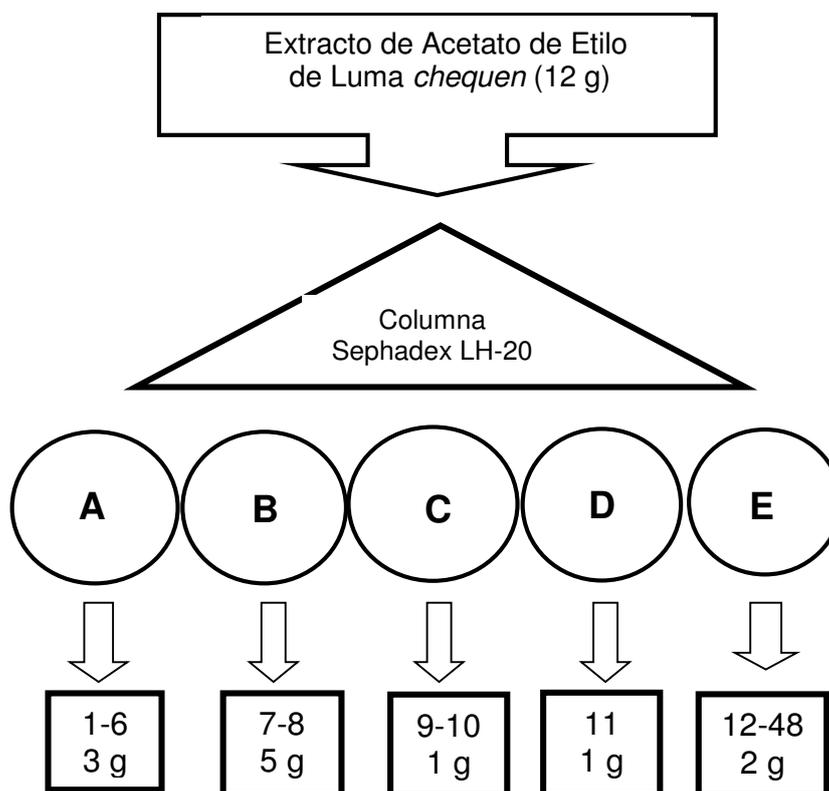


Figura 12. Fraccionamiento cromatográfico del extracto acetato de etilo de *Luma chequen*.

3.2.4.3 Elucidación estructural.

Para la elucidación estructural de los metabolitos secundarios se empleó Espectroscopia ultravioleta (UV).

Los espectros de ultravioleta se efectúan con el producto disuelto en metanol en una celda de cuarzo de 1 ml de volumen y con un paso de luz de 10 mm. Se utiliza el aparato Jasco V-560. Los valores de la longitud de onda de absorción (λ) de la muestra se expresan en nm.

Se tomaron los espectros UV, en metanol de los compuestos HTM₁, HTM₂, HTM₃, así mismo fueron comparados con muestras patrones de flavonoides, aislados anteriormente en el laboratorio.

3.3 Métodos de estudio toxicológico y farmacológico.

Los experimentos fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones sobre principios rectores internacionales para la investigación biomédica con animales (CIOM – ICLAS, 2012). El extracto etanólico fue disuelto en aceite de oliva extra virgen para su administración, debido a su poca solubilidad en vehículos usados normalmente. (Vinayagam et al, 2012).

3.3.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral del extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen*.

Tuvo como propósito estimar la dosis letal media y a partir de allí establecer las dosis a ensayar respetando un Índice Terapéutico (IT) cercano a 10 (Osterhoudt K, 2012). Se realizó de acuerdo al principio de la prueba límite a 2000 mg/Kg por vía oral para sustancias con baja toxicidad de la directriz N° 425 (2008) de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, 2008). Se realizó en 10 ratas cepa Holtzman, hembras nulíparas y no gestantes de 200 a 240 g de peso. Cinco de las cuales recibieron el extracto y 5 recibieron solo el vehículo (grupo control). Los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche antes del experimento y bajo condiciones estándar. Se procedió a administrar el extracto a la dosis mencionada en un volumen de 1 ml/100 g. en forma secuencial cada 24 horas. Se observó a los animales para detectar cambios en el peso corporal (inicio, 7 y 14 días), y la mortalidad por un período de 14 días después del tratamiento. Se controló y observó los cambios de comportamiento las modificaciones del pelo y la piel, ojos y membranas mucosas, del aparato respiratorio, circulatorio, el sistema nervioso autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. La atención se dirigió a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Al término se sacrificó a los animales con sobredosis de pentobarbital sódico (80 mg/Kg) y se realizó la necropsia para el análisis macroscópico e histológico de aorta, corazón, hígado y riñón. En la

prueba con cinco animales la DL₅₀ es mayor que la dosis de prueba (2000 mg/kg) cuando tres o más animales sobreviven.

3.3.2 Determinación del efecto hipoglicemiante.

3.3.2.1 Determinación del efecto hipoglicemiante del extracto en dosis única en ratas normoglicémicas.

Se realizó, siguiendo la técnica de Pérez et al, 2011 y Gupta et al, 2005 modificada en 15 ratas divididas en forma aleatoria en 3 grupos de 5 ratas cada uno. El grupo 1 (control, recibió aceite de oliva 0,5 mL, vía oral), los grupos 2 y 3 (tratados) recibieron el extracto a dosis de 200 y 400 mg/kg, vía oral, respectivamente. A las ratas en ayunas de 18 horas con acceso libre al agua, se les determinó la glucosa sanguínea basal en una gota de sangre obtenida de la cola, mediante un glucómetro Acutrend plus Roche (Muñoz et al 2013). Enseguida se les administró a cada grupo, el disolvente, y el extracto a las dosis mencionadas mediante sonda intragástrica. Luego se controló la glucosa sanguínea a los 30, 60 y 120 min. Posteriormente se determinó el porcentaje de variación de la glucemia en el tiempo. Según fórmula:

$$\% \text{ Variación} = \frac{Gt - Go}{Go} \times 100$$

Donde Go es la glucemia inicial (mg/dl) y Gt la glucemia (mg/dl) a diferentes intervalos de tiempo.

3.3.2.2 Tolerancia a la glucosa en ratas normoglicémicas.

Se realizó, siguiendo la técnica de Pérez et al, 2011 y Gupta et al, 2005 modificada. Se realizó en 15 ratas, divididas en forma aleatoria en 3 grupos de 5 ratas cada uno. El grupo 1 (control, recibió aceite de oliva 0,5 mL, vía oral), el grupo 2 (tratado) recibió el extracto 400 mg/Kg, vía oral, administrado en dosis única), el grupo 3 (tratado) recibió el extracto 400 mg/Kg, vía oral, administrado crónicamente 1 vez al día por 7 días. A las ratas en ayunas de 18 horas, se les determinó la glucosa sanguínea basal en una gota de sangre obtenida de la cola, mediante un glucómetro Acutrend plus Roche (Muñoz et al 2013), luego se les administró a cada grupo, el disolvente o el extracto respectivamente por vía oral mediante sonda intragástrica. Luego de 30

minutos se les administró glucosa 2 g/Kg por vía intraperitoneal (IP). Se les controló la glucosa sanguínea a los 30, 60 y 120 minutos. Se calculó el porcentaje de glucemia inducida (% IG) después de la carga de glucosa en los intervalos de tiempo para el control y grupos tratados de la siguiente manera:

$$\% \text{ IG} = \frac{\text{Gt} - \text{Go}}{\text{Go}} \times 100$$

Donde Go es la glucemia inicial (mg/dl) y Gt la glucemia (mg/dl) a diferentes intervalos de tiempo después de la carga de glucosa oral.

3.3.2.3 Evaluación del efecto hipoglicemiante en ratas diabéticas por estreptozocina (STZ)

El propósito fue evaluar si la administración crónica del extracto atenúa la hiperglicemia relacionado al daño oxidativo de la STZ provocado a las células beta pancreáticas (King, 2012; Szkudelski, 2001). Se procedió, siguiendo la técnica de Pérez et al, 2011 y Gupta et al, 2005 modificada. Se indujo la diabetes en las ratas por administración en dosis única de STZ (45 mg/Kg) vía IP, recién preparada en tampón de citrato pH 4,5; 0,1 M. Se realizó en 15 ratas, divididas en forma aleatoria en 3 grupos de 5 ratas cada uno, siguiendo el siguiente diseño: El grupo 1 (control): STZ mas aceite de oliva, grupo 2 (tratado): STZ mas extracto 400 mg/Kg, grupo 3 (estándar) STZ más glibenclamida 5 mg/Kg (Singh et al, 2007). El disolvente, el extracto y el fármaco estándar se administraron durante 14 días, controlándose la glucosa sanguínea y el peso de las ratas antes del experimento, a los 7 y 14 días. Se calculó el porcentaje de glucemia inducida (% IG) después de la administración de STZ en los intervalos de tiempo para el control y grupos tratados de la siguiente manera:

$$\% \text{ IG} = \frac{\text{Gt} - \text{Go}}{\text{Go}} \times 100$$

Donde Go es la glucemia inicial (mg/dl) y Gt la glucemia (mg/dl) a diferentes intervalos de tiempo después de la carga de glucosa oral.

3.3.3 Evaluación del efecto hipolipemiante y antiaterogénico en ratas dislipidémicas por suplemento de colesterol.

El propósito fue evaluar si la administración continua del extracto atenúa la dislipidemia y aterogenicidad inducida por la administración crónica de colesterol en ratas (200 mg/Kg) por vía oral durante 30 días (Hirunpanich et al, 2006) modificada. Se realizó en 25 ratas, divididas en forma aleatoria en 5 grupos de 5 ratas cada uno, siguiendo el siguiente diseño: grupo 1 (blanco): aceite de oliva; grupo 2 (control): colesterol más aceite de oliva; grupo 3 (tratado): colesterol más extracto 400 mg/Kg; grupo 4 (tratado): colesterol más extracto, más atorvastatina 10 mg/Kg (Zarei et al, 2014); grupo 5 (estándar): colesterol más atorvastatina 10 mg/Kg. Al final del experimento se extrajeron las muestras de sangre por punción intracardiaca determinándose los niveles de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, colesterol VLDL y triglicéridos. El peso corporal de las ratas fue evaluado antes y al final del experimento. Se calculó los porcentajes de variación de los parámetros evaluados para su análisis respectivo. Adicionalmente, se realizó estudios en cortes histológicos de arteria aorta, cerebro, hígado y riñón en el Instituto de Patología – Sede Hospital Loayza, analizados por el Dr. Ernesto Raéz, para observar los efectos del extracto etanólico de *Luma chequen* sobre estos tejidos, principalmente el posible efecto antiaterogénico.

3.3.4 Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos en este estudio se expresaron en valores promedios y sus desviaciones estándar, efectuándose además pruebas inferenciales intragrupos y entre grupos, paramétricas y no paramétricas. Se trabajó con un nivel de significación de 0,05; considerándose significativo un $p < 0,05$. El análisis de los resultados se realizó usando los programas Stata for Windows (versión 12,0) y Graph Pad Prism for Windows (versión 6,05).

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Presentación de resultados.

4.1.1 Del estudio fitoquímico.

Tabla 1. Metabolitos secundarios identificados en el screening fitoquímico.

REACCIÓN	FRACCIÓN	RESULTADO
Shinoda	A	+
Flavonoides	D	+
	E	+
Tricloruro Férrico	A	+
Grupos Fenólicos Libres		
Gelatina	A	+
Taninos		
Lieberman Burchard	B	+
Triterpenos y Esteroides	C	+
	D	-
Rosenheim	E	+
Leucoantocianidinas y Catequinas	D	-
Borntrager	B	-
Naftoquinonas y/o Antraquinonas		
Dragendorff, Mayer, Wagner	C D	--
Alcaloides	C D	--
	C D	--
Espuma		
Saponinas	F	-
Grignard	Droga Cruda	-
Glicósidos Cianogénéticos		
Ninhidrina		
Aminoácidos	A	-

Fuente: Datos tomados de la investigación

Donde (-) = ausente; (+) = presente

Tabla 2. Resultado de las reacciones de coloración efectuadas sobre los extractos de *Luma Chequen*.

	EXTRACTOS		
	Diclorometano	Acetato de Etilo	Residuo Acuoso
FeCl ₃	-	+	+
Shinoda	-	+	+
Taninos	-	+	+
Lieberman-Burchard	+	-	+

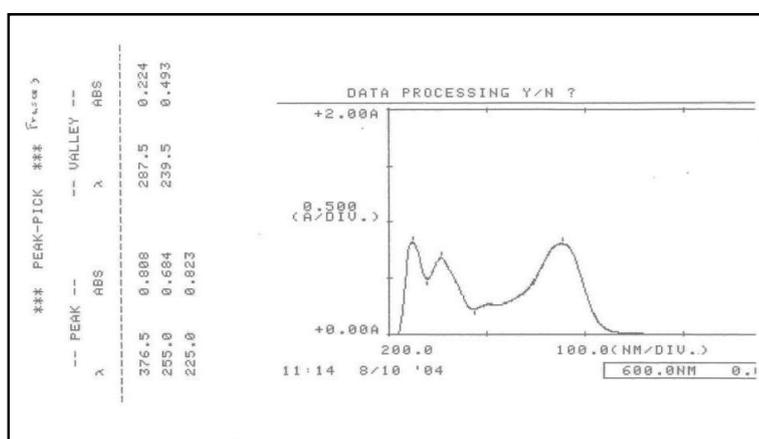
Fuente: Datos tomados de la investigación.

Donde (-) = ausente; (+) = presente

Elucidación estructural de compuesto HTM₁

El compuesto HTM₁ fue de una de las fracciones, aislado como un sólido de color amarillo, soluble en MeOH, dio positiva la reacción de Shinoda color rojo intenso, indicativo de un compuesto de tipo flavona o flavonol confirmado por la intensificación del color amarillo por exposición del cromatograma a vapores de amoníaco. Los espectros UV del compuesto en MeOH (Figura 13) muestran los siguientes valores: λ_{max}^{nm} 255, asociado BI, 287, 376 asociados BII, por la presencia de un OH libre en carbono 3. HTM₁ fue cromatografiado con una muestra patrón del flavonoide quercetina en diferentes sistemas de solventes CHCl₃:MeOH (8:2), EtOAc:MeOH (9:1), (CHCl₃:Me₂CO:HCO₂H (9:2:1), obteniéndose el mismo R_f.

Se propone que la estructura de HTM₁ corresponde al flavonoide Quercetina.



Quercetina

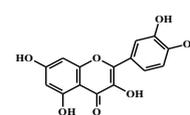


Figura 13. Espectro ultravioleta del compuesto HTM₁.

Elucidación estructural compuesto HTM₂

El compuesto HTM₂ fue aislado como un sólido de color amarillo verdoso, soluble en MeOH y en soluciones acuosas alcalinas, debido a la coloración púrpura que presentó el compuesto en CCF a la luz UV/366 nm y al color rojo intenso que dio a la prueba de Shinoda, se pensó en un compuesto flavonoide de tipo flavonol 3-OH sustituido por los resultados obtenidos de su espectro UV en MeOH (Figura 10) λ_{max}^{nm} 256, asociado BI, 314, 364.5 asociado BII, por la presencia de un OH sustituido en carbono 3. (Figura 14)

Se propone que la estructura de HTM₂ corresponde al flavonoide rutina.

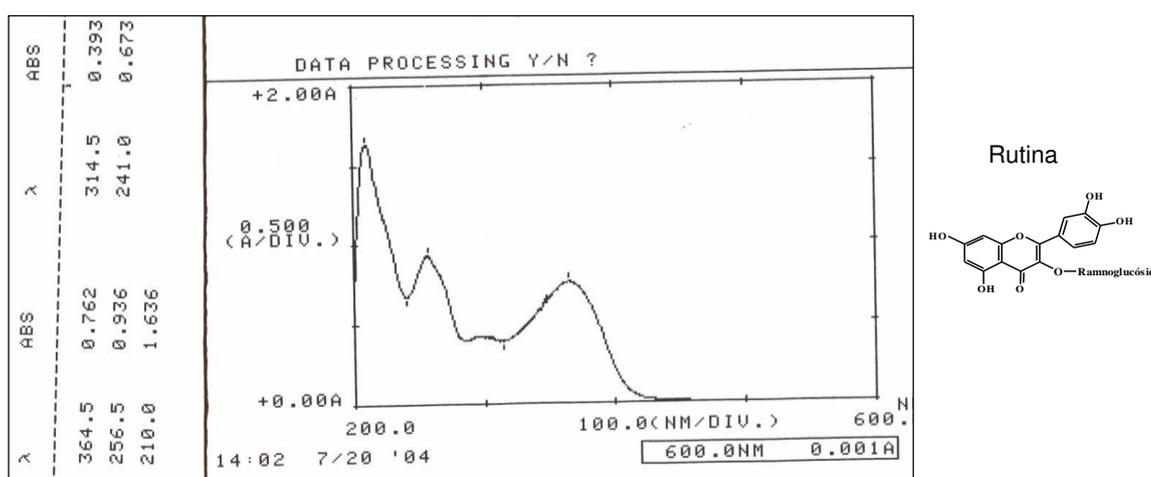


Figura 14. Espectro UV del flavonoide HTM₂.

Elucidación estructural compuesto HTM₃.

Se presentó como un sólido de color amarillo, soluble en cloroformo etanol y metanol, dio positiva la reacción de shinoda, fue cromatografiado comparativamente con HTM₁ y HTM₂, dando un R_f distinto, los desplazamientos de su espectro UV, fueron comparados con los de otros flavonoides, observándose valores similares para el quercetin 3-metil- eter, comparado cromatograficamente con una muestra patrón de este flavonoide, resultó con el mismo R_f, por lo que se propone que la estructura de HTM₃ corresponde al quercetin 3- metil-éter. (Figura 15).

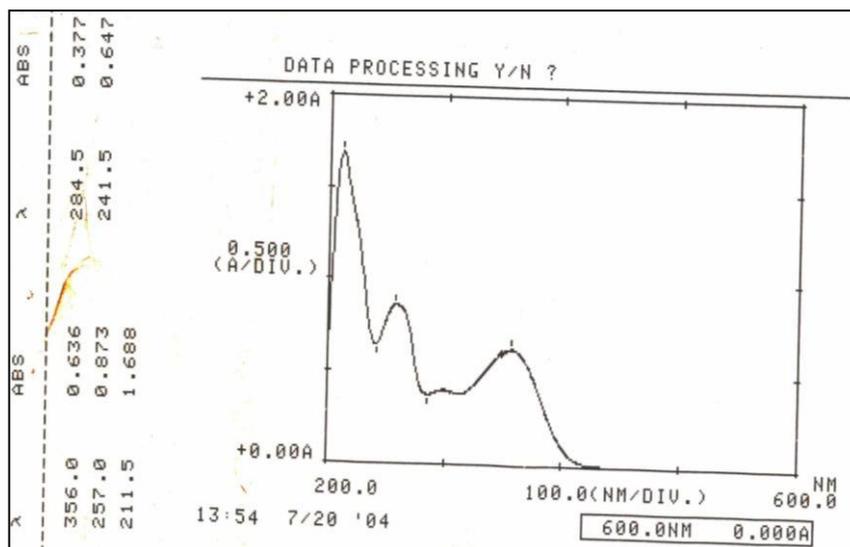
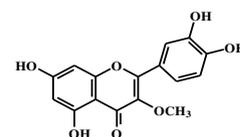


Figura 15. Espectro UV del flavonoide HTM3

Quercetin- 3- metil eter



4.1.2 Del estudio toxicológico y farmacológico.

4.1.2.1 Toxicidad aguda por vía oral dosis límite 2000 mg/Kg.

No se observó mortalidad, las ratas manifestaron ligera sedación (ataxia) de aproximadamente 1 hora de duración. No se evidenció presencia de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, sueño y coma. En el examen macroscópico de los principales órganos no se observó cambios significativos. El resultado histológico referencia: corazón y aorta (sin alteraciones significativas); riñón (probablemente tóxico); hígado (probablemente toxico).

Tabla 3. Efecto del extracto de *Luma Chequen* sobre el peso corporal en el estudio de toxicidad aguda por vía oral en ratas hembras.

	Peso corporal (g ± DE)		
	Basal	7 días	14 días
Grupo control	221 ± 10.68	237 ± 11.50	249 ± 11.2
Grupo tratado	223.2 ± 8.09	238.8 ± 8.66	256 ± 5.96

Fuente: Datos tomados de la investigación. No existe variación significativa en la evolución de los pesos de las ratas de los grupos control y tratado (2000 mg/Kg).

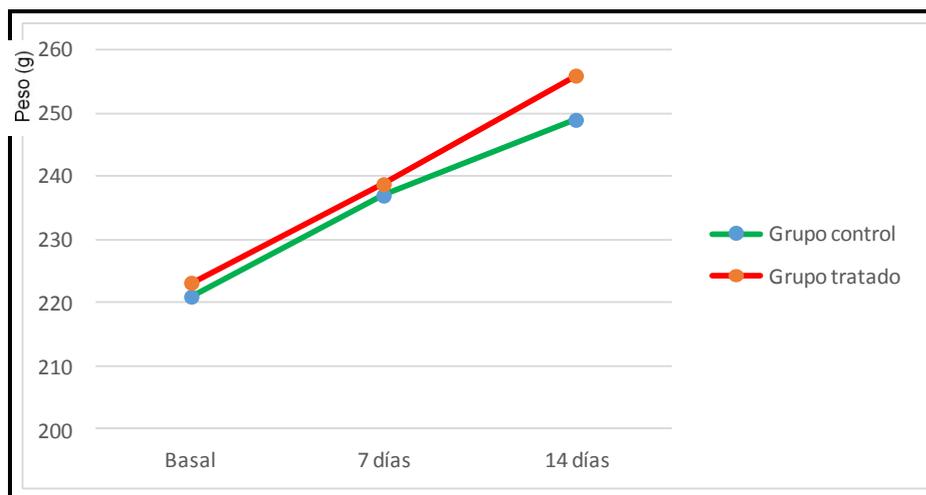


Figura 16. Efecto del extracto de *Luma Chequen* sobre el peso corporal en el estudio de toxicidad aguda por vía oral en ratas. Se observa que no hay diferencia significativa en las curvas de crecimiento entre el grupo tratado y control, lo que indicaría que la administración del extracto a dosis de 2000 mg/Kg no tendría un efecto toxico agudo apreciable.

Tabla 4. Efecto del extracto de *Luma Chequen* administrado en dosis única sobre la glucemia en ratas normoglucémicas.

Grupo Experimental	Glucemia mg/dL			
	Basal	0.5 h	1 h	2 h
Control	99.6 ± 2.65	95.2 ± 4.66	94.6 ± 2.94	93.2 ± 3.96
Extracto 200 mg/Kg	101 ± 3.19	100 ± 10.51	102 ± 14.71	97 ± 8.69
Extracto 400 mg/Kg*	101.4 ± 5.99	83.2 ± 4.53	85 ± 4.38	88.6 ± 6.11

Fuente: Datos tomados de la investigación. No hubo diferencias significativas en la glucemia con las dosis de extracto administradas, en los periodos de tiempo, en relación al grupo control.

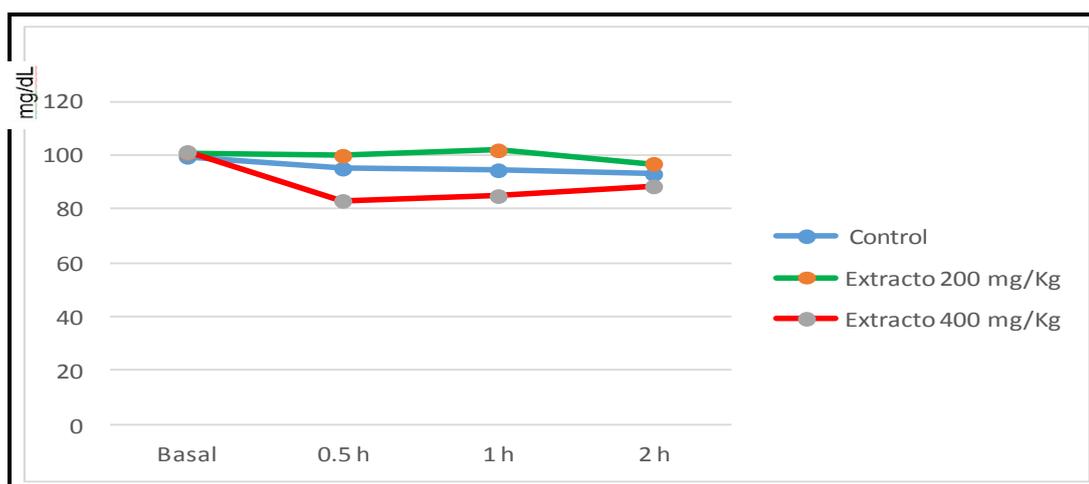


Figura 17. Efecto del extracto de *Luma Chequen* administrado en dosis única sobre la glucemia en ratas. Se observa una disminución de la glucemia hasta la hora con la dosis de 400 mg/Kg, pero estadísticamente no significativa.

Tabla 5. Efecto del extracto de *Luma Chequen* sobre la glucemia de ratas normoglicémicas en la prueba de tolerancia a la glucosa.

Grupo Experimental	Glucemia mg/dL ± DE			
	Basal	0.5 h	1 h	2 h
Control	89.4 ± 6.8	161.4 ± 18.89	135.4 ± 13.85	105.4 ± 12.27
Extracto 400 mg/Kg (dosis única)	85.25 ± 6.53	94.6 ± 8.38*	79.5 ± 3.64*	73.5 ± 8.08*
Extracto 400 mg/Kg x 7 días	88.45 ± 4.96	137.6 ± 5.00	104.4 ± 7.12	97 ± 9.27

* Posee Diferencia significativa con respecto al control Test de Dunn's ($p < 0,05$)

Fuente: Datos tomados de la investigación. Se observa que el extracto (400 mg/Kg) a dosis única atenúa significativamente el aumento de la glucemia en los periodos de tiempo, relacionados posiblemente a las acciones de los compuestos bioactivos identificados. Disminuyó el porcentaje de glucemia inducida 12.35% (0,5 h), -7.04% (1 h) y -13.8% (2 h) con $p < 0,05$, en comparación al grupo control (anexo)

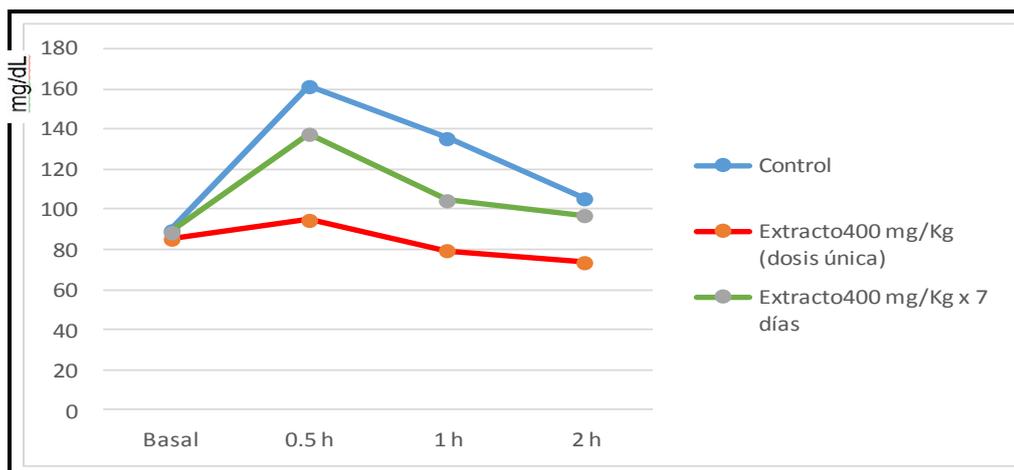


Figura 18. Efecto del extracto de *Luma Chequen* sobre la glucemia de ratas normoglicémicas en la prueba de tolerancia a la glucosa. Se observa que el extracto (400 mg/Kg) administrado en dosis única, inhibe de forma significativa la elevación de la glucemia en comparación al grupo control.

Tabla 6. Efecto del extracto de *Luma Chequen* sobre la glucemia de animales hiperglicémicos por estreptozocina.

Grupo Experimental	Glucemia mg/dL \pm DE			Variación (%) a los 14 días
	Basal	7 días	14 días	
Control (STZ)	97.3 \pm 1.7	326.8 \pm 19.85	380 \pm 18.89	+ 290.54
Tratado ((STZ + extracto 400 mg/Kg)	95.8 \pm 5.64	266 \pm 20.83*	291.8 \pm 12.29*	+ 203.75
Estándar (STZ + Glibencla. 5 mg/Kg)	98.6 \pm 5.31	337.4 \pm 27.69	398.6 \pm 54.60	+ 304.26

*Existe diferencia significativa con respecto al control Test de Dunn's ($p < 0,05$)

Fuente: Datos tomados de la investigación. Se observa que el extracto (400 mg/Kg) disminuye la hiperglucemia ocasionada por estreptozocina, posiblemente relacionada a las acciones antioxidantes de los compuestos bioactivos identificados, lo cual impediría la destrucción de las células beta pancreática. Disminuyó el porcentaje de glucemia inducida por STZ (203,75%) en comparación al control (290,51%). ($p < 0,05$)

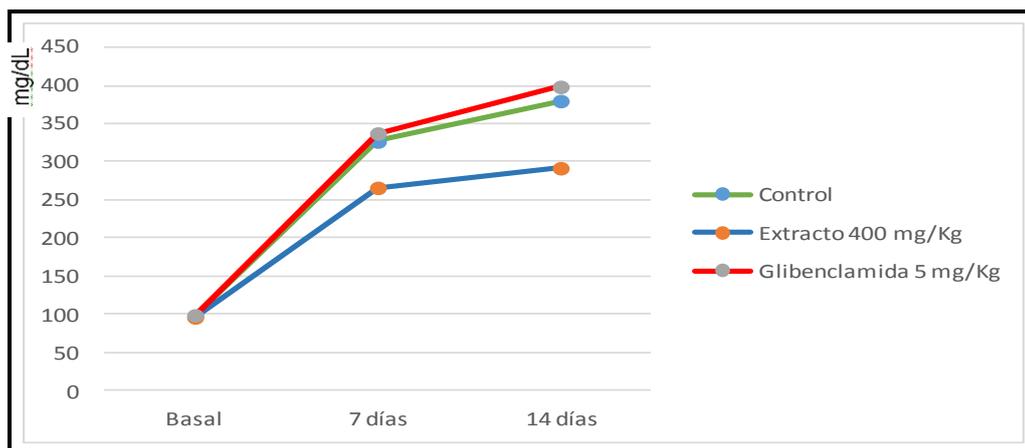


Figura 19. Efecto del extracto de *Luma Chequen* administrado sobre la glucemia de ratas hiperglicémicas por estreptozotocina. Se observa que el extracto (400 mg/Kg) atenúa de modo significativo la hiperglicemia causada por la STZ a los 7 y 14 días. Glibenclamide no ejerce influencia sobre la hiperglicemia, debido a que su mecanismo acción se relaciona al aumento de liberación de insulina por las células Beta pancreática.

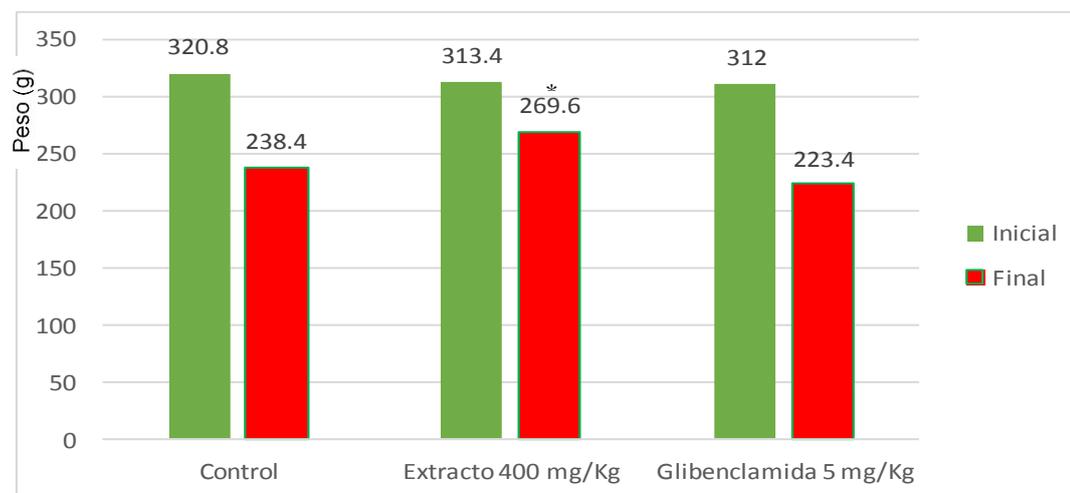


Figura 20. Efecto del extracto de *Luma Chequen* en la variación de peso corporal de las ratas hiperglicémicas por estreptozotocina. Se observa el extracto (400 mg/Kg) atenúa de modo significativo la pérdida de peso causada por la STZ a los 14 días. *Posee diferencia con respecto al control Test de Dunnet ($p < 0,05$). El efecto nocivo de STZ sobre las células beta, impide la liberación de insulina, lo cual produce hiperglicemia severa y saturación de transportadores a nivel tubular renal, con aparición de glucosa en orina, la cual induce gluconeogénesis (producción de glucosa a partir de grasa y proteínas). Fuente: Datos tomados de la investigación. (Tabla en anexo)

Tabla 7. Efecto hipolipemiante del extracto de *Luma Chequen* en ratas.

Grupo Experimental	Perfil Lipídico mg/dL Promedio \pm D.E.				
	Colesterol	Triglicéridos	HDL	LDL	VLDL
Aceite oliva extra vírgen (AOE)	121.7 \pm 1.53	87.67 \pm 12.01*	41 \pm 15.62	63.13 \pm 16.27	17.53 \pm 2.4*
Colesterol 200 mg (C) + AOE	144.3 \pm 18.50	127.7 \pm 13.87	35.67 \pm 3.01	83.13 \pm 19.43	25.53 \pm 2.77
C + Extracto 400 mg/kg	138.7 \pm 10.79	94.33 \pm 16.50*	41.67 \pm 9.02	78.13 \pm 17.33	18.87 \pm 3.3*
C + Ext + Atorvastatina 10 mg/kg	110 \pm 10.54	80.67 \pm 8.51*	35.67 \pm 4.16	58.2 \pm 12.52	16.13 \pm 1.7*
C + Atorvastatina 10 mg/kg	124.7 \pm 8.08	96.67 \pm 7.51	41.33 \pm 1.16	64 \pm 10.74	19.33 \pm 1.5

* Posee diferencia significativa con respecto a C + AOE ($p < 0,05$) Test de Tukey. Se observa que la administración del extracto (400 mg/Kg) disminuye en forma significativa de los niveles sanguíneos de triglicéridos y VLDL, además sinergiza el efecto de la atorvastatina (no significativa) sobre los mismos parámetros, que se relacionaría al efecto potenciador de la quercetina presente en el extracto. Disminuyó el nivel de triglicéridos y VLDL en 25.9% y 26,1% ($p < 0,05$) respectivamente. (Anexo)

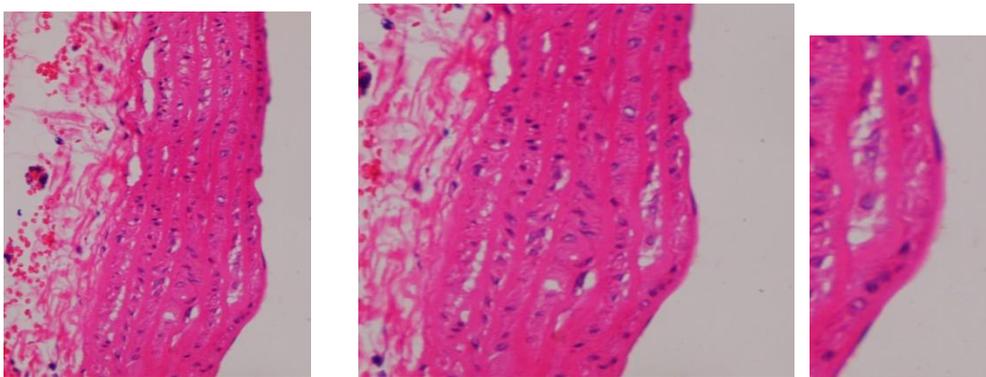


Figura 21. Corte histológico de aorta de rata suplementada con colesterol más aceite de oliva (vehículo). Esclerosis incipiente con presencia de macrófagos y depósitos de colesterol en la media.

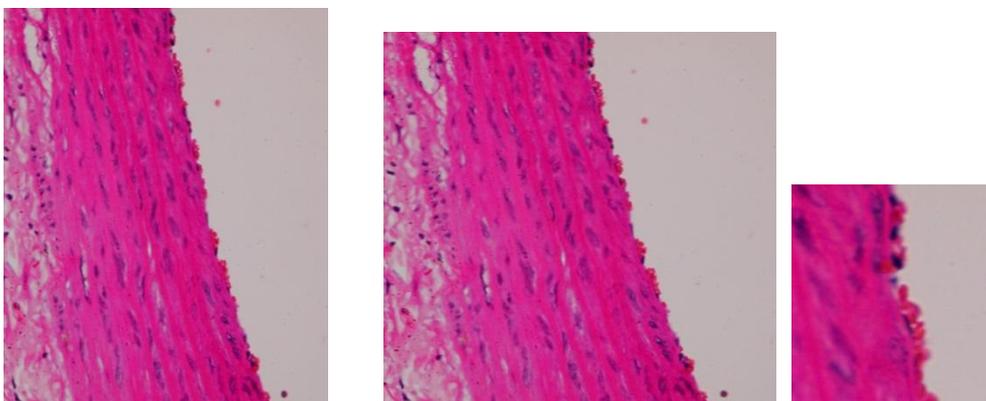


Figura 22. Corte histológico de aorta de rata suplementada con colesterol más extracto (vehículo aceite de oliva). Discreto engrosamiento de la íntima, sin alteraciones.

4.2 Discusión de resultados.

En esta investigación se comprobó en el extracto etanólico de hojas *Luma Chequen* la presencia de compuestos bioactivos (Ver tabla 1), resaltando los flavonoides, leucoantocinidinas y catequinas, taninos, triterpenoides y esteroides; además se identificó tres flavonoides: quercetina, rutina y quercetina 3-metil éter; relacionado parcialmente a los compuestos lumaflavanonas descrito por Labbé et al (2002); Simirgiotis et al (2013) describió en *L. chequen* 10 compuestos en las frutas y 16 en las partes aéreas (hojas y tallos), siete fueron identificados como taninos o sus monómeros, 15 fueron derivados de flavonoles y cinco antocianinas, comprobando en extractos de partes aéreas actividad antioxidante. Brito et al, 2014 estudió específicamente las bayas de *Luma chequen* confirmando la presencia antocianidinas (Delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina), ácidos fenólicos (ácidos feruloilquínico, ácido clorogénico y ácido neoclorogénico) y cinco flavonoles (hiperósido, isoquercitrina, quercetina, rutina, miricetina y isorhamnetina), confirmando la actividad antioxidante mediante los ensayos FRAP, DPPH y el ensayo de actividad de captación de anión superóxido (SA). El etanol utilizado para la obtención del extracto es posible que haya arrastrado parte del aceite esencial, en relación a la fragancia característica del extracto, pero también suma su propiedad antioxidante descrita para esta especie de la familia Mirtaceae (Carhuapoma, 2005). La reconocida actividad antioxidante de sus componentes planteó la investigación de la influencia de esta planta en enfermedades caracterizadas por su etiología y complicaciones relacionadas al estrés oxidativo como la diabetes, dislipidemia y aterosclerosis (Georgiev et al, 2014; Pitoco et al, 2010; Wu Yanling et al, 2014).

El extracto insoluble en agua no se pudo suspender en goma arábica, se disolvió en Twin 80 al 20%, sin embargo, esta concentración era demasiado alta para ser administrada crónicamente; por tal motivo el extracto se disolvió en aceite de oliva extra virgen, lo que brinda mayor seguridad en los estudios en animales (Vinayagam et al, 2012).

Los resultados del estudio de toxicidad aguda clasificó al extracto en la categoría 5 ($\geq 2000 < 5000$ mg/día) según The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), 2011, con la indicación de peligro: "Puede ser nocivo en caso de ingestión" y está destinada a permitir la identificación de sustancias que tengan un peligro de toxicidad aguda relativamente bajo pero que en determinadas circunstancias pueden representar un peligro para poblaciones vulnerables. Según el criterio de Williams para productos naturales administrados por vía orogástrica a dosis única por vía oral en ratones se clasifica como "ligeramente toxico" (≤ 5000 mg/Kg) (CYTED, 1995). La dosis letal media (DL50), ensayados en ratones albinos, del aceite esencial de la misma planta fue de 906.1140 mg/kg (Carhuapoma, 2005) indicaría una mayor toxicidad aguda que el extracto etanólico obtenido de la misma planta. Los estudios histológicos indican alteraciones a nivel renal y hepático, los cuales tendrían que verificarse en estudios específicos.

Se observa un efecto hipoglicemiante significativo en la prueba de tolerancia a la glucosa (Ver tabla 5) indicando un posible mecanismo de acción relacionado a aumento de liberación de insulina de las células beta o acciones extra pancreáticas que podrían incluir la estimulación de la utilización de glucosa periférica facilitando la translocación de GLUT-4, favoreciendo la reducción de la glucosa sanguínea (Dornas et al, 2009). El análisis del efecto antihiperглиcemiante observado en animales diabéticos por STZ (Ver tabla 6) se relacionaría a que impide el aumento excesivo de la glucemia y a la neutralización de la reducción del peso dramático observado en el grupo STZ. Los efectos se deberían a la actividad antioxidante de los flavonoides y de aceites esenciales presentes en el extracto etanólico, (Carhuapoma et al, 2005) inhibiendo uno de los mecanismos de acción tóxica de la STZ relacionado a la formación de especies reactivas de oxígeno, que también pueden contribuir a la fragmentación del ADN, por lo tanto, los antioxidantes pueden atenuar sustancialmente la toxicidad de la STZ (King, 2012; Szkudelski, 2001). La identificación de tres flavonoides, quercetina, rutina y quercetin-3-metil-eter refuerza el posible mecanismo de acción mencionado. Los flavonoles, ejemplificados por quercetina y su glucósido precursor

isoquercitrina, son potentes inhibidores no competitivos de GLUT-2, disminuyen la absorción intestinal de glucosa, además presentan un excelente perfil de seguridad farmacológica, por ende serían potenciales agentes farmacológicos en el tratamiento de la diabetes y la obesidad (Kwom et al, 2007). Dok-Go y col, (2003), encontraron que los flavonoides quercetina, (+)-dihidroquercetina y la quercetina 3-metil éter aislados de las fracciones de acetato de etilo de los frutos y tallos de *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*, tenían actividades neuroprotectoras contra las lesiones neuronales oxidativas inducidas en células corticales de rata cultivadas primarias y actividades antioxidantes mediante el uso de tres diferentes ensayos biológicos libres de células, siendo la quercetina 3-metil éter, la más potente.

Los resultados indican también un efecto no significativo del aceite de oliva sobre la hiperglicemia, por lo tanto un sinergismo con el extracto etanólico, que tendría que evaluarse en estudio posteriores, dejando abierta la posibilidad de un nutracéutico potencial a base del extracto etanólico y aceite de oliva, aunado a su agradable fragancia.

Los resultados del experimento en ratas suplementadas con colesterol indican efecto hipolipemiante significativo en relación a la disminución de los triglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Tabla 7), que también se relacionan a la presencia de flavonoides y aceites esenciales, no solo por acciones antioxidantes sino también por la inhibición de enzimas clave en el metabolismo de las lipoproteínas. Así Anila et al (2002) encontró que los flavonoides de *Emblica officinalis* (10 mg/Kg/día) inhibió a la HMG CoA reductasa por lo tanto inhibe la síntesis de colesterol. Los flavonoides de *Emblica officinalis* y *Mangifera* también aumentaron la excreción fecal de ácidos biliares, relacionado al aumento de la actividad de la LCAT (Lecitina Colesterol Aciltransferasa) implicada con el transporte de colesterol desde los tejidos extra hepáticos hasta el hígado para su degradación. La acción antioxidante de los flavonoides puede atenuar el proceso aterosclerótico al neutralizar a las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, las cuales oxidan a las LDL, que luego de ser absorbidos por los macrófagos se convierten en células espumosas. (Figura 7) (Leopold, 2009). La acción antioxidante también puede disminuir la disfunción endotelial generada por la

ateroesclerosis, al evitar la degradación del óxido nítrico que se produce en el endotelio, debido a que neutraliza a los radicales superóxido, los cuales disminuyen su liberación o neutralizan al óxido nítrico (Born et al, 1999).

En relación a las implicancias clínicas de la reducción de los triglicéridos y VLDL, la Asociación Americana del Corazón (AHA, 2011) reafirma que los triglicéridos no son directamente aterogénicos, sino que representan un importante biomarcador de riesgo de enfermedades cardiovasculares debido a su asociación con partículas remanentes aterogénicas y apo CIII. Según la AHA, la hipertrigliceridemia que resulta de bien un aumento de la producción o disminución de catabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL, por ejemplo, quilomicrones y Lipoproteínas de muy baja densidad [VLDL]) influye directamente en la composición y el metabolismo de LDL y HDL. Por ejemplo, la hipertrigliceridemia de la resistencia a la insulina (IR) es una consecuencia de la lipólisis de los adipocitos que resulta en el flujo de FFA (ácidos grasos libres) al hígado y aumentó la secreción de VLDL. Una mayor producción de triglicéridos de VLDL activa la proteína de transferencia de ésteres de colesterol, lo que resulta en el enriquecimiento de triglicéridos de LDL y HDL. El contenido de triglicéridos dentro de estas partículas es hidrolizado por HTGL (lipasa de triglicérido hepático), lo que resulta en partículas de HDL y LDL densas y pequeñas. Los estudios experimentales sugieren que la HDL hipertrigliceridémica puede ser disfuncional, que las partículas de LDL pequeñas y densas pueden ser más susceptibles a la modificación oxidativa y que un mayor número de partículas aterogénicas puede influir negativamente en el riesgo de CVD. Asimismo la AHA orienta principalmente hacia un tratamiento no farmacológico, basado en modificaciones dietéticas y reducción del peso corporal.

Dentro de las modificaciones dietéticas actualmente se incluyen aditivos como el aceite de oliva, el cual tiene propiedades medicinales importantes; en nuestro estudio la combinación de aceite de oliva más el extracto permitió su adecuada administración. Llamó la atención que la combinación tenía un aroma agradable, lo cual puede orientar a ser un candidato a nutraceutico hipolipemiante con propiedades antioxidantes.

También se observa un sinergismo del efecto hipolipemiante de la atorvastatina mas el extracto para controlar el nivel de triglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lo cual se relacionaría al efecto biopotenciador referenciado para varios compuestos naturales polifenólicos, entre ellas la quercetina, que se fundamenta en su capacidad para aumentar la biodisponibilidad del hipolipemiante, relacionado a la inhibición de la CYP3A4 y la glucoproteína P. (Dudhatra et al, 2012) (Ajazuddin et al, 2014).

En relación a los datos de los estudios histológicos, se observa disminución de las lesiones escleróticas en los cortes histológicos de aortas de ratas suplementadas con colesterol que recibieron el extracto, lo cual se relacionaría a la atenuación del incremento de los niveles de triglicéridos y VLDL. (Ver figuras 21 y 22). Las observaciones histológicas en tejido cerebral, hepático y renal muestran ligeras alteraciones, parecidas a las ratas control. (Anexo1)

Finalmente, es necesario resaltar la importancia de los estudios preclínicos de validación científica de los usos terapéuticos tradicionales de nuestras plantas medicinales con el fin de que se redacte una farmacopea vegetal, orientada a complementar las farmacoterapias establecidas en las guías clínicas. (OMS 2013). Esta tesis doctoral pretende aportar datos que orienten, por una lado, al desarrollo de nuevos medicamentos, y por otro lado, reforzar el uso de extractos orientados a mejorar los beneficios de los cambios de estilos de vida relacionados a una alimentación sana, resumidas en la sabia frase de Hipócrates: “que tu alimento sea tu medicina y tu medicina tu alimento” (Ajmane, 2014).

CONCLUSIONES

1. El estudio fitoquímico ha identificado la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides (quercetina, rutina y quercetin 3-metil éter), taninos, triterpenos, esteroides, leucoantocianidinas y catequinas.
2. La toxicidad aguda del extracto etanólico de las hojas de *Luma Chequen* (Molina) A. Gray ha evidenciado que la DL_{50} estaría sobre 2000 mg/Kg, estableciendo según el criterio de Williams como ligeramente toxico.
3. En la prueba de tolerancia a la glucemia y el test en ratas estreptozinadas ha demostrado un efecto hipoglucémico al administrar el extracto etanólico de las hojas de *Luma Chequen* (Molina) A. Gray, siendo mejor con la dosis de 400 mg/Kg.
4. En las condiciones experimentales la administración del extracto etanólico de las hojas de *Luma Chequen* (Molina) A. Gray en ratas hiperlipidémicas por colesterol, se ha evidenciado un efecto hipolipemiente y antiaterogénico, habiendo sido mejor a dosis de 400 mg/Kg.

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios complementarios sobre la seguridad del uso a largo plazo (toxicidad sub crónica).
2. Realizar estudios que contribuyan a entender el mecanismo de acción relacionados a su aplicación como nutracéutico en uso crónico (Hemoglobina glicosilada, cuantificación de insulina en sangre, estudios histológicos sobre protección de células pancreáticas).
3. Iniciar estudios relacionados a formulaciones del extracto con aceite de oliva) como suplementos de ensaladas o comidas, como preventivos de enfermedades aprovechando su fragancia y actividad antioxidante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Afanas'ev I. (2010). Signaling of reactive oxygen and nitrogen species in diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3:6, 361-373;
2. Ajazuddin, Alexander A, Qureshi A, Kumari L, Vaishnav P, Sharma M, Saraf S, Saraf S. (2014) Role of herbal bioactives as a potential bioavailability enhancer for Active Pharmaceutical Ingredients. *Fitoterapia* 97, 1–14
3. Ajmone P, Cocconcelli P, Masoero F, Miggiano G, Morelli L, Moro D, Rossi F, Sckokai P, Trevisi E (2014). Food for Healthy Living and Active Ageing. *Studies in Health Technology and Informatics*. 203:32-43.
4. American Heart Association AHA (2011). Triglycerides and Cardiovascular Disease. A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation* May 24, 2292 – 2333.
5. Anila L, Vijayalakshmi NR. (2002). Flavonoids from *Embllica officinalis* and *Mangifera indica*—effectiveness for dyslipidemia. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 81–87.
6. Benito S, Lopez D, Saiz M, Buxaderas S, Sanchez J, Puig-Parellada P, Mitjavila M. (2002). Flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*, 135, 910–916.
7. Bersot TP. (2012). Farmacoterapia de la hipercolesteremia y la dislipidemia. En Brunton L, Chabner B, Knollman B, editores. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12 ed. (877-908). México:McGraW-Hill.
8. Born G, Rabelink T, Smith T (1999). Manual clínico sobre Endotelio y enfermedad cardiovascular. Londres: Science.
9. Brito A, Areche C, Sepúlveda B, Kennelly E, Simirgiotis M. (2014) Anthocyanin Characterization, Total Phenolic Quantification and Antioxidant Features of Some Chilean Edible Berry Extracts. *Molecules* 19, 10936-10955; doi:10.3390/molecules190810936.
10. Busti AJ, Lehew DS, Rutherford WS, Daves BJ, Mckeever GC (2009). Which North and south American (Brazil, Chile, Puerto Rico) herbs or natural medicines are known to be inhibitors of santine oxidase? *PW Nat Med News!*;1(48):1-4
11. Carhuapoma M (2006). Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayan”. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
12. Cho W, Chung W, Lee S, Leung A, Cheng C, Yue K. (2006). Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies

- in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 550 173–179
13. CIOMS – ICLAS. (2012). International guiding principles for biomedical research involving animal. Recuperado de <http://www.cioms.ch/images/stories/CIOMS/IGP2012.pdf>.
 14. Colegio Medico del Peru (CMP) (2014). La grave crisis sanitaria se agrava por la inadecuada gestión de las tres veces interpelada y aún ministra de Salud Mldori de Habich. Recuperado de: <http://cmp.org.pe>.
 15. Cornell S. (2015). Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2015:11 621–632.
 16. Cronquist A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Edit. Columbia University Press. New York;.
 17. Cruz J, Licea M, Hernández P, Abraham E, Yanes M. (2011). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin*, 58(1), 4-15.
 18. Cuerda C, Luengo L, Valero M, Vidal A, Burgos R, Calvo F, Martínez C. (2011). Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. *Nutr Hos*, 26(1), 68-78.
 19. CYTED. (1995). *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Búsqueda de principios activos de plantas de la región. (49) Manual de técnicas de investigación.*
 20. Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, Lee YH, Jin C, Lee YS, Cho J. (2003). Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *Brain Research*, Volume 965, Issues 1–2, pages 130–136
 21. Domínguez X. (1985). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. 3 ed. (209-238). Mexico:Limusa.
 22. Dornas W, De Oliveira T, Dores R, Fabres M, Nagen T. (2009). Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn*, 19(2A), 488-500.
 23. Dudhatra G, Mody S, Awale M, Patel H, Modi Ch, Kumar A, Kamani D, Chauhan B. (2012). A Comprehensive Review on Pharmacotherapeutics of Herbal Bioenhancers. *The ScientificWorld Journal Volume* 2012, Article ID 637953, 33 pages doi:10.1100/2012/637953
 24. Downing LE, Heidker RM, Caiozzi GC, Wong BS, Rodriguez K, Del Rey F, et al. (2015). A Grape Seed Procyanidin Extract Ameliorates Fructose-Induced Hypertriglyceridemia in Rats via Enhanced Fecal Bile Acid and Cholesterol Excretion and Inhibition of Hepatic Lipogenesis. *PLoS ONE* 10(10): e0140267. doi:10.1371/journal.pone.0140267.

25. Fidèle N, Joseph B, Emmanuel T, Théophile D. (2017). Hypolipidemic, antioxidant and antiatherosclerogenic effect of aqueous extract leaves of *Cassia occidentalis* Linn (Caesalpinaceae) in diet-induced hypercholesterolemic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2017) 17:76. DOI 10.1186/s12906-017-1566-x.
26. Foro salud (2013). Declaración política de la VI conferencia nacional de salud. Recuperado de <http://www.forosalud.org.pe/declaracionpolitica.pdf>
27. Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 27;288(5789):373-6.
28. Georgiev V, Ananga A, Tsoleva V. (2014). Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients*, 6, 391-415; doi:10.3390/nu6010391
29. Goncalves MJ, Calvaleiro C, Cunha AP, Salgueiro LR. (2006). Chemical composition and antimicrobial activity of the commercially available oil of *Luma chequen*. (Molina) A. Gray. *Journal of essential research*, 18(1), 108-10.
30. Gupta RK, Kesari AN, Murthy PS, Chandra R, Tandon V, Watal G. (2005). Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 75–81.
31. Grassi D, Desideri G, Ferri C. (2010). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Nutrients*, 2, 889-902; doi:10.3390/nu2080889
32. Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyaphratharsara N, Sato H, Herunsale A, Suthisisang C. (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2), 252–260.
33. Jain N, Naseem I, Ahmad J. (2009). Evaluation of DNA damage and metabolic syndrome parameters in diabetic rabbits supplemented with antioxidants. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 23, 197–205.
34. Jaramillo H, Macha M, Mejía (2004). Determinación de la actividad hipocolesterolemica en extractos de parte aérea de *Luma chequen* “rayan castilla” Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico). Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.
35. King Aileen JF. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166, 877–894.
36. Kyselova Z. (2011). Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. *Interdiscip Toxicol*. 4(4), 173–183.
37. Kumar S, Pandey A. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. Volume 2013, 16 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>

38. Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee J-H, Kruhlak M, Levine M. (2007). Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J*, 21, 366–377.
39. Kuhn Thomas S. (1962). *La estructura de las revoluciones científicas*. University of Chicago Press.
40. Labbé C, Coll J, Connolly J, Faini F, Farrugia J, Rycroft D (2002). Bioactive flavanonas from *Luma chequen*. *Collec. Szech. Chem. Commun.* 67, 115-23.
41. Lakhanpal P, Rai DK. (2007). Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, 2(2), 22-37.
42. Lapa AJ, Monteiro T. (2001). *Métodos farmacológicos para la validación de plantas medicinales*. CYTED - RIVAPLAMED. Red de Validación de Plantas Medicinales.
43. Leopold J, Loscalzo J. (2009). Oxidative Risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*; 47(12): 1673–1706.
44. Lock de Ugaz O. (1994). *Investigación Fitoquímica - Métodos en el Estudio de Productos Naturales*. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú – Fondo editorial.
45. Mancilla H, Quiroz K, Arencibia A, Carrasco B, García-Gonzales R. (2013). Establecimiento al cultivo *in vitro* de *Luma chequen* a partir de segmentos nodales. *Cien. Inv. Agr.*, 40(3), 609-615.
46. Messina D, Soto C, Méndez A, Corte C, Kemnitz M, Avena V, Del Balzo D, Rafael Pérez R. (2015). Efecto hipolipemiante del consumo de mate en individuos dislipidémicos. *Nutr Hosp.* 2015;31(5):2131-2139
47. Millán J, Alegría E, Alvares L, Ascaso J, Lahoz C, Mantilla T, Mostaza J, Botet J, Pintó X. (2011). Documento Abordaje de la dislipidemia. Sociedad Española de Arteriosclerosis (parte I). Documento de consenso. *Clin Invest Arterioscl*, 23(6), 278-288.
48. Ministerio del Ambiente (MINAM) (2013). Manual del curso de biocomercio. Recuperado de: <http://www.minam.gob.pe/>
49. Ministerio de Salud Chile. (2010). *Medicamentos Herbarios Tradicionales*. Recuperado de <http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/Libro%20MHT%202010.pdf>
50. Ministerio de Salud del Perú. DIGEMID. (2011) Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios. D.S. 016 – 2011.
51. Ministerio de Salud del Perú. Dirección General de Epidemiología. (2010) *Análisis de la situación de salud en Perú*. Recuperado de http://www.dge.gob.pe/publicaciones/pub_asis/asis25.pdf

52. Muruganandan S, Srinivasan K, Gupta S, Gupta PK, Lal J. (2005). Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 497–501.
53. Muñoz J, Carrillo A, Córdova J. (2013). Lipid-lowering effect of maize-based traditional Mexican food on a metabolic syndrome model in rats. *Lipids in Health and Disease*, 12:35, 1-6.
54. OECD. *Guidelines for the testing of chemicals 425. Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP)*. 2008. Recuperado de <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/occdtg425.pdf>.
55. Oliveira R, Benitez L, Antunes K, Pereira P, Monteiro T, Dos Santos P, et al (2016). Antioxidant and Hypolipidemic Activity of the Hydroethanolic Extract of *Curatella americana* L. Leaves. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2016, Article ID 9681425, 6 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9681425>
56. Organización Internacional del Trabajo (OIT). EsSalud (2013). El sistema de Salud del Perú: Situación actual y estrategias para orientar la extensión de la cobertura contributiva. Recuperado de: <http://www.ilo.org/global/lang-es/index.htm>
57. Organización Mundial de la Salud (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf
58. Organización Panamericana de la Salud (2012). *Salud en las Américas*. Panorama regional y perfiles de país. Publicación Científica y Técnica N° 636. Recuperado de <http://www.paho.org/saludenlasamericas>
59. Osterhoudt K, Penning T. (2012). Toxicidad e intoxicación por fármacos. En: Brunton L, Chabner B, Knollman B, editores. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12 ed. (73-87). México:McGraW-Hill.
60. Perez R, Hoyo-Vadillo C. (2011). Antidiabetic activity of an extract of *Prosthechea michuacana* in streptozotocin- induced diabetic ratas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*. Recuperado de www.blacpma.usach.cl
61. Pitocco D, Zaccardi F, Di stasio E, Romitelli F, Santini S, Zuppi C, Ghirlanda G. (2010). Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud*, 7(1), 15-25
62. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. (2012) *Farmacología*. 7 ed. Barcelona:Elsevier.
63. Rodrigues-Fragoso L, Martínez-Arismendi J, Orozco-Bustus D, Reyes Esparza J, Torres E, Burchiel S. (2011). Potential Risks Resulting from fruit/Vegetable-Drug interactions. *Journal of food Science*, 76(4), 112-124.

64. Schmitt-Schilling S, Schaffer S, Weber C, Eckert G, Muller W. (2005). Flavonoids and the aging brain. *J of physiology and pharmacology*. 56. (supl 1), 23-36.
65. Simirgiotis MJ, Bórquez J, Schmeda-Hirschmann G. (2013). Antioxidant capacity polyphenolic content and tandem HPLC-DAD-ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *L.chequén*. *Food Chem*, 139(1-4), 289-99.
66. Singh M, Balamurugan M, Gupta A, Yadav S, Sharma A, Acharya A, Ramasamy M. (2007). Efectos antidiabeticos de liposomas cargados con glibenclamida en ratas con diabetes inducida por alloxan. *Ars Pharm*; 48(1), 31-36.
67. Stefek M. (2011). Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. *Interdiscip. Toxicol*, Vol. 4(2), 69–77.
68. Suñé Negre J. (1993). Extracción y destilación. En Trillo C, editor. *Tratado de Farmacia Galénica*. 1 ed. (249 – 254). Madrid:Lazan ediciones.
69. Szkudelski. T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res*, 50, 536-546.
70. Torres Chati, Jani. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (molina) a. Gray “arrayán” frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Lima - Perú. Tesis para Químico Farmacéutico. UNMSM
71. United Nations. (2011). The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals. (GHS). Fourth revised edition. Recuperado de http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/S T-SG-AC10-30-Rev4e.pdf
72. Vasu VT, Modi H, Thaikootathil JV, Gupta S. (2005). Hypolipidaemic and antioxidant effect of *Enicostemma littorale* Blume aqueous extract in cholesterol fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 277–282.
73. Vinayagam KS, Khan HB, Keerthiga G, Palanivelu S, Panchanatham S. (2012). Hypolipidemic effect of *Semecarpus anacardium* in high cholesterol fed hypercholesterolemic rats. *Chin J Integr Med*. 12
74. Wu Y, Tang L, Chen B. (2014) Oxidative Stress: Implications for the Development of Diabetic Retinopathy and Antioxidant Therapeutic Perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2014 Article ID 752387, 12 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/752387>
75. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. (2014). Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. *Int. J. Med. Sci*. 2014, Vol. 11

76. Yan LJ. (2014). Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *Journal of Diabetes Research*. Volume 2014, 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/137919>.
77. Zarei A, Ashtiyani SC, Taheri S, Rasekh F (2014). Comparison between effects of different doses of *Melissa officinalis* and atorvastatin on the activity of liver enzymes in hypercholesterolemia rats. *Avicenna J Phytomed*, 2014; 4 (1): 15-23.

ANEXOS

Anexo 1.

Evaluación de cortes histológicos de aorta, riñón, hígado y cerebro relacionados al estudio hipolipemiante.

	Blanco (aceite de oliva)	Control (Colesterol más aceite de oliva)	Colesterol más extracto
Aorta	NR2: Íntima gruesa	R2: Esclerosis incipiente con presencia de macrófagos y depósitos de colesterol en la media.	N2: Discreto engrosamiento con presencia de macrófagos
	NR3: Íntima normal	R3: Esclerosis incipiente con presencia de macrófagos y depósitos de colesterol en la media.	N3: Sin alteraciones
Riñón	NR2: Glomérulo congestivo, disminución de espacio de Bowman, edema	R2: Glomérulo Congestivo, disminución de espacio de Bowman	N2: Alteraciones discretas, esclerosis glomerular, empastamiento capsular
	NR3: Discreta congestión, poco espacio de Bowman. Edema de epitelio tubular	R3: Congestivo, disminución de espacio de Bowman	N3: Congestión, disminución de espacio de Bowman
Hígado	NR2: Alteración de estructura hepática, no hay conductos biliares, hígado graso	R2: Discretamente congestivo	N2: Congestivo
	NR3: Sin alteraciones	R3: Zona de apoptosis, microvascularización de cito plasma.	N3: Discretamente congestivo
Cerebro	NR2: Sin alteraciones	R2: Sin alteraciones	N2: Sin alteraciones
	NR3: Discretamente congestivo	R3: Discreto edema cerebral	N3: Sin alteraciones

Anexo 2.

Identificación taxonómica de *Luma Chequen* (Molina) A. Gray.

	Universidad Nacional Mayor de San Marcos MUSEO DE HISTORIA NATURAL	
CONSTANCIA N° 040-USM-2007		
LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:		
La muestra vegetal (Tallo, hojas) recibida del Sr. ERNESTO TORRES VELIZ , ha sido estudiada y clasificada como: <i>Luma chequen</i> (Molina) A.Gray y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):		
DIVISION: MAGNOLIOPHYTA		
CLASE: MAGNOLIOPSIDA		
SUB-CLASE : ROSIDAE		
ORDEN: MYRTALES		
FAMILIA: MYRTACEAE		
GENERO: <i>Luma</i>		
ESPECIE: <i>Luma chequen</i> (Molina) A.Gray		
Nombre vulgar: "Rayán" Determinada por: Mg. Hamilton Beltrán		
Se extiende la presente constancia a solicitud del interesado, para los fines que estime conveniente.		
Lima, 05 de Marzo 2007 .		
		
Mg. Joaquina Alban Castillo JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS(USM)		
JAC/ddb		
Av. Arenales 1256, Jesús María Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú	Telfs.: (511) 471-0117, 470-4471, 470-7918, 619-7000 anexo 5703 Fax: (511) 265-6819	e-mail:museohn@unmsm.edu.pe http://museohn.unmsm.edu.pe

Efecto del extracto de *Luma Chequen* en la variación de peso corporal de las ratas hiperglucémicas por estreptozotocina.

Grupo Experimental	Peso corporal (g) ± DE		
	Inicial	Final	Variación (%)
Control	320.8 ± 10.34	238.4 ± 7.31	-26.62
Extracto 400 mg/Kg	313.4 ± 8.23	269.6 ± 15.76	-13.98*
Glibenclamida 5 mg/Kg	312 ± 7.69	223.4 ± 11.04	- 28.4

*Posee diferencia con respecto al control Test de Dunnet ($p < 0,05$)

Fuente: Datos tomados de la investigación

Porcentaje de disminución de triglicéridos y VLDL inducido por el extracto de *Luma Chequen* en ratas suplementadas con colesterol.

	Porcentaje de disminución de triglicéridos (%)	Porcentaje de disminución de VLDL (%)
Grupo extracto 400 mg/Kg	25,9	26.1
Grupo Extracto 400 mg/Kg más atorvastatina	36.8	36.8
Grupo atorvastatina	24.7	25.5

Fuente: Datos tomados de la investigación