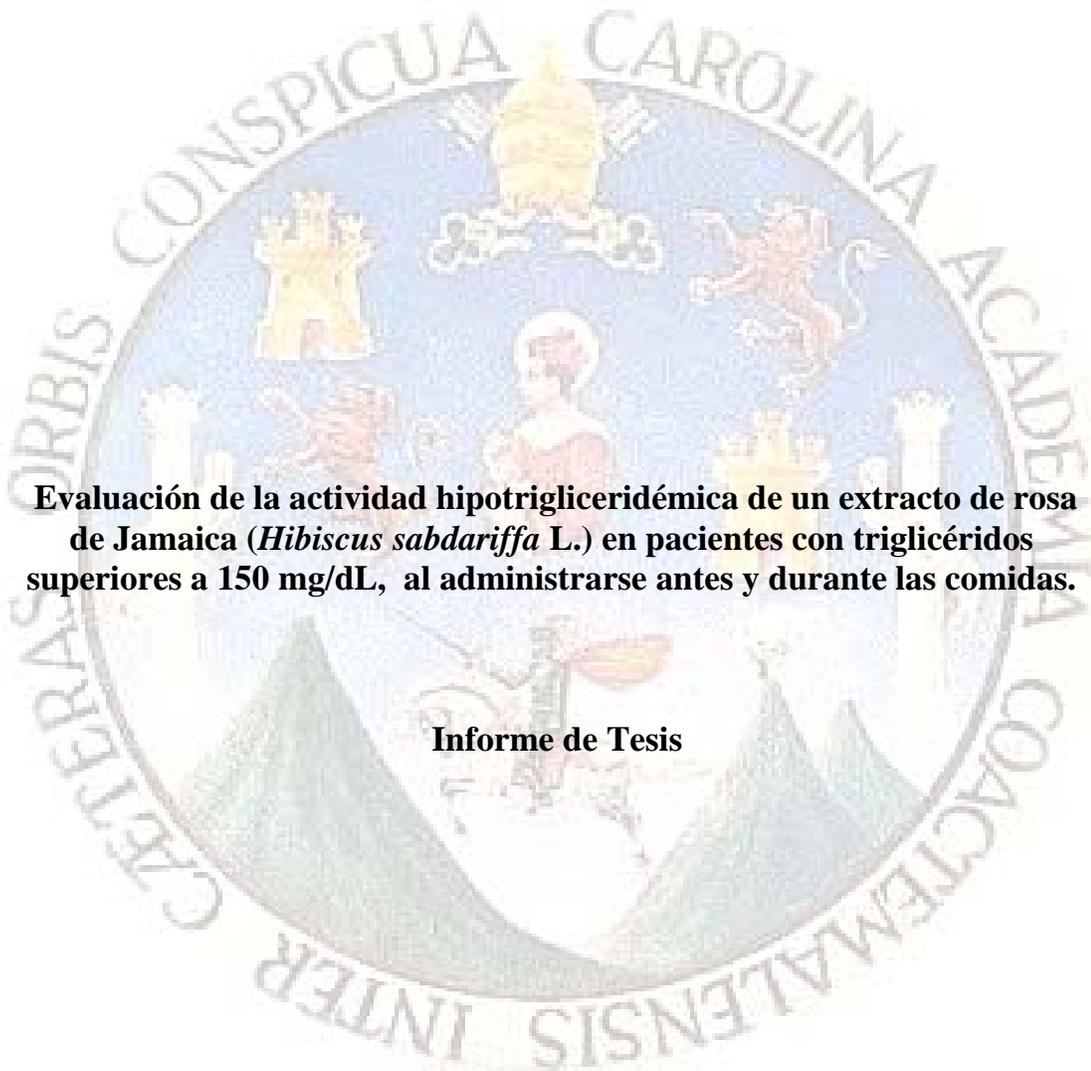


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Evaluación de la actividad hipotrigliceridémica de un extracto de rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en pacientes con triglicéridos superiores a 150 mg/dL, al administrarse antes y durante las comidas.

Informe de Tesis

Presentado por

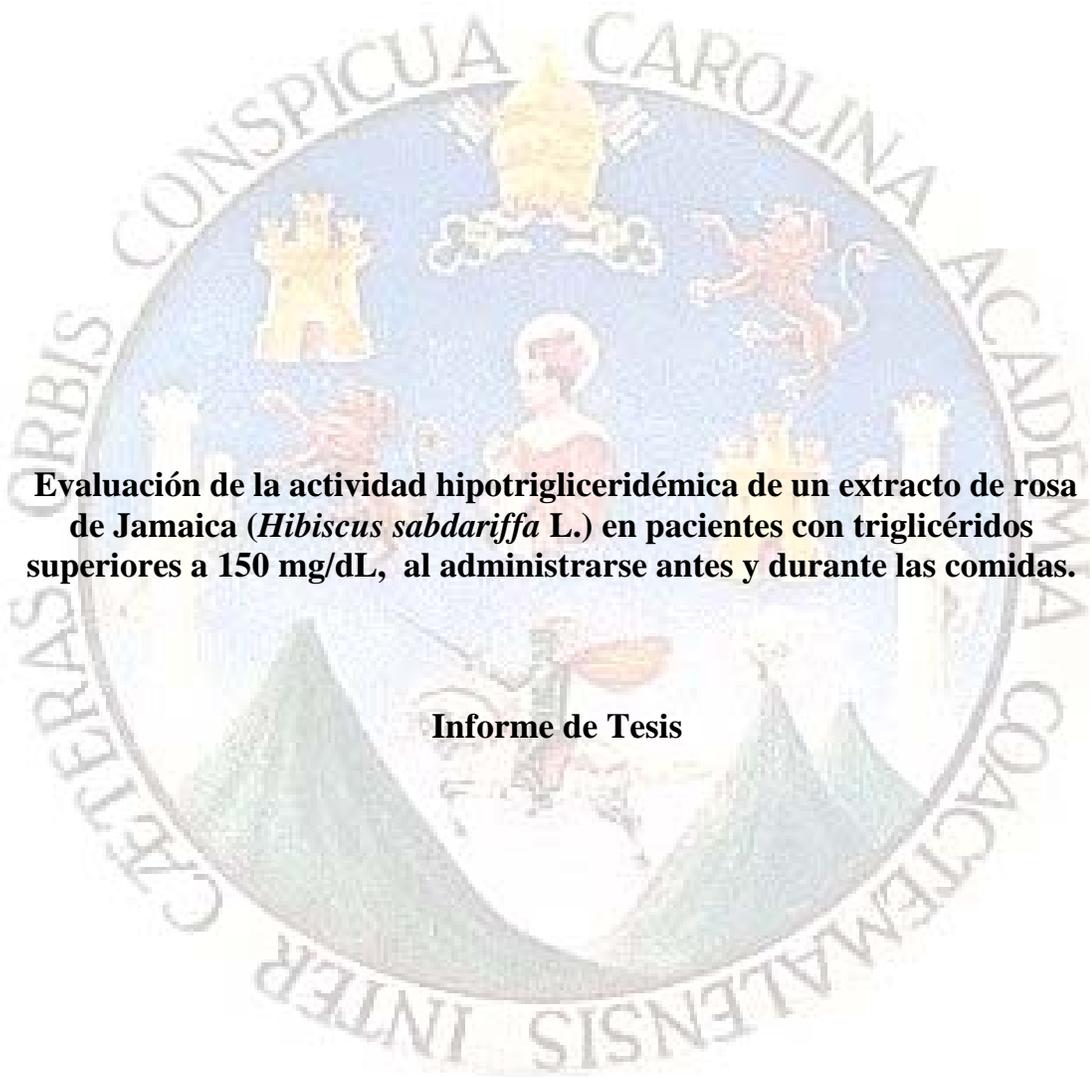
Rodrigo Castañeda Molina

Para optar el título de

Químico Farmacéutico

GUATEMALA, JULIO 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Evaluación de la actividad hipotrigliceridémica de un extracto de rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en pacientes con triglicéridos superiores a 150 mg/dL, al administrarse antes y durante las comidas.

Informe de Tesis

Rodrigo Castañeda Molina

Químico Farmacéutico

GUATEMALA, JULIO 2012

MIEMBROS DE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres, mis hermanos, mis Tías, y al Colegio Salesiano Don Bosco.

Por la formación que influyó mucho en la persona en la que me convertí.

A mis amigos del colegio y de la universidad.

Por la buena compañía y las excelentes platicadas.

A mi novia.

Por el apoyo y la inspiración.

A Santa Maria Nebaj.

Por mostarme la realidad.

A mi Asesora

Por la dirección y el consuelo.

A mi Revisora

Por ser una excelente persona y profesional.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

Por ser tan noble.

A quienes me apoyaron en la Tesis

Unidad de Salud, USAC

LIPRONAT

LIEXVE

Los voluntarios que participaron en el “Estudio de la Jamaica”.

DEDICATORIA

- Al apoyo y valores** Representados en mis Padres, César Augusto Castañeda Salguero e Ingrid Reneé Molina Mejía
- A la fortaleza** Transmitida por mí hermano, Juan Carlos Castañeda Molina, César Augusto Castañeda Cerna y Luz Elena Castañeda Cerna.
- Al honor** Forjado con mis camaradas de la vida, Marcos Rubén Canastuj Solares, Luis Ernesto Poroj Caraballo, Juan Carlos Castañeda Molina.
- A la inspiración** Que constantemente nace y renueva mi interior, María Isabel Rodríguez López.
- A la lucha** Con la que nos debemos de encontrar hasta lograr transformar en desarrollo todas las barreras personales y sociales, inspirada por el pueblo maya guatemalteco.
- Al pasado** Que nos ha enseñado tanto y nos da infinitas herramientas.
- Al futuro** Que sea más justo y más honorable que lo dejado atrás, Luis Fernando Gonzáles Castañeda, Romina Castañeda Moreno, Adrian Josué Gonzáles Castañeda, Julio César Castañeda Moreno, Juan Marcos Gonzáles Castañeda.
- Al Amor** Que debe de existir hacia todos.

INDICE

I	RESUMEN.....	1
II	INTRODUCCIÓN.....	2
III	ANTECEDENTES.....	3
IV	JUSTIFICACIÓN.....	47
V	OBJETIVOS.....	48
VI.	HIPOTESIS.....	49
VII.	MATERIALES Y METODOS.....	50
VIII.	RESULTADOS.....	55
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	73
X.	CONCLUSIONES.....	77
XI.	RECOMENDACIONES.....	78
XII.	REFERENCIAS.....	79
XIII.	ANEXOS.....	90

I. RESUMEN

La elevación de los lípidos sanguíneos, colesterol y triglicéridos, se ha convertido en un riesgo común a la salud a nivel mundial, ya sea a nivel de riesgo cardiovascular en el caso del colesterol y triglicéridos, como a nivel pancreático, de la cornea, bazo e hígado, en el caso de triglicéridos. El tratamiento farmacológico con hipolipemiantes comerciales presenta una limitante económica, por su elevado costo, y una limitante intrínseca, por sus efectos adversos. Esto ha llevado a la búsqueda de tratamientos con menos efectos secundarios y más accesibles a toda la población. La investigación con plantas medicinales permite superar estas barreras mediante estudios clínicos que demuestren su actividad.

El estudio realizado evaluó la capacidad de un extracto de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) para reducir triglicéridos sanguíneos en pacientes con triglicéridos superiores a 150 mg/dL en un periodo de 2 meses, a frecuencia de 3 veces al día, realizando una comparación de la actividad del extracto según el momento de administración. A su vez se pretendía establecer la concentración de principio activo, Antocianinas totales (correspondientes a las delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido), y los parámetros de calidad del extracto. El extracto se realizó a escala planta piloto por medio de Extracción de Rosa de Jamaica en proporción 1:10 (material vegetal en Kilogramos/Litros de Solvente), utilizando agua como solvente, con su posterior concentración a proporción 1:1. La medición de antocianinas totales se realizó en espectrofotómetro a 520nm obteniendo una concentración promedio de 15 mg/dosis. El estudio se realizó en dos distintos grupos, el primero, integrado por 14 pacientes que se administraba el extracto 30 minutos antes de cada comida, y el segundo, integrado por 14 pacientes que se administraba el extracto durante las comidas. Las evaluaciones de lípidos sanguíneos se realizaron mensualmente, con un total de 3 mediciones, con evaluaciones de Colesterol total, Colesterol HDL, Colesterol LDL, y triglicéridos.

Según los datos obtenidos se determinó que el extracto de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) administrado 30 minutos antes de cada comida redujo los triglicéridos séricos en un valor promedio de 54.92 mg/dL, mientras que el extracto administrado durante las comidas redujo los triglicéridos séricos en un valor promedio de 36.56 mg/dL. El extracto no demostró actividad hipocolesterolémica. En base a esto se demostró que dosis promedio de 15mg de Antocianinas tres veces al día, durante dos meses, posee actividad hipotrigliceridémica, siendo ésta mayor al administrarse 30 minutos antes de cada comida.

II. INTRODUCCIÓN

La hiperlipidemia es considerada el principal factor de riesgo cardiovascular (RCV). Este hecho ha sido demostrado en estudios epidemiológicos, coronariográficos y de investigación clínica. La alta incidencia de factores de riesgo cardiovascular puede reducirse con una dieta adecuada, debido no sólo a la ingesta adecuada de nutrientes primarios, sino también a la contribución diaria de metabolitos secundarios, que contribuyan a prevenir procesos fisiopatológicos en los seres humanos.

Las antocianinas poseen una actividad potencial como antioxidantes, antiateroscleróticos, antiinflamatorios, antimutagénicos y antitumorales, sin embargo son necesarios estudios clínicos para que garanticen la seguridad y eficacia que tienen los metabolitos secundarios en promover la salud y prevenir enfermedades. La Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es de fácil acceso en la población guatemalteca, sin embargo el conocimiento de la población por sus propiedades medicinales y su potencial en reducir el colesterol es limitado.

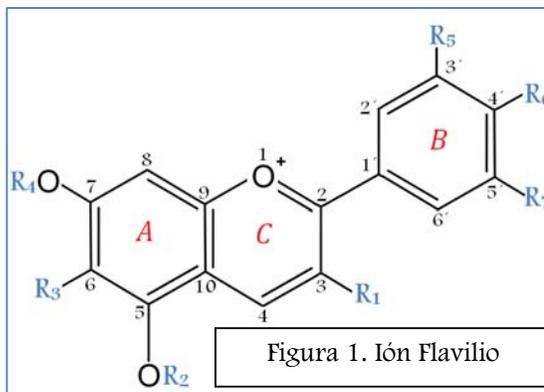
Estudios in vitro de Rosa de Jamaica han demostrado las propiedades antioxidantes, lo cual ha sido complementado con modelos en animales, donde se ha demostrado la actividad hipocolesterolemica, hipotrigliceridémica y antihipertensiva. La importancia del estudio radica en demostrar la actividad hipotrigliceridémica de un extracto de Rosa de Jamaica, como un tratamiento alternativo complementando con buenos hábitos alimenticios y medicina preventiva, tomando en cuenta la forma en la que se utiliza dicha planta en Guatemala, en un periodo de tiempo necesario para observar la evolución del tratamiento y los nuevos avances en el estudio de la farmacocinética de antocianinas.

III. ANTECEDENTES

3.1. ANTOCIANINAS Y ROSA DE JAMAICA

3.1.1. Química de Antocianinas

Son moléculas con estructura similar a 2-fenil- γ -cromona (estructura C₆-C₃-C₆), con el oxígeno heterocíclico cargado positivamente, originando la estructura 2-fenilbenzopirilio (ión flavilio), la cual carece del carboxilo en C₄ de los flavonoides (*ver figura 1*). Se encuentran como agliconas



libres (antocianidinas) ó como azúcares (antocianósidos), y al conjunto de antocianidinas y sus heterósidos se les llama antocianos. El 97% de las antocianinas identificadas hasta este momento se encuentran como heterósidos, generalmente monosacáridos, disacáridos ó trisacáridos. Son compuestos coloreados cuyo color varía según el pH. En medio ácido son rojos, en medio básico azules [Brouillard, 1982, p. 8]. Se clasifican en 5 grupos: **1) Simples:** Presentan grupos hidroxilo en **R₁**, **R₂**, **R₄** y **R₆**, y grupos hidrógeno, hidroxilo ó metoxilo en **R₅** y **R₇**. Generalmente presentan su unidad de azúcar en **R₁**, pero también pueden estar glucosidadas en **R₂**, **R₄**, **R₅**, **R₇** y más raramente en **R₆** [Mazza & Miniati, 1993, p. 369]. El 90% del total de las antocianinas conocidas hasta el momento está constituido por este grupo, el cual tiene como base 6 antocianidinas, Cianidina (30%), Delfinidina (22%), Pelargonidina (18%), y sus respectivos análogos metoxilados (20%), Peonidina (en **R₅**), Petunidina (en **R₅**) y Malvidina (en **R₅** y **R₇**) [Andersen & Markham, 2006, p. 475]. **2) Antocianidinas metiladas en el anillo A:** Presentan grupos metoxilo en **R₂** ó **R₄**, producto de la metilación de antocianidinas simples en sus grupos hidroxilo. Consisten en el 3% del total de antocianinas [Andersen & Markham, 2006, p. 476]; **3) Antocianidinas 6-hidroxiladas:** Presentan grupos hidroxilo en **R₃**. Consisten en el 2% del total de las antocianinas [Andersen & Markham, 2006, p. 475]. **4) 3-Desoxiantocianidinas:** Carecen del hidroxilo en **R₁** característico de las antocianidinas. Consisten en el 3% del total de las antocianinas. [Andersen & Markham, 2006, p. 475]. Son las únicas antocianinas en forma natural de agliconas [Takeoka & Dao, 2002, p. 219]. **5) Piranoantocianidinas:** Presentan un grupo

acetilpirano en la estructura del ión flavilio, producido por cicloadición de ácido piruvico entre C₄ y C₅, donde el oxígeno heterocíclico del pirano se encuentra unido al C₅. La numeración de estas estructuras son diferentes al ión flavilio, se conserva la numeración de los C₁₋₃ pero los C₆₋₈ del ión flavilio se convierten en C₇₋₉; los C₄₋₆ de la estructura piranoantocinidina corresponden al nuevo anillo pirano (en la posición 5 se localiza el grupo acetilo). Consisten en el 2% del total de las antocianinas [Andersen & Markham, 2006, p. 475].

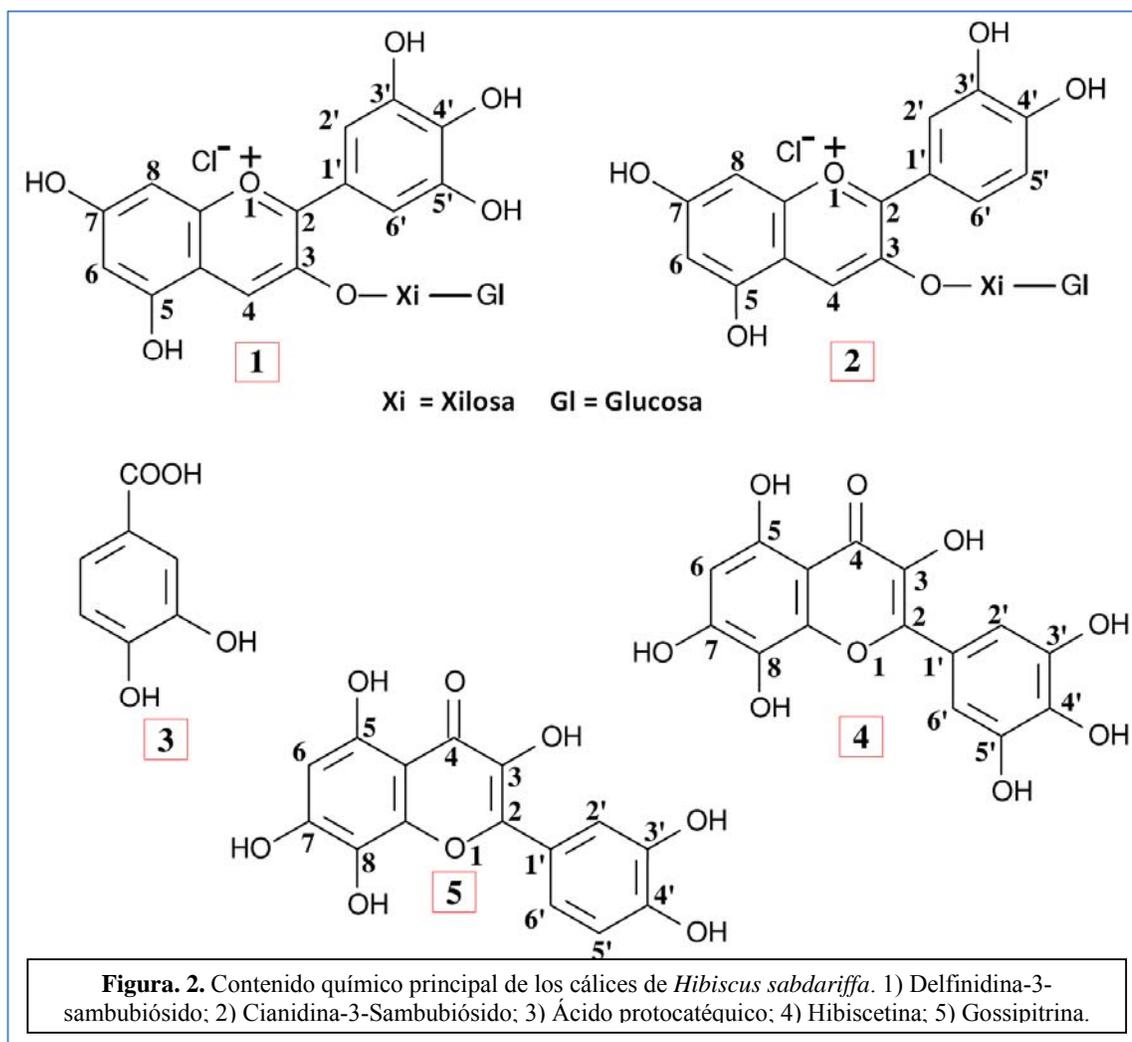
3.1.2. Composición Química de rosa de Jamaica

Las flores (cálices) contienen (*ver figura 2*): 1) ácidos orgánicos en un 15-30% (cítrico, hibiscico, málico, ascórbico, tartárico, oxálico, protocatéquico, clorogénico), 2) polisacáridos mucilaginosos en un 50% (ácidos urónicos en forma de sal y el resto ramnosa, arabinosa y pequeñas cantidades de glucosa, xilosa y manosa), 3) antocianinas en un 1.5 % (delfinidina-3-sambubiósido, cianidina 3-sambubiósido, hibiscina (delfinidina 3-xiloglucósido), cianidina-3-xiloglucósido, cianidina 3-monoglucósido, delfinidina 3-monoglucósido, delfinidina,), 4) otros constituyentes menores como flavonoides (hibiscitrina y su aglicona hibiscetina, gossipitrina, gossitrina, gossipetina, quercitina y sabdaritrina), polifenoles, y saponinas (β -sitosterol- β -D-galactopiranosido), fitosteroles (β -sitosterol, campesterol, ergosterol, estigmasterol), pectina, ácido aspártico y galacturónico [Ali, 2005, p. 369; Mahadevan & Kamboj, 2009, 79]. Las raíces contienen ácido tartárico y saponinas.

Las semillas contienen almidón, colesterol, celulosa, carbohidratos, campesterol, β -sitosterol, ergosterol, ácido propiónico, pentosanos, ácido pelargónico, ácido palmitoleico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido mirístico, metanol, ácido málvico, ácido linoleico, ácido esterculico, ácido caprílico, ácido fórmico, ácido esteárico, alcohol isopropílico, alcohol isoamílico, etanol, 3-metil-1-butanol, alcohol bencílico, fibra y minerales [Mahadevan & Kamboj, 2009, p. 79].

Las hojas tienen α -terpinil acetato, anisaldehído, β -caroteno, β -sitosterol, β -D-galactósido, benzoato de β -sitosterol, niacina, alcohol isoamílico, alcohol isopropílico, metanol, 3-metil-1-butanol, alcohol bencílico, etanol, ácido malico, fibra y ceniza [Mahadevan & Kamboj, 2009, p. 79].

Los frutos contienen α -terpinil acetato, pectina, anisaldehído, ácido ascórbico, oxalato de calcio, ácido caprílico, ácido cítrico, ácido acético, etanol, ácido fórmico, ácido pelargónico, ácido propiónico, alcohol isopropílico, metanol, alcohol bencílico, 3-metil-1-butanol, benzaldehido y minerales [Mahadevan & Kamboj, 2009, p. 78].

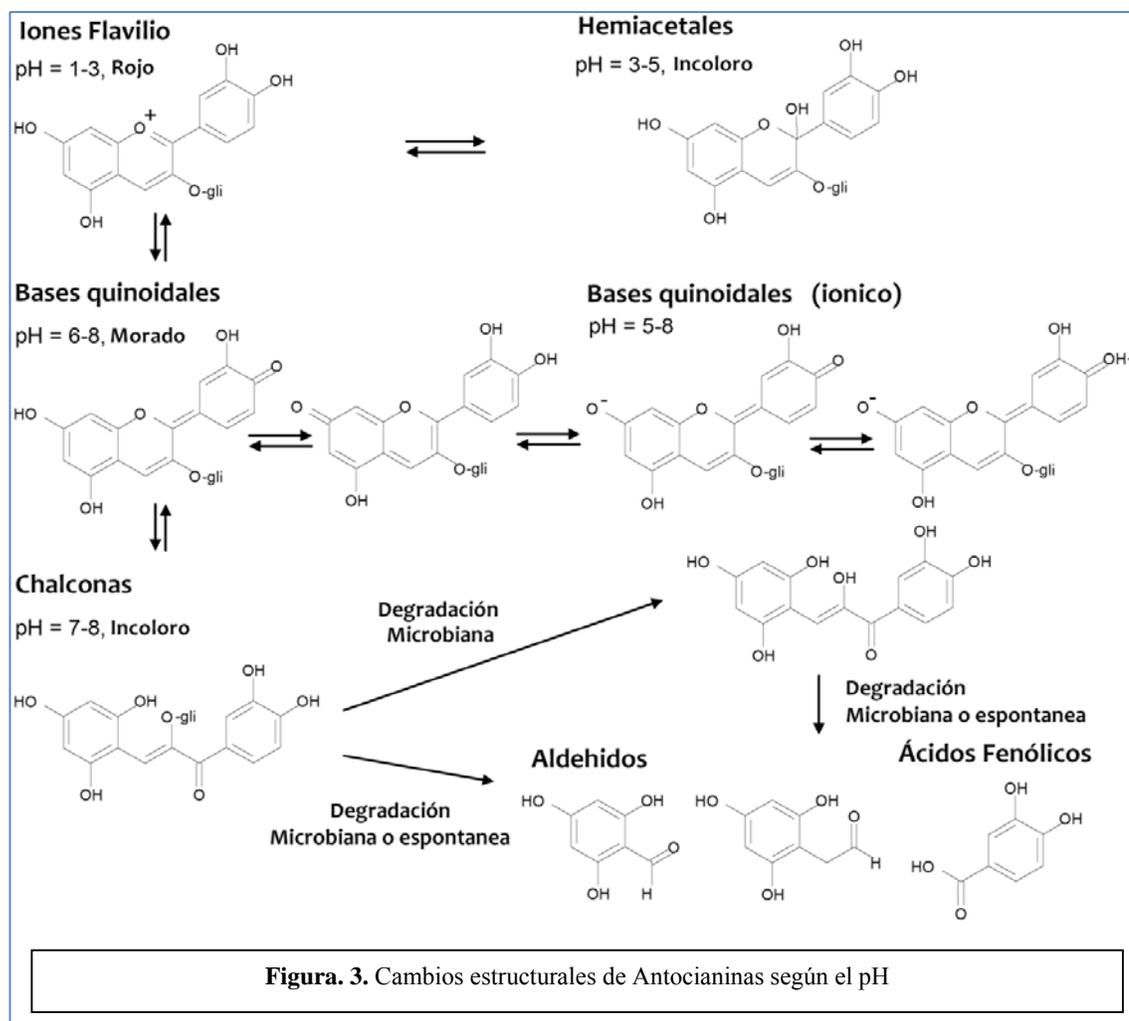


3.1.3. Estabilidad Química y Estructural de las Antocianinas

3.1.3.1. pH

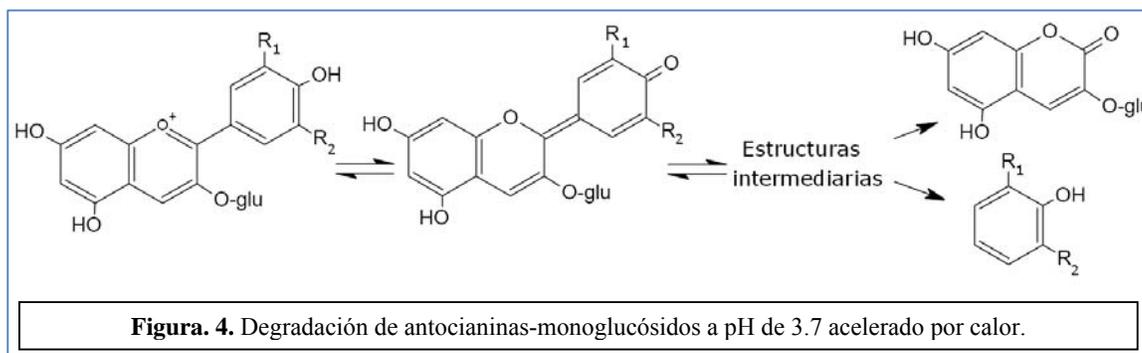
Las antocianinas existen en 4 estados pH-dependientes: cationes flavilio, hemiacetales, bases quinoidales y chalconas a pH de 1-3, 3-5, 6-8 y 7-8, respectivamente [Brouillard, 1982, p. 8; von Elbe and Schwartz, 1996, p. 651; Woodward G y varios, 2009]. El pH inferior a 3 le brinda un efecto protector a la molécula, donde el 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable de ión oxonio o catión flavilio (de color rojo intenso). A

valores de pH más altos a 3 ocurre una pérdida del protón y ocurre adición de agua en C₂, dando lugar a un equilibrio entre el ión flavilio y el hemiacetal, y a pH mayor a 6 ocurre un equilibrio entre la base quinoidal y la chalcona (de cadena abierta). Tanto el hemiacetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire. Los equilibrios químicos en una solución básica de antocianinas reducen la concentración de iones flavilio de forma parcial, ya que pueden ser revertidos al acidificar el medio; sin embargo, a valores de pH muy básicos, se pierde el equilibrio al formarse chalconas inestables de forma irreversible, resultando en una reducción definitiva de la concentración de iones flavilio, demostrada a partir de reducción definitiva en la intensidad del color [Brouillard, 1982, p. 9].



3.1.3.2. Temperatura

La degradación de antocianinas incrementa a medida que la temperatura aumenta [Palamidis & Markakis, 1978, p. 2633; Maccarone y varios, 1985, 901-904]. La temperatura alta en pH entre 2-4 incrementa la pérdida de la unidad glucosídica en C₃ [Adams, 1973, p. 747], lo que lleva a la pérdida del color, debido a que las Agliconas son mucho menos estables que los Antocianósidos, comenzando con la apertura del anillo y la consecuente producción de chalconas incoloras [Markakis y varios, 1957, p. 117-130; Adams, 1973, p. 747-762]. Eventualmente la degradación térmica conlleva productos de color café, especialmente en la presencia de oxígeno [Markakis y varios, 1957, p. 117-130]. Altas temperaturas junto a alto pH causa la degradación de antocianinas (*ver figura 4*) resultando en derivados de ácidos benzoicos y trihidrobenzaldehido (Seeram y varios, 2001, p. 4924; Furtado y varios, 1993, p. 113).



Calentamiento a 95° C a pH de 3.5, provocan vidas medias de 2-3h. A temperatura y pH fisiológico (7.2 y 37° C) las antocianidinas se descomponen espontáneamente, generando floroglucinol aldehído y sus correspondientes ácidos fenólicos (ácido galico, siringico, vanilico y p-hidroxibenzoico). Los mismos factores estructurales que producen la estabilidad de Antocianinas en pH, influyen en la temperatura (von Elbe & Schwartz, 1996, p. 651). Pelargonidina 3-glucósido es más estable a 100°C que petundina 3-glucósido, la cual es más estable que malvidina 3-glucósido (Keith & Powers, 1965, p. 577). Arabinosas de cianidina y peonidina son más estables al calor que las correspondientes galactosas.

3.1.3.3. Concentración

La concentración de las antocianinas y la actividad del agua de la matriz afectan la estabilidad. Incrementos en las concentraciones de antocianinas aumentan la estabilidad, producto de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemiacetal, dos bases quinoidales e inclusive entre una base quinoidal y un catión flavilio [Brouillard, 1982, p. 8; Dao y varios, 1998, p. 219.]. Sin embargo incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de antocianinas debido a una interacción entre agua y el catión flavilio, para formar la pseudobase inestable. Por lo tanto, las soluciones de antocianinas más concentradas son más estables [Giusti & Wrolstad, 2003, p. 217].

3.1.3.4. Condiciones Oxidantes

El oxígeno amplifica el impacto de la degradación de antocianinas. Remover el oxígeno protege a las antocianinas de degradación térmica. Otro factor, son las condiciones que favorecen la oxidación aeróbica del ácido ascórbico, produciendo grandes pérdidas de antocianinas por reacciones de condensación (Starr & Francis, 1968, p. 1293). La inestabilidad producida por el oxígeno es aumentada por aumento en el pH (Markakis, 1982, p. 163). La degradación de antocianinas producida por la luz, es dependiente de oxígeno molecular (Attoe & von Elbe, 1981, p. 1937). Oxidantes (incluyendo el oxígeno) producen compuestos incoloros o de color café (Jackman y varios, 1987, p. 201).

3.1.3.5. Enzimas

La forma anhidrobase de las antocianinas es la más susceptible a degradación enzimática (Yokotsuka & Singleton, 1997, p. 13-25). La adición de sacarosa incrementa la estabilidad y las características del color por la inhibición enzimática de peroxidasa y fenoloxidasa [Wrolstad y varios, 1990, p. 1064]. La inactivación de enzimas vegetales incrementa la estabilidad de antocianinas (García-Palazon y varios, 2004, p. 7). Las enzimas más comunes que degradan antocianinas son las glucosidasas, que rompen el enlace covalente entre la aglicona de la antocianina y el residuo glucosídico, resultando en la degradación de antocianinas inestables

[Huang, 1955, p. 141]. Peroxidasas y fenolasas, como fenol oxidasas y polifenol oxidasas, son encontradas naturalmente en frutas. Las fenolasas actúan directamente con antocianinas, pero la destrucción de antocianinas son eficientes junto con otros compuestos fenólicos, como catecol y ácido caftárico [Yokotsuka & Singleton, 1997, p. 13-25]; mientras que la polifenol oxidasa no degrada sin ácido caftárico [Sarni-Manchado y varios, 1997, p. 1365]. Las enzimas primero oxidan otros compuestos fenólicos en el medio a sus correspondientes quinonas, las cuales degradan a las antocianinas para formar productos de condensación de color café (Sakamura y varios, 1966, p. 317). Los glucósidos de malvidina son más estables que los de delfinidina hacia la polifenol oxidasa, mientras que aquellos con pelargonidina no reaccionan.

3.1.3.6. Relación Estructura-Actividad

Las antocianidinas son más inestables que sus respectivos antocianósidos en soluciones acuosas. Antocianinas-3-glucósidos son más estables que 3,5 ó 5-glucósidos. Antocianósidos junto con el disacárido sambubiosa, son más estables que aquellos conteniendo monosacaridos. Antocianinas conteniendo galactosa son más estables que aquellas con arabinosa. Antocianinas acetiladas en el anillo pirilio (C₂) son más estables, debido a la reducción del ataque nucleofílico del agua [Brouillard et al., 1982, p.8]. Antocianinas aciladas con un grupo malonil en C₆ o con un grupo acil en C₃ de la glucosa unida en R₁ estabilizan la molécula de antocianina [Figueiredo y otros, 1999, p. 125]. Cuando se encuentran aciladas en R₄ y R₅ presentan estabilidad hasta pH neutro.

El patrón de sustitución de los grupos hidroxilo y metoxilo en la aglicona (antocianidina) altera el comportamiento químico de la molécula. Incremento en la hidroxilación de la aglicona estabiliza la antocianidina, mientras que incremento en la metilación de grupos hidroxilo (principalmente en C_{4'} y C₇) disminuye la estabilidad. El patrón de sustitución de grupos hidroxilo y metoxilo no afecta únicamente la estabilidad, sino también el color de la antocianina. Las antocianinas

simples más estables son cianidina-3-glucósido, seguido de peonidina-3-glucósido [Cabrita y otros, 1999].

Los antocianósidos contenidos en *Hibiscus sabdariffa* contienen como glúcidos al disacárido samburiosa (compuesto por xilosa y glucosa), el cual resulta en una antocianina más estable en pH, temperatura y condiciones oxidantes que aquellos conteniendo glucosa. Así mismo, la estabilidad de las antocianinas de Rosa de Jamaica se ve favorecida por sus características estructurales, debido a la mayor proporción del cianidina-3-glucósido, el cual es la más estable de las antocianinas, y la unión a disacáridos, que aumenta la estabilidad a pH neutro.

3.1.4. Farmacocinética

3.1.4.1. Absorción

Las antocianidinas (Agliconas) son hidrofóbicas, por lo que pueden difundirse pasivamente a través de membranas biológicas, sin embargo su unión a azúcares determina sus propiedades biológicas, condicionando su mecanismo de absorción, ya que incrementa su solubilidad en agua y limita su difusión pasiva, por lo que se necesita de un transportador activo del antocianósido o hidrólisis del glucósido y su posterior conjugación para llevarse a cabo la absorción y distribución necesaria para ejercer una actividad biológica [Manach y varios, 2005, p. 230].

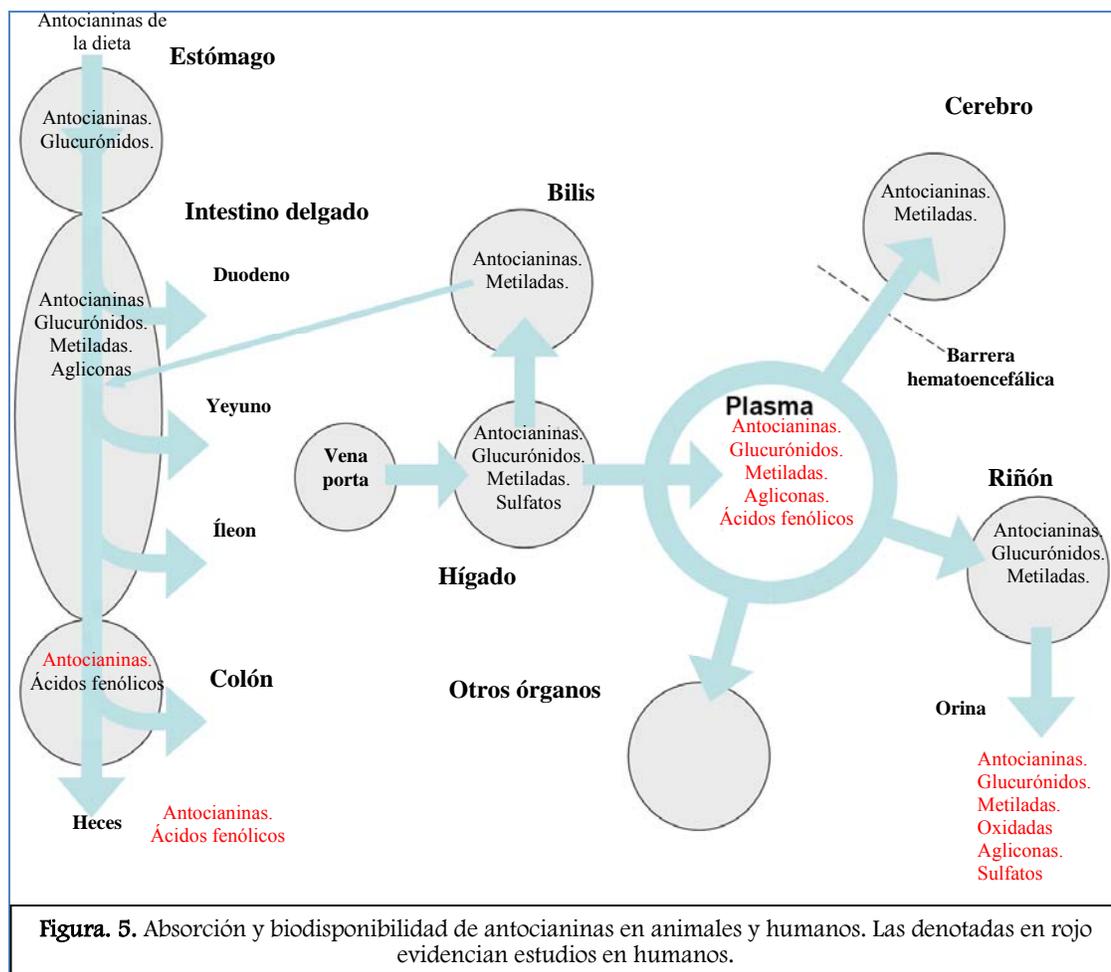
Las concentraciones de antocianinas no cambian después de digestión gástrica, sin embargo existe una porción que es producto de hidrólisis (ácida, enzimática por el borde en cepillo intestinal, y actividad microbiana) en estómago e intestino delgado, produciendo agliconas (antocianidinas), las cuales son absorbidas por difusión pasiva [Wallace y varios, 2011, p. 1]. El problema de éste tipo de absorción es que las antocianidinas al transportarse a un pH neutro, se descomponen a ácido protocatélico [Tsuda y varios, 1999, p. 179], el cual resulta ocho veces mayor en sangre que las antocianinas. El estómago absorbe una porción de antocianósidos a partir de la bilitranslocasa gástrica, un transportador transcelular localizado en las células secretoras de moco y células parietales, que aumenta su afinidad por

la antocianina al contener porciones glucosídicas (principalmente monosacáridos y disacáridos unidos al C₃) [Passamonti y varios, 2003, p. 210]. Esto explica la farmacocinética de antocianinas, ya que la concentración plasmática máxima se observa 0.5-2 horas después de su administración oral, que corresponde al tiempo necesario para vaciar el estómago de un contenido líquido; así mismo, se observa una curva bifásica en la concentración plasmática a 15 minutos después de su administración debido a una primera absorción gástrica, seguida de una porción intestinal [Prior y varios, 2004, p. 1; Kong y varios, 2003, p. 923].

A nivel intestinal, existen 2 mecanismos para el transporte de antocianinas al enterocito duodenal: 1) Transporte de antocianósidos intactos por medio de transportadores ABC (P-glicoproteína (ABCB1), Proteínas de resistencia a multifarmaco MRP1 (ABCC1) y MRP2 (ABCC2), y la proteína de resistencia de Cancer de Mama ó BCRP (ABCG2)) [Ahmed-Belkacem y varios, 2005, p. 4852]; ó 2) Hidrólisis extracelular del glucósido por medio de la enzima lactasa-floricina-hidrolasa en el borde en cepillo intestinal para que la aglicona entre por difusión pasiva al enterocito [Manach y varios, 2005, p. 230]. En el yeyuno se absorbe una gran porción al enterocito a partir de bilitranslocasa localizada en la membrana apical [McGhie y varios 2007, p. 702]. Una fracción de antocianinas escapa de la absorción en el duodeno y se somete a metabolismo bacteriano en el iléon, donde se liberan las agliconas que pueden metabolizarse o transportarse.

En el colón, los antocianósidos entran a las células Caco-2 por medio de bilitranslocasa localizada en la membrana apical [Passamonti y varios, 2002, p. 631]. Los transportadores ABC B1 (P-glicoproteína), C2 (MRP2) y G2 (BCRP) se encuentran en la membrana apical de las células del intestino, mientras los que se encuentran en la membrana basolateral son los transportadores ABC C1 (MRP1) y C3 (MRP3), de los cuales únicamente C1 (MRP1) transportan antocianinas (MRP3 transporta aniones orgánicos); existiendo una eficiente entrada de antocianinas a las células, pero bajo transporte a la circulación, debido a saturación de transportadores, lo que explica la poca biodisponibilidad de las antocianinas (menos del 1% de la

cantidad ingerida entra al plasma) y su alta presencia en orina y heces. Existe la hipótesis que la grasa de la dieta favorece la absorción de antocianinas debido a transporte por lipoproteínas [Lesser y varios, 2004, p. 8).



3.1.4.2. Distribución

Las antocianinas se encuentran en el plasma en forma de Antocianinas, Glucuronidos, antocianinas Metiladas, antocianidinas, y ácidos fenólicos. La concentración plasmática de antocianinas parecer ser insuficiente para alterar el potencial redox o de radicales, pero resulta adecuada para transducción de señales y/o expresión de genes. En el plasma sanguíneo y orina, debido al pH neutro las formas predominantes son la Carbinol (75-80%) y chalcona (15-20%), produciéndose una alta degradación a derivados fenólicos [Wallace, 2011, p. 4]. Alcanzan concentraciones plasmáticas a los

15-30 minutos. De las antocianinas ingeridas, el 44% se encuentran como ácido protocatéquico en el plasma [Vitaglione, 2007, p. 2043].

3.1.4.3. Metabolismo

Las antocianinas encontradas en plasma se encuentran en forma de antocianósidos (transportados por bilitranslocasa), conjugadas con ácido glucurónico (por UDP-glucuronosil transferasas), metiladas (por catecol-O-metil-transferasas), sulfatadas (sulfotransferasa) y agliconas (producidas por hidrólisis ácida ó microbiana y β -glucosidasas del enterocito) [Wu y varios, 2002, p. 1875; Felgines, 2005, p. 7221]. Luego de la digestión pancreática de 15-21% de antocianinas se encuentran en sangre, y de 52-67% en el colón (de las cuales se eliminan como ácidos fenólicos). Antocianinas aciladas muestran una mayor estabilidad ante digestión pancreática [Harada, 2004]. El principal medio de metabolismo son los riñones e hígado. Los glucurónidos formados en el intestino entran en la circulación directamente y no son transportados a la bilis (a diferencia de los glucorónidos sintetizados en el hígado), mientras que aquellos que son sulfatados en el intestino o en el hepatocito se excretan vía renal [Wallace, 2011, p. 5].

3.1.4.4. Excreción

La excreción urinaria promedio es del 0.03 al 4% de la dosis ingerida, teniendo una vida media de eliminación de 1.5 a 3 horas [Kay, 2006, p. 137]. Su excreción se realiza a nivel renal y fecal.

3.1.4.5. Biodisponibilidad

La biodisponibilidad es la proporción de principio activo que es absorbido del tracto gastrointestinal, alcanza la circulación sistémica en forma de concentraciones plasmáticas, y alcanza el sitio de acción para ejercer un efecto fisiológico [Balant y varios, 1991]. Antocianinas cruzan el epitelio intestinal con una eficacia de 1 a 4%, sin embargo el transporte es incrementado junto con etanol o exposición crónica a antocianinas. Con algunas excepciones, concentraciones plasmáticas máximas no exceden rangos nanomolares y menos del 1% son encontradas en orina como formas no metabolizadas [Faria, 2009, 1430; Yi y varios, 2006, p. 5651].

3.1.4.6. Inicio de Acción, Concentración Plasmática Máxima y Vida media

Las antocianinas presentan un inicio de acción de 15-30 minutos, con una concentración plasmática máxima de 0.5 a 4 horas. Presentan una vida media de 1.3 a 7 horas [Dreiseitel, 2011, p. 12].

En un estudio de Rosa de Jamaica [Netzel y otros, 2005, p. 203], se determinó que al administrar una dosis única vía oral de 62.6 mg de cianidina-3-sambubiósido, 81.6 mg de delfindina-3-sambubiósido, y 147.4 mg de antocianinas totales (calculados como equivalentes de cianidina), se observan tasas máximas de excreción a 1.5-2 horas después de la administración, con área bajo la curva de 0.076, 0.032, y 0.050 ng-h/mL/mg para cianidina-3-sambubiósido, delfindina-3-sambubiósido, y antocianinas totales, respectivamente. Después de 7 horas, la excreción urinaria de cianidina-3-sambubiósido, delfindina-3-sambubiósido y antocianinas totales fue de 0.016%, 0.021%, y 0.018% de las dosis administradas, respectivamente. El $t_{1/2}$ fue de 2.18, 3.34, y 2.63 para cianidina-3-sambubiósido, delfindina-3-sambubiósido y antocianinas totales, respectivamente. La excreción urinaria es monoexponencial.

3.1.5. Usos terapéuticos y Farmacología

Las interacciones responsables de los usos terapéuticos de las antocianinas se realizan a partir de: 1) Inhibición de Proteínas unidas a ATP, como Protein Quinasa C (PKC), Fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos (MAPK), quinasas c-Jun N-terminal (JNK), Quinasas Dependientes de Ciclinas (CDK), Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS) y Topoisomerasas I y II; 2) Inhibición de Receptores dependientes de ligandos, como Receptores de estrógenos y Receptores tirosina quinasas (Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR) y Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGFR)); 3) inhibición de Enzimas Redox, como Lipoxigenasas (LOX), cicloxigenasas (COX), xantina oxidasa (XO), metaloenzimas que catalizan la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS); 4) Modulación de proteínas reguladoras, como Proteína Transportadora de Esteres de Colesterol (CETP), glicerol-3-fosfato-acil-transferasa 1

(GPAT1), Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) [Andersen & Markham, 2006, p. 477].

3.1.5.1. Efecto sobre los lípidos sanguíneos

Estudios in vitro han demostrado como los compuestos antioxidantes de la Rosa de Jamaica desempeñan una disminución en la patogénesis de la aterosclerosis al evitar la oxidación de LDL. Entre estos compuestos se ha demostrado en diferentes estudios al ácido protocatéquico y los antocianósidos [Chang B y otros, 2009, p. 1096]. El extracto acuoso seco de la flor de Rosa de Jamaica, a concentraciones entre 0.1 y 5mg/mL, inhibió de forma dosis-dependiente la oxidación de las LDL en un proceso mediado por Cu^{2+} . A la dosis más alta también se inhibió la formación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico con mayor potencia que la vitamina E a $100\mu\text{M}$, lo cual demuestra el potente efecto antioxidante in vitro [Hirunpanich V, y otros, 2006, p. 252].

Se han estudiado el efecto que ejerce un extracto de Rosa de Jamaica administrado al 5% y 10% durante 9 semanas a ratas albinas macho alimentadas previamente con una mezcla de colesterol y ácido cólico durante 12 semanas; el efecto hipolipemiente fue evidente en cuanto a la disminución de lípidos totales, colesterol y triglicéridos [El-Saadany y otros, 1991, p. 567]. Otros estudios demuestran que en conejos a los que se les indujo aterosclerosis a base de una dieta alta en colesterol y manteca de cerdo, presentaron niveles más bajos de colesterol total, LDL y triglicéridos en el suero después de ser tratados con un extracto acuoso seco de hibisco al 0.5 y 1.0% con la dieta durante 10 semanas [Chen C y varios, 2003, p. 5472]. El examen histopatológico reveló una reducción significativa de la aterosclerosis aórtica severa, por lo que estos resultados sugieren que la rosa de Jamaica inhibe la formación de las placas de ateroma. Estudios confirman el efecto hipolipemiente de la administración intragástrica de un extracto acuoso seco de flor de Rosa de Jamaica en ratas sometidas a dietas ricas en colesterol, observándose una disminución importante de éste en un 22% y 26% según la dosis del extracto (500 y 1000mg/Kg respectivamente); los triglicéridos séricos descendieron un 33% y 28% y el de LDL se redujo

un 22% y 32%. Sin embargo, el nivel sérico de las HDL no se vio afectado. Resultados similares se han dado en ratas alimentadas con dieta complementada con 5, 10 y 15% de extracto etanólico de flor de hibisco, ya que al compararlos con el grupo control, los tratamientos disminuyen los lípidos totales, triglicéridos y LDL; el colesterol total solo disminuyó con el complemento al 5%, las HDL y los fosfolípidos no se modificaron.

El efecto en reducir el colesterol de la Rosa de Jamaica se ha comprobado en un ensayo clínico en el que participaron 42 pacientes con edades comprendidas entre los 18 y 75 años y unos niveles de colesterol entre 175 y 327 mg/dL. Los extractos fueron administrados por vía oral en cápsulas con 500 mg de extracto acuoso seco de flor de hibisco con una dosis de antocianósidos de 20, 40 y 60mg en diferentes grupos por 4 semanas, obteniendo mejores resultados el grupo con 20mg, con un descenso entre el 8.3 y 14.4% [Lin y varios, 2007, p. 140]. Generalmente la dosis terapéutica diaria de Extracto de Rosa de Jamaica es de 10g/L [Gurrola y varios, 2010, p. 500].

Su actividad hipolipemiente se define por aumento en la concentración de HDL y disminución de LDL y triglicéridos. La capacidad de los antocianósidos por aumentar concentraciones plasmáticas de HDL y disminuir LDL, se debe a la inhibición de la Proteína Transportadora de Esteres de Colesterol (CETP), con lo que se promueve y facilita el transporte reverso de colesterol, proceso por el cual por flujo de salida se extrae el colesterol de macrófagos, células espumosas y placas ateroscleróticas, y éste es entregado de regreso al hígado y eliminado como sales biliares [Qin y varios, 2009, p. 485]. La capacidad de los antocianósidos por disminuir triglicéridos plasmáticos se debe a la inhibición de la enzima glicerol-3-fosfato-acil-transferasa 1 (GPAT1), produciendo disminución en la síntesis de triglicéridos y con ello reduciendo el riesgo de enfermedad arterial coronaria [Guo y varios, 2011, p. 908].

3.1.5.2. Efecto sobre la coagulación sanguínea

La prevención de la trombosis se explica mediante 2 acciones, previniendo la formación de trombos debido a que su actividad antioxidante disminuye la oxidación de LDL [Elwood y otros, 1991, p. 38; Renaud y otros, 1992, p. 1012], y reduciendo la coagulación debido a inhibición en la activación plaquetaria producida por inhibición en la fosforilación de trombina (a partir de inhibición de Fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), p38 proteínas quinasas activadas por mitógenos (p38 MAPK), y proteína quinasa C (PKC). Esta actividad se ve potenciada por los ácidos fenólicos producidos por el metabolismo de las antocianinas dentro del organismo [Rechner & Kroner, 2007, p. 327].

3.1.5.3. Efecto sobre la presión arterial

La actividad antihipertensiva de la Rosa de Jamaica está mediada por su capacidad diurética, su capacidad reguladora (inhibición de la enzima convertidora de angiotensina) y su capacidad por relajar el músculo liso (bloqueo colinérgico y histaminérgico (Adegunloye et al., 1996, p. 235) e inhibición de los canales de calcio por quercetina (Salah et al., 2002, p. 283)). Las antocianinas de la Rosa de Jamaica son inhibidores competitivos de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA). Esto sumado a su propiedad diurética, las hace efectivas en hipertensión.

3.1.5.4. Efecto sobre la diabetes

Su actividad hipoglicémica se debe a su capacidad de liberar insulina producto de la inhibición de Fosfoinositol 3-quinasa (ya que la PI3K disminuye la secreción de insulina) [Collier y varios, 2004], y por medio de la inhibición de COX-2 (ya que la COX-2 aumenta la resistencia celular a insulina) [Bhosh & Konishi, 2007, p. 200].

3.1.5.5. Efectos sobre la Función hepática

La reducción de hígado graso no alcohólico se debe a la disminución en la síntesis de triglicéridos producido a partir de la activación por fosforilación de la Proteína Quinasa C Zeta (PKC ζ), la cual fosforila la subunidad β de la

ATPasa mitocondrial, inhibiendo a su vez la translocación de la enzima glicerol-3-fosfato-acil-transferasa 1 (GPAT1) del retículo endoplásmico a la membrana mitocondrial de los hepatocitos [Guo y otros, 2011, p. 908].

3.1.5.6. Efectos sobre Problemas Oculares

El mejoramiento de la visión se debe a la actividad regeneradora de rodopsina en la membrana de los segmentos externos de los bastones de la retina [Ghosh & Konishi, 2007, p. 200], mientras que la disminución en la presión ocular se debe a que la inhibición de la Proteína C-quinasa (PCK) produce relajación del musculo ciliar [Thieme, 1999, p. 3254].

3.1.5.7. Efectos sobre los radicales libres

Protegen al corazón de daño isquémico al actuar como antioxidantes, previniendo la formación de especies reactivas de oxígeno, y por tanto previniendo la muerte celular producida por alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial de cardiomiocitos [Ahmet y varios, 2009, p. 1].

3.1.5.8. Efectos sobre la inflamación

Son antiinflamatorios y antirreumáticos, al inhibir y regular la expresión de COX-2, al inhibir la Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS), al inhibir la Lipoxigenasa (5-LOX), al inhibir la transcripción de Factor Nuclear (NF- κ B), al inhibir citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-10, MCP-1, MRP-1 y MRP-9) y al disminuir la expresión de moléculas de adhesión (LPS y TNF α) [Hou y varios, 2004, p. 321]. Las antocianinas inhibidoras de moduladores de la inflamación (p38 MAPK, JNK: quinasas c-Jun N-terminal) deben de poseer un grupo hidroxilo en R₁ [Weinstein y varios, 1992, p. 14955; Hou y varios, 2004, p. 321].

3.1.5.9. Efectos sobre el Cáncer

El efecto anticancer de las antocianinas de Rosa de Jamaica está mediado por sus agliconas y por uno de sus metabolitos, el ácido protocatéquico [Ali, 2010, p. 369], ya que reducen el daño microsomal (a partir de su actividad antioxidante al reducir Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)), inhiben la

angiogénesis (reduciendo el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) a partir de la inhibición de TNF- α , inhibición de NF- κ B, antagonismo con el Receptor de tirosina quinasa de VEGF (VEGFR-2), formación de ROS [Afaq y varios, 2005; Bagchi y varios, 2004]), inducen la apoptosis (a partir de la inhibición de MAPK y NF- κ B [Weinstein et al., 1992, p. 14955; Hou et al., 2005, p. 321], la activación de caspasa-3 [Hsu & Lin, 2009, p. 283] y la inhibición de topoisomerasas I y II [Habermeier, 2005, p. 1395]), inhiben la invasión de células cancerosas (reducción de la expresión de Metaloproteinasas de la Matriz (MMP) y Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA)) [Malik y varios, 2003, p. 186], inhiben fases del ciclo celular (bloqueo de fases G₁/G₀ y G₂/M) [Lazzé y varios, 2004, p. 1427], modulan proteínas reguladoras (ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas, P21, P27, P53 [Malik y varios, 2003, p. 186]), inhiben receptores tirosina quinasas (Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR) y Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGFR)) [Dreiseitel, 2011, p. 19]. Las antocianinas se unen al receptor de estrógeno α , activan la expresión del gen dependiente de estrógenos luciferasa y aumenta la proliferación de líneas celulares sensibles a estrógenos, lo que disminuye el riesgo de cánceres relacionados con hormonas [Schmitt y varios, 2001, p. 145]. La afinidad por el Receptor Estrógeno α disminuye en presencia de grupos hidroxilo en el anillo B.

Las antocianinas han demostrado reducción de la proliferación y prevención de cáncer de mama, colorrectal, esofágico, piel y pulmón [Wang & Stoner, 2008, p. 281].

3.1.6. Toxicidad

El número de estudios toxicológicos de antocianinas es limitado. Un estudio de ingesta diaria admisible de antocianinas en uva se determinó entre 0-2.5mg/Kg, sin embargo no se ha hecho un estudio para antocianinas en general [WHO, 1982]. Para cianidina y delfinidina se ha reportado carencia de mutagenicidad. La LD50 de una mezcla de cianidina, delfinidina y petunidina fue entre 20-25g/Kg [Pourrat, 1967, p. 33]. En ratón 500mg/Kg de antocianinas vía oral produjeron efectos sedantes, 100-

200mg/Kg de antocianinas vía parenteral produjeron hipotensión y descenso en la amplitud respiratoria, y a 25/mg/Kg se reportaron efectos diuréticos [Pourrat, 1967, p. 33]. La toxicidad subcrónica de antocianinas por 3 meses no mostraron toxicidad en animales con dosis orales de 6g/día [Pourrat, 1967, p. 33; Nabae, 2008, p. 774; Becci, 1983, p. 75]

La LD50 de extractos de cáliz de *H. sabdariffa* fue alrededor de 5000mg/Kg (Onyenekwe et al., 1999), sugiriendo que el extracto es considerado no tóxico. En ratas el promedio de consumo de 150-180mg/Kg/día de un extracto etanólico acuoso de cálices de *Hibiscus sabdariffa* resultó seguro, sin embargo a dosis mayores se elevaron algunas enzimas plasmáticas que indican la función tisular, como alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa (Akindahunsi y Olaleye, 2003, p. 161). Sin embargo la actividad de las enzimas plasmáticas fosfatasa alcalina y lactato deshidrogenasa no fue alterada, ni se evidenció daño tisular al corazón o hígado de las ratas experimentadas.

3.1.7. Fitoquímica

3.1.7.1. Extracción

Las antocianinas se extraen en medio ácido para mantener la estabilidad del ión flavilio. Se pueden utilizar solventes acuosos de acetona, metanol y etanol. Generalmente se extraen con metanol conteniendo ácido trifluoroacético 0.5% a 5°C [Mazza y varios, 2007, p. 369]. La determinación cualitativa y cuantitativa puede realizarse por medio de HPLC acoplado a espectrómetros de masas o RMN [Mazza y varios, 2007, p. 369]. Las dificultades relacionadas con la determinación de antocianinas están generalmente asociadas a la preparación de la muestra antes del análisis. La extracción de tejidos secos se realizan mediante mezclas de agua/metanol acidificadas con ácido clorhídrico, trifluoroacético o fórmico, sin embargo condiciones altamente ácidas producen hidrólisis de la unidad glicosídica del antocianósido (Mazza et al. 2007, p. 369).

La extracción de Rosa de Jamaica puede realizarse macerando los cálices frescos con agua, metanol ó etanol acidificados, a 20°C por 7 días. Se realiza evitando el calor para evitar que las antocianinas se degraden [Gurrola y varios, 2010, p. 500], sin embargo, en 2 estudios se concluyó que

mientras mayor sea la temperatura mejor se extraen las antocianinas. A una temperatura de 60°C por 30 minutos se obtuvo mayor concentración de antocianinas que a 50°C, mientras que por 60 minutos, tanto a 50°C como 60°C, se obtuvo una concentración menor [Chumsri y varios] Los tiempos óptimos de extracción son de 240 minutos a 25°C ó 16 minutos a 90°C, siendo equivalentes en concentración de antocianinas entre sí [Ramirez-Rodriguez, 2011, p. 428].

3.1.7.2. Purificación

Los extractos de planta cruda generalmente contienen grandes cantidades de carbohidratos y material lipídico, y pequeñas cantidades de compuestos fenólicos. Para concentrar el extracto y obtener fracciones de polifenoles antes del análisis, se debe seguir una secuencia de partición líquido-líquido y/o extracción en fase sólida (SPE) basada en polaridad y acidez. En general, la eliminación del material lipídico se logra lavando el extracto crudo con un solvente no polar como hexano, diclorometano, acetato de etilo o cloroformo. Para remover los compuestos polares no fenólicos, como azúcares ó ácidos orgánicos, se realiza la extracción en fase sólida utilizando los cartuchos C18, los más utilizados en separación de compuestos fenólicos. Los cartuchos C18 son pretratados con etanol al 100% seguido de agua acidificada con HCl al 0.01% [Malik, & Zhao, 2003, p. 186], ó con metanol acidificado con ácido trifluoroacético 0.1% seguido con agua acidificada con ácido cítrico al 0,01M. Al pasar la muestra acidificada por el cartucho pretratado, las antocianinas y otros compuestos fenólicos se unen por adsorción al cartucho C-18, por lo que se lava con agua para eliminar los azúcares y ácidos orgánicos, y luego las antocianinas son extraídas del cartucho con un lavado con etanol acidificado con HCl 0.01% ó metanol acidificado con ácido trifluoroacético 0.1%. El solvente alcohólico que contiene las antocianinas se evapora a 40° C, y los solutos se disuelven en 10ml de agua desionizada acidificada con HCl 0.01%.

La purificación de rosa de Jamaica se realiza al inyectar un volumen de 25 µl en una columna de Zorbax C18 (250mm x 4.6mm x 5µm), con elución de gradiente isocrático de 50:50:0.01 (v/v) metanol:agua:ácido trifluoroacético

por 20 minutos a 1mL/min usando un sistema de HPLC Termo Finigan. Las antocianinas se identifican comparando los tiempos de retención y los picos de la muestra con estándares de ciandina y delfinidina [Gurrola, et al, 2010, p. 500].

3.1.7.3. Identificación

La absorción espectral de las antocianinas depende del pH. A pH igual o menor a 2, soluciones de antocianinas presentan una absorción máxima característica, una en la región ultravioleta (aproximadamente 260-280nm) y dos en la región visible (aproximadamente 415 y 490-540nm). Las longitudes de onda de los picos de absorbancia pueden diferir mínimamente por unos nanómetros dependiendo de la estructura de cada antocianina. La máxima absorción de antocianinas totales se realiza entre 520 y 540nm [Harborne, 1958, p. 1]. El solvente utilizado en la determinación espectral afecta ligeramente la posición de las bandas de absorción, por lo que debe de tomarse en cuenta al comparar los resultados. Las antocianinas experimentan transformaciones estructurales reversibles con un cambio en el pH, lo cual se manifiesta con variaciones en la absorbancia espectral. La forma coloreada del ión flavilio predomina a pH 1.0, mientras que la incolora forma hemiacetal predomina a pH 4.5. Es importante tomar en cuenta éste fenómeno para la determinación de antocianinas, por lo que existe un método diferencial, relativamente preciso para medir el total de antocianinas, incluso en la presencia de pigmentos polimerizados y degradados que puedan interferir. Para ello deben de prepararse dos soluciones, una con HCl 0.2N para preparar un buffer a pH 1.0, y otra con HCl 1N y acetato de sodio para preparar un buffer de 4.5 [Bangdal et al. 2006, Wrolstad et al. 1982]. La absorbancia real de antocianinas en la muestra es calculada usando la siguiente fórmula: $A = (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{pH4.5}$. La $A_{\lambda_{max}}$ es la absorbancia de antocianinas a longitud de onda máxima y A_{700} es la absorbancia donde se ha determinado que absorben fenoles y otros productos de degradación.

La separación con HPLC combinada con detector de arreglo de diodos (DAD) es el método más utilizado para análisis cualitativo y cuantitativo de

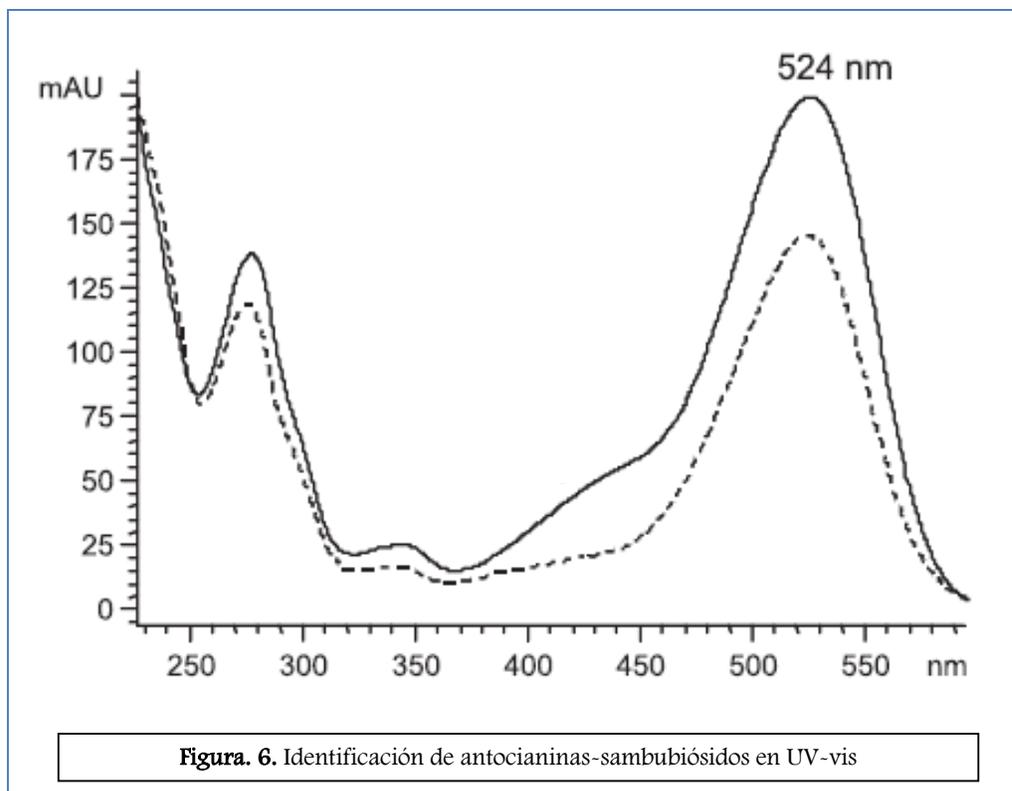
antocianinas [Gao & Mazza, 1994], en un rango entre 200-800nm. La detección de la longitud de onda se realiza entre 520-540nm, o 200-800nm cuando está disponible DAD. Las columnas utilizadas en el análisis de antocianinas son fase reversa de 4.6mm de diámetro interno y 100-300mm de longitud. Las columnas son usualmente mantenidas a temperatura ambiente y los sistemas de elución son binarios, usando solventes acuosos acidificados como ácido acético, perclórico, o fórmico, en un solvente orgánico como metanol o acetonitrilo [Dugo et al. 2001, Zhang et al. 2004]. En el sistema de fase reversa, los ácidos fenólicos más polares eluyen primero, seguido de antocianinas 3,5-diglicosiladas, antocianinas 3-monoglicosiladas, agliconas, y por último antocianinas aciladas. El orden de elución de las antocianidinas en columnas de fase reversa es delfinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina y malvidina [Gao & mazza, 1994] con distintas longitudes de onda (*ver tabla 1*).

Antocianina	Sustitución		Color visible	Visible max (nm) en MeOH-HCl
	R ₃ '	R ₅ '		
Pelargonidina	H	H	Rojo	520
Cianidina	OH	H	Magenta	535
Delfinidina	OH	OH	Morado	546
Peonidina	OCH ₃	H	Magenta	532
Petunidina	OCH ₃	OH	Morado	543
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	Morado	542

Tabla 1. Estructura de antocianinas en el catión flavilio (adaptado de [Mazza & Miniati, 1993]).

La identificación de antocianinas puede realizarse a 520-522nm (Juliani, H, 2009, Escribano-Bailón, 2004), con un dato espectral de 490-590nm, con un detector de fotodiodo (UV6000). La identificación de las antocianinas predominantes de la Rosa de Jamaica, Cianidina-3-sambubiósido y Delfinidina-3-sambubiósido, se realiza a 516 y 524nm, respectivamente (Escribano-Bailón, et al, 2004), con un hombro a 440nm (*ver figura 6*).

La cuantificación puede realizarse con la siguiente formula $\%p/p = (A/\epsilon L) \times MW \times (V/Wt) \times 100$, donde, ϵ = absorptividad molar de la delphinidin-3-glucoside (23700), MW = masa molecular de antocianinas (518.5), DF = factor de dilución, V = volumen final (mL), Wt = peso de la muestra (mg), y L = longitud de la celda (1 cm).



3.2. LÍPIDOS SANGUÍNEOS

3.2.1. Aspectos Generales

Los triglicéridos (TG), los fosfolípidos y el colesterol, son los principales lípidos del organismo. Se transportan en el plasma como complejos de lípidos y proteínas especializadas (apoproteínas) conocidos como lipoproteínas. Las lipoproteínas plasmáticas son partículas esféricas compuestas por un núcleo, que consta de Triglicéridos y ésteres de colesterol; y una superficie, donde se encuentran los fosfolípidos, el colesterol libre y las apoproteínas (Talbert & Florez, 1997, p. 664). Existen cuatro clases principales de lipoproteínas plasmáticas, que varían en

densidad de acuerdo con la concentración alcanzada por sus diversos componentes lipídicos y proteicos. Son los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL) -subclasificadas en LDL1 o IDL y LDL2- y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) -subclasificadas en HDL2, HDL3 y HDLc-. El mayor contenido de Triglicéridos se encuentra en los quilomicrones y en las VLDL, mientras que el mayor contenido de colesterol se encuentra en las LDL. Existen distintos tipos y subtipos de apoproteínas que difieren en su peso molecular y funciones; las Apo-B -de elevado peso molecular- no emigran de una partícula a otra, mientras que las Apo-A y Apo-C -de bajo peso molecular- son transferidas de unas lipoproteínas a otras; siendo la Apo-AI la principal proteína de las HDL y la Apo-B la principal proteína de las LDL.

3.2.2. Fisiología de los lípidos sanguíneos

La homeostasis de los lípidos sanguíneos se logra gracias a un equilibrio entre los procesos de ingestión, absorción, síntesis, intercambio y excreción. Todos estos procesos se encuentran estrechamente interconectados y, cambios en cualquiera de ellos, pueden influenciar los otros de forma significativa.

3.2.2.1. Absorción

El intestino delgado controla la absorción y excreción del colesterol dietético (una cuarta parte) y biliar (tres cuartas partes) [Dietschy, 1997, p. 1581], mientras que en el intestino delgado los triglicéridos realizan únicamente su absorción. Los ácidos biliares emulsionan el colesterol y resto de grasas de la dieta formando micelas que permiten el transporte del colesterol y triglicéridos al interior del enterocito yeyunal. Los receptores transportadores que median este proceso no han sido caracterizados, si bien un reciente estudio [Hansen y Cols, 2003, p. 1414] parece involucrar a SR-BI, un receptor que se expresa en la membrana luminal del enterocito, además de en el hígado y tejidos esteroideogénicos. Otros investigadores involucran en este proceso de transporte a la proteína Niemann-Pick C1-like 1 [Wang, 2006, p. 221].

3.2.2.2. Síntesis

El hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria son los tres sitios principales donde se lleva a cabo la biosíntesis de los ácidos grasos y los triglicéridos. El hígado es el órgano central para la interconversión y su metabolismo. La síntesis de ácidos grasos se lleva a cabo en el citosol de las células activas y el producto activo para la síntesis es el acetil CoA proveniente de la glucosa vía glucólisis. A esta ruta también se le conoce como “síntesis de novo” o síntesis completa. El acetil CoA se sintetiza en el interior de las mitocondrias pero no puede salir hacia el citosol, por lo que se condensa con el oxalacetato que se difunde hacia el citosol. En el citosol, el acetil CoA tiene dos funciones importantes: es el iniciador de la síntesis de novo y, es la base para la elaboración de las unidades de malonil CoA. Malonil CoA es el donador de unidades carbonadas con las cuales crece el ácido graso en síntesis. Ambos productos entran en la ruta de la sintetasa de los ácidos grasos. La síntesis de un ácido graso se inicia por el extremo del carbono metileno (CH₃) y termina en el extremo del carbono carboxílico (COOH). En la síntesis de ácidos grasos, el malonil CoA es sintetizado a partir de la carboxilación del acetil CoA. Esta reacción es mediada por un complejo enzimático, la acetil CoA carboxilasa, que contiene biotina. En esta reacción de carboxilación, actúa como intermediario el CO₂ ligado covalentemente a la biotina unida a la enzima, formando un complejo llamado carboxibiotina. La reacción de carboxilación del acetil CoA a malonil CoA, es lo que regula la velocidad de la síntesis de los ácidos grasos.

Se considera habitualmente que el hígado es el órgano más importante en el mantenimiento de los niveles circulantes de colesterol, pero parece ser responsable del 15% de su síntesis de novo [Dietschy, 1997, p. 1581], corriendo el 85% restante a cargo de tejidos extrahepáticos. La síntesis hepática de colesterol es el resultado final de una larga serie de reacciones enzimáticas cuya velocidad está controlada por el enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) reductasa que regula el paso de HMG-CoA a mevalonato. El colesterol sintetizado de novo es liberado a la circulación vía VLDL.

Estudios recientes han demostrado que la familia de factores de transcripción SREBPs (proteínas fijadoras del elemento regulador de esteroides) juega un papel crucial en la regulación hepática de la síntesis de colesterol, ya que activan la expresión de más de 30 genes relacionados con la síntesis y absorción de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos [Horton, 2002, p. 1125]. La activación de los SREBPs estimula tanto la síntesis de lípidos como la expresión del receptor de LDL, y su efecto neto sobre los niveles plasmáticos de colesterol depende del balance entre estos dos efectos.

Entre los factores de transcripción que regulan genes implicados en la homeostasis del colesterol (incluidos los SREBPs) se encuentran los receptores X hepáticos LXR α y LXR β . En el hígado, los LXRs disminuyen la síntesis de colesterol a través de sus efectos sobre la expresión de SREBP-2 y otros genes colesterogénicos. En el intestino, los LXRs parecen jugar un papel importante en la absorción del colesterol dietario al aumentar la expresión de algunos miembros de la familia de transportadores ABC. La activación de LXRs también estimula la producción de LPL (lipoprotein lipasa), el enzima limitante en el metabolismo de las partículas ricas en Triglicéridos, y la expresión de I-BABP (proteína ileal de unión a ácidos biliares) que media el transporte de ácidos biliares desde el enterocito a la luz ileal. De esta forma, la regulación coordinada de múltiples genes vía LXRs resulta en un incremento de la eliminación de colesterol, aumento de la síntesis y disminución de la absorción. Se considera que el efecto neto de la activación de LXR sería el de proporcionar protección ante concentraciones elevadas de colesterol en los tejidos [Gylling H, 2004, p. 851]. El contenido intracelular de colesterol libre refleja el balance entre colesterol sintetizado por la célula o transportado a ella, la tasa de conversión de colesterol libre en esterificado y la tasa de salida de la célula. El contenido de colesterol libre intracelular es el principal modulador de la síntesis de colesterol celular y de receptores para LDL. Cuando es alto, se inhibe tanto la síntesis de receptores como de colesterol por la enzima HMG-CoA reductasa. Además, el colesterol activa la

enzima ACAT, promoviendo la esterificación y depósito del exceso de colesterol.

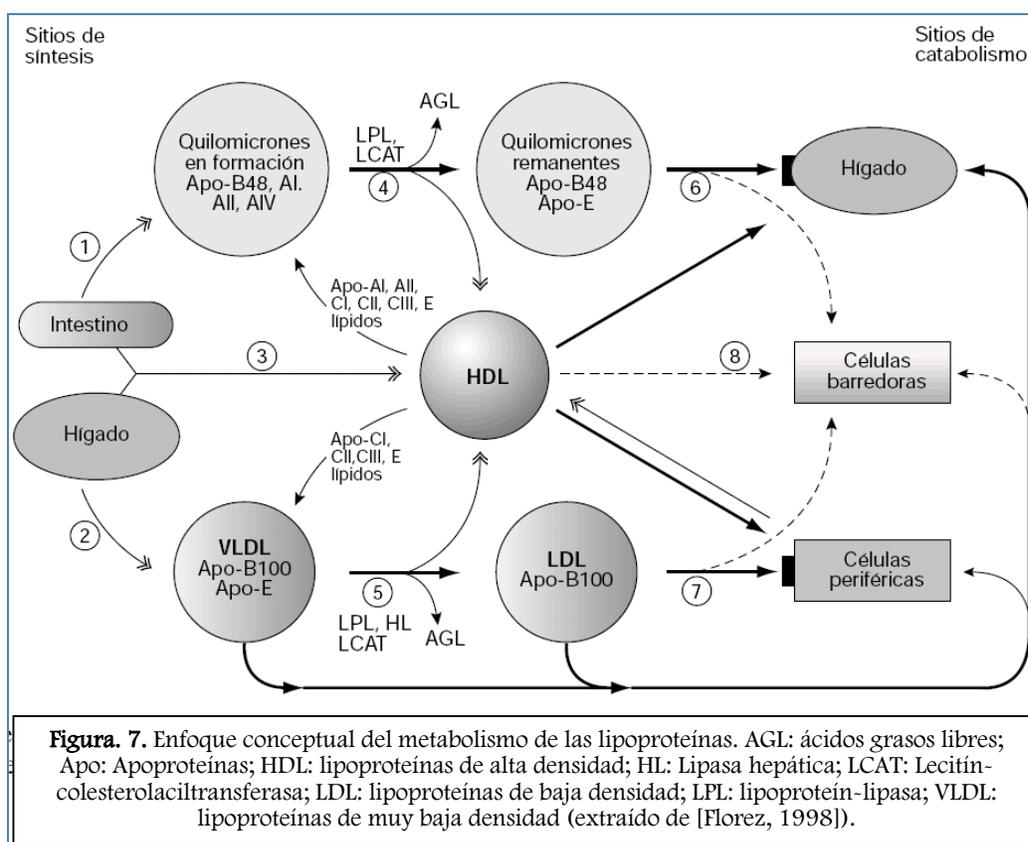
3.2.2.3. Transporte

El colesterol y triglicéridos son transportados en el plasma debido a su interacción con proteínas específicas denominadas apoproteínas. Los ácidos grasos están ligados principalmente a la albúmina. Las alteraciones en la concentración y en el contenido de las lipoproteínas plasmáticas reflejan la existencia de muy diversas perturbaciones en el metabolismo de sus componentes, sean primarias o secundarias, pero, a su vez, estas mismas alteraciones lipoproteicas constituyen importantes factores de riesgo de aparición de consecuencias patológicas, como la aterosclerosis en sus diversas localizaciones, las pancreatitis y ciertas enfermedades neurológicas. Las lipoproteínas plasmáticas forman partículas esféricas compuestas por un núcleo, que consta de triglicéridos y éster de colesterol, y una superficie, donde se encuentran los fosfolípidos, el colesterol libre y las apoproteínas. Existen cuatro clases principales de lipoproteínas plasmáticas que varían en densidad de acuerdo con la concentración alcanzada por sus diversos componentes lipídicos y proteicos (ver tabla 2); éstos son los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se subclasifican en LDL1 o IDL y LDL2, y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que se subclasifican en HDL2, HDL3 y HDLc.

Lipoproteína	Composición (peso %)				
	Proteínas	Triglicéridos	Colesterol libre	Colesterol éster	Fosfolípidos
Quilomicrón	1-2	85-95	1-3	2-4	3-6
VLDL	6-10	50-65	4-8	16-22	15-20
LDL	18-22	4-8	6-8	45-50	18-24
HDL	45-55	2-7	3-5	15-20	26-32

Tabla 2. Composición de las lipoproteínas transportadoras de lípidos (adaptado de [Florez, 1998, p. 688]).

El mayor contenido de triglicéridos se encuentra en los quilomicrones y en las VLDL, mientras que el mayor contenido de colesterol se encuentra en las LDL. Cada clase de lipoproteína tiene características propias en sus mecanismos de síntesis, metabolismo y función, pero algunos de sus componentes lipídicos y proteicos también son intercambiados y derivados entre ellas. Las apoproteínas tienen un peso molecular variable y ejercen distintas funciones, bien como elementos estructurales o como cofactores enzimáticos. Las denominadas B tienen un elevado peso molecular y no emigran de una partícula a otra, mientras que las de bajo peso molecular (las A y las C principalmente) son transferidas de unas lipoproteínas a otras. En la figura 7 se expone un esquema simplificado del metabolismo de las lipoproteínas y de su relación entre ellas.



Quilomicrones

Se forman en la mucosa del intestino. Los triglicéridos se sintetizan a partir de los glicéridos y ácidos grasos derivados de la digestión de la grasa, por

un proceso de reesterificación (figura 7, paso 1). También se incorpora el colesterol que es parcialmente esterificado por la lecitín-colesterolaciltransferasa (LCAT). En el propio intestino se sintetizan las apoproteínas B48, AI, AII, AIV y otras, originándose las partículas que pasan al espacio linfático y, a través del conducto torácico, penetran en la sangre. Los quilomicrones se aprecian en el plasma en condiciones normales sólo en las horas siguientes a la ingestión de comida, siendo modificados por catabolismo tisular en el que interviene una lipoproteín-lipasa (activada por la apo-CII) y una lipasa hepática (paso 4). Durante este proceso, los triglicéridos liberan ácidos grasos libres que entran directamente en los tejidos (3/4) o quedan en el plasma (1/4). Los fosfolípidos de superficie y las apoproteínas pequeñas (AI, AII y C) son transferidos a las HDL, y el resto de quilomicrones remanentes, que contienen la apo B48 y la apo E, son captados por receptores específicos de las células hepáticas mediante un mecanismo de endocitosis (paso 6). Este proceso de captación puede ser regulado por diversos factores. En el hepatocito, los ésteres de colesterol son hidrolizados y el colesterol es eliminado en la bilis, oxidado en ácidos biliares, o vertido de nuevo al plasma en las lipoproteínas.

VLDL

Se forman en el hígado a partir, fundamentalmente, de las apo-B100 y de los triglicéridos sintetizados en los hepatocitos (ver figura 7, paso 2). Posee también apoproteínas C y E, de origen hepático o en intercambio con las HDL. Los triglicéridos y fosfolípidos de las VLDL son hidrolizados por la lipoproteín-lipasa y por la lipasa hepática. A lo largo de este proceso, las apo C y E pasan a las HDL, mientras que las apo-B100 quedan en las partículas. Por consiguiente, las VLDL pierden triglicéridos mientras que aumenta la proporción de colesterol, parte del cual es esterificado por la LCAT; dan origen así a las LDL (ver figura, paso 5). La síntesis hepática de VLDL está aumentada en las personas obesas, está regulada por la dieta y las hormonas, y puede ser inhibida por los remanentes de quilomicrones captados por el hígado.

LDL

Son las principales portadoras de colesterol en el plasma humano normal. La mayoría parece derivar de las VLDL (ver figura 7, paso 5), aunque algunas quizá se sintetizan directamente. Su constituyente principal es la apo-B100. Son metabolizadas por células de diversos tejidos. Una vía metabólica es receptor-dependiente (Ver figura 7, paso 7); la LDL interactúa con un receptor de membrana y es internada por endocitosis; la apo-B es metabolizada y los ésteres de colesterol son hidrolizados, el colesterol libre es utilizado por la célula (p. ej., para la síntesis de membrana), pero tiene la capacidad de inhibir la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-reductasa (HMG-CoA-reductasa) que es la enzima limitante de la velocidad de síntesis intracelular del colesterol. Al mismo tiempo regula negativamente la síntesis de receptores LDL. Parte de las LDL son catabolizadas por vías independientes de la presencia de estos receptores.

HDL

Se forman en el hígado y en el intestino (ver figura 7, paso 3), pero parte de sus componentes lipídicos y proteicos derivan del catabolismo de los quilomicrones y las VLDL (ver figura 7, pasos 4 y 5). Las principales apoproteínas son AI y AII, y existen otras en menor proporción. Las HDL sirven como receptoras de lípidos, sobre todo del colesterol libre que recoge de diversos tejidos. En ellas, la enzima LCAT convierte el colesterol libre en éster y la lecitina en lisolecitina. Desde las HDL, los ésteres de colesterol pueden ser transferidos a otras lipoproteínas como tales o mediante transporte junto con pequeñas apoproteínas. Existen tres subtipos de HDL: las HDL2, HDL3 y HDLc; las HDL2 son probablemente las principales responsables de la existencia de la correlación inversa entre los niveles de HDL y el riesgo de enfermedad coronaria, siendo mayor su concentración en mujeres que en varones. La lipasa hepática interviene en el metabolismo de los fosfolípidos y triglicéridos de las HDL, siendo el hígado y el riñón los principales órganos en que son catabolizadas. Cuando las lipoproteínas plasmáticas están elevadas o son anormales en su composición pueden ser recogidas por células «barredoras» de diversos tejidos (paso 8), produciendo xantomas, linfadenopatías, hepatosplenomegalia, etc.

3.2.2.4. Eliminación

Aproximadamente la mitad del colesterol se elimina a través del hígado al formar ácidos biliares [Gylling H, 2004, p. 859]. Además, el hígado transporta el exceso de colesterol al intestino para excreción fecal y provoca la conversión de VLDL a LDL y triglicéridos como fuente de energía para tejidos extrahepáticos.

3.2.3. Alteración de lípidos sanguíneos (Dislipidemias)

La dislipidemia, alteración de los niveles de lípidos sanguíneos, es considerada el principal factor de riesgo cardiovascular (RCV). Este hecho ha sido demostrado en estudios epidemiológicos, coronariográficos y de investigación clínica [Velasco, 2000, p. 1095]. La fuerte asociación entre dislipidemia y morbi-mortalidad por cardiopatía isquémica y otras enfermedades cardiovasculares se observa tanto en varones como en mujeres, independientemente de la edad y de la raza. En cuanto a la fracción HDL (Lipoproteínas de alta densidad), también está demostrada su asociación inversa con episodios isquémicos; concentraciones reducidas incrementan la mortalidad en personas sanas o con enfermedad coronaria preexistente [Bengston C, 1973, p. 121; Aronow, 1994, p. 702; Wong, 1989, p. 469]. Por otro lado, los triglicéridos (TGs) representan un factor de riesgo cardiovascular independiente, y se asocian a un incremento del riesgo de un 30 % en el varón y hasta un 75 % en la mujer [Hokanson, 1996, p. 213].

El nivel de colesterol a partir del cual se considera Hipercolesterolemia (HC) es controvertido y, en la actualidad, se diferencia en función del Riesgo Cardiovascular (RCV) y el antecedente de evento cardiovascular (cardíaco o cerebrovascular). Para el cálculo del RCV se dispone de diferentes tablas o formularios en los cuales se introducen una serie de parámetros (edad, sexo, niveles de CT, cLDL, cHDL, Triglicéridos, diabetes mellitus, consumo de tabaco, presencia de hipertrofia ventricular izquierda, etc.) y se obtiene un valor numérico que representa el riesgo de desarrollar un evento cardiovascular durante los diez años subsiguientes. Entre las tablas de cálculo del RCV se encuentra la de Framingham [Kannel WB y cols, 1971] que, en la actualidad, es la de uso más extendido. Sin embargo, dado que el estudio Framingham se realizó sobre población norteamericana, se cree que sobreestima el

cálculo cuando se aplica a la población guatemalteca. Se habla de hipercolesterolemia límite cuando existen valores de Colesterol Total >200 mg/dL, y de hipercolesterolemia definida cuando hay valores de Colesterol Total >240 mg/dL. En sujetos diabéticos y en prevención secundaria (sujetos que ya han sufrido un evento cardiovascular) se habla de hipercolesterolemia definida con valores de CT >200 mg/dL. Es decir que es deseable que el Colesterol Total sea <200 mg/dL. Por encima de 240 mg/dL siempre se considera Hipercolesterolemia, y valores entre 200-240 son los que hay que individualizar con el resto de factores RCV y hacer un cálculo del RCV para decidir la conveniencia del tratamiento. Los triglicéridos, en todos los casos, deben encontrarse por debajo de 200 mg/dL.

La hipertrigliceridemia si es moderada, suele deberse a aumento de VLDL (tipo IV), y si es intensa, a aumento de quilomicrones (tipo I), o aumento de quilomicrones y VLDL (tipo V), o aumento de beta-VLDL (tipo III). Las concentraciones de Triglicéridos superan los 200 mg/dL, en presencia de concentraciones plasmáticas de colesterol inferiores a 200 mg/dL. Existen distintos rangos de triglicéridos según la American Heart association, siendo el nivel normal menor a 150 mg/dL, de 150-199 mg/dL se encuentra en rango de límite alto, superior a 200 mg/dL se encuentra en nivel alto, y superior a 500 mg/dL se considera muy alto.

3.2.4. Fisiopatología de dislipidemias

La disfunción endotelial está presente tanto en pacientes con aparente arteriosclerosis como en aquellos con factores de riesgo cardiovascular como hiperlipidemia, diabetes mellitus, hipertensión arterial, etc. Tal es así que estudios recientes demuestran que el estudio de la función endotelial en la circulación coronaria y general puede ofrecer información pronóstica sobre un futuro desarrollo de eventos cardiovasculares [Heitzer, 2001, p. 2673]. Bajo condiciones normales existe un equilibrio entre los factores producidos por el endotelio, lo que implica un equilibrio entre la contracción y la relajación de la musculatura de los vasos, entre los procesos de coagulación y de proliferación celular.

La hipertrigliceridemia familiar es una alteración relativamente frecuente. Su prevalencia estimada está en torno al 0,5-1% de la población general y del 5% entre

los supervivientes de infarto de miocardio. Aunque el defecto bioquímico no está identificado, la consecuencia metabólica es el aumento de la síntesis hepática de triglicéridos, sin aumento paralelo de la síntesis de la apo B lo que provoca una mayor secreción al plasma de VLDL, de tamaño superior al normal y con un alto contenido en Triglicéridos (fenotipo IV de la clasificación fenotípica de la OMS). Este hecho conduce a una hipertrigliceridemia si el aclaramiento no es eficiente. En la hipertrigliceridemia familiar, las VLDL grandes son metabolizadas de forma deficiente por la enzima lipoprotein lipasa (LpL), ya sea debido a la presencia de defectos menores en la enzima o por alteraciones estructurales de las propias VLDL, lo que ocasiona una disminución de la afinidad de la partícula hacia la LpL. También cabe la posibilidad de que un aumento importante de la síntesis hepática de VLDL sature la capacidad de la LpL, que al ser igualmente responsable de la hidrólisis de los triglicéridos de los Qm daría lugar a que se eleven también los quilomicrones ocasionando una hipertrigliceridemia con fenotipo V. Por otra parte, el alargamiento de la vida media de las VLDL favorece la transferencia de ésteres de colesterol desde las lipoproteínas de alta densidad (HDL) hacia las VLDL, proceso mediado por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), y que explica las concentraciones bajas de colesterol de HDL característica de esta enfermedad. La lipólisis defectuosa de las VLDL provoca una menor formación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), con lo que el colesterol LDL de los pacientes con hipertrigliceridemia familiar es habitualmente bajo. Este hecho ayuda a diferenciar esta alteración de la hiperlipemia familiar combinada, en la que el colesterol LDL suele hallarse elevado.

Entre los principales factores que contribuyen a la disfunción endotelial en la hipercolesterolemia se encuentran: (1) la disminución de la actividad y/o expresión de la eNOS y/o (2) el aumento de la producción de radicales libres del oxígeno a nivel vascular y/o (3) el aumento de la dimetil-arginina asimétrica (ADMA). Los estudios en modelos animales y humanos han demostrado que la enfermedad vascular y la arteriosclerosis inducidas por la hipercolesterolemia se caracterizan por una precoz y selectiva disminución de la relajación dependiente del endotelio, consecuencia de un descenso en la biodisponibilidad de NO. En la fase inicial del proceso existe una pérdida selectiva de respuesta de la síntesis de NO a estímulos extracelulares mediados por receptor (p.e. acetilcolina), sin afectación de la

capacidad de activación máxima de la enzima ni de la degradación del NO. A medida que la enfermedad progresa, se produce una inhibición inespecífica de la biodisponibilidad de NO que, aunque probablemente de origen multifactorial, implica un bloqueo acelerado de esta molécula por aniones superóxido. Como resultado de estos procesos se incrementan la adhesión de neutrófilos al endotelio, la agregación plaquetaria y la proliferación de células del músculo liso, eventos clave en el desarrollo de arteriosclerosis. [Hamilton, 1997, p. 55].

La disfunción de la vasodilatación dependiente del endotelio se incrementa por la coexistencia de diferentes factores de riesgo cardiovascular, dentro de los cuales los niveles de LDL y HDL colesterol en plasma se consideran determinantes [Böger , 1998, p. 1842]. La relación directa entre el LDL colesterol y el desarrollo de enfermedad coronaria está establecido, así como el papel protector frente a ella de la elevación del HDL colesterol. Sin embargo, la contribución del LDL colesterol al desarrollo de arteriosclerosis es particularmente compleja, y no aclarada en su totalidad, ya que existen pacientes con alto riesgo de desarrollar enfermedad coronaria que no presentan cifras elevadas de LDL. Tal es el caso de pacientes con elevado estrés oxidativo, hipertensión arterial, diabetes tipo 2, fracaso renal o fumadores, que presentan niveles normales de LDL. En este sentido, numerosos estudios han contribuido a establecer que el potencial aterogénico de las LDL se incrementa considerablemente como consecuencia de su modificación oxidativa [Rosenson, 2004, p. 1].

Una relación entre niveles de HDL y LDL colesterol y actividad de la eNOS ha podido establecerse gracias a recientes estudios realizados en células endoteliales, fracciones membranosas y animales de experimentación genéticamente modificados [Uittenbogaard, 2000, p. 11278]. La eNOS se encuentra normalmente localizada en caveolas ricas en colesterol donde forma parte de un módulo completo de señalización que incluye desde receptores extracelulares (entre los que se encuentran los de acetilcolina y estrógenos) hasta sistemas efectores intracelulares que regulan el nivel local de calcio. El microambiente lipídico y, concretamente, el contenido en colesterol de las caveolas, resulta fundamental tanto para la permanencia en ellas de la eNOS como para una actividad óptima del enzima [Uittenbogaard, 2000, p. 11278]. Experimentos “in vitro” han demostrado que el LDL oxidado (LDLox)

inhibe la activación de eNOS por acetilcolina disminuyendo, así, las respuestas mediadas por el NO [Blair, 1999, p. 32512]. De acuerdo con estos resultados, se ha comprobado que el LDLox, a través de su interacción con el receptor de clase B CD36, provoca una depleción de colesterol en las caveolas que lleva al desplazamiento selectivo de la eNOS (sin afectar su grado de fosforilación, palmitoilación o miristoilación) y, en consecuencia, a un descenso en su susceptibilidad a la activación [Blair, 1999, p. 32512].

Los efectos adversos del LDLox se previenen completamente por el HDL a través de su interacción con el receptor SR-BI, colocalizado con la eNOS en las caveolas [Uittenbogaard, 2000, p. 11278]. Vía esta interacción, el HDL repone el colesterol de las caveolas y restaura el microambiente lipídico necesario para la actividad de eNOS, al tiempo que la activa promoviendo su fosforilación vía quinasas src, PI3 y akt. De acuerdo con esta observación, el HDL es un potente activador de la eNOS en células endoteliales, favoreciendo fuertemente la vasorelajación dependiente de NO. Este mismo mecanismo explicaría el papel protector del HDL en la aterogénesis bajo condiciones en las que no existe elevación del LDL colesterol [Uittenbogaard, 2000, p. 11278].

A pesar de la relevancia del estrés oxidativo en el proceso de aterogénesis, no se han establecido claramente los eventos bioquímicos iniciales que desencadenan la hiperproducción de radicales libres en la hipercolesterolemia. Es posible que el propio descenso en la biosíntesis de NO, característico de las etapas iniciales de la disfunción endotelial, permita un aumento de la expresión regulada por citoquinas de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, ELAM) que faciliten la adhesión de neutrófilos al endotelio, la agregación plaquetaria y la proliferación de células del músculo liso, eventos clave en el desarrollo de arteriosclerosis [Rosenson, 2004, p. 1]. La acumulación de células de la inflamación puede aumentar el nivel de estrés oxidativo ya que son una rica fuente de radicales superóxido. Otros eventos desencadenantes de la hiperproducción temprana de ROS en la hipercolesterolemia serían la activación de NF- κ B y de sistemas enzimáticos generadores de superóxido como la NAD(P)H oxidasa, sensibles tanto a los niveles de colesterol como al estado redox [Rojas A y cols, 2006]; otra fuente de superóxido sería la actividad de la eNOS “desacoplada”. A medida que la enfermedad progresa se instaura claramente la

situación de estrés oxidativo como consecuencia de un proceso de amplificación al que contribuyen, por un lado, la generación de LDLox, mucho más efectivo que el LDLn en producir daño endotelial y, por otro, el bloqueo acelerado del NO por los aniones superóxido generando peroxinitrito [Rosenson, 2004, p. 1].

La oxidación de las partículas LDL parece jugar un papel central en el proceso aterogénico [Rosenson, 2004, p. 1]. Diferentes factores determinan la especial susceptibilidad a la oxidación de las LDL; entre ellos se encuentran el tamaño y composición de las partículas LDL y la relación especies prooxidantes/antioxidantes, tanto de la propia partícula como del medio circundante. Las partículas LDL muestran una gran heterogeneidad en tamaño, densidad y composición. Las pequeñas y densas son las de mayor potencial aterosclerótico, debido a su mayor facilidad para atravesar la pared vascular y quedar atrapadas en la matriz extracelular, tras adherirse a proteoglicanos [Rosenson, 2004, 2]. Además las partículas pequeñas de LDL, son más susceptibles a la oxidación como consecuencia de su menor contenido en antioxidantes (particularmente α -tocoferol y ubiquinona) en su superficie [Rosenson, 2004, p. 2]. Bajo tales condiciones, las partículas LDL son una diana fácil para el ataque por los radicales libres generados por células endoteliales y macrófagos a nivel de las lesiones ateroscleróticas, tal y como se ha observado en la íntima de vasos ateroscleróticos de humanos [Rosenson, 2004, p. 2]. Las HDL podrían prevenir parcialmente la oxidación de LDL debido, probablemente, a los enzimas que lleva asociados, como paraoxonasa [Navab, 2000, p.1495].

El LDLox provoca la liberación de sustancias pro-inflamatorias como MCP-1 e IL-8 por células endoteliales y/o macrófagos. De esta forma provoca la quimiotaxis de monocitos dentro de la pared del vaso para convertirse en macrófagos que, una vez cargados de lípidos, se transforman en células espumosas, componentes celulares muy abundantes en las placas ateroscleróticas. En el estudio AIR (Arteriosclerosis y resistencia insulínica), el LDLox se asoció a arteriosclerosis subclínica y niveles elevados de mediadores de la inflamación como TNF α y PCR (proteína C reactiva) [Rosenson, 2004, p. 1].

Otro mecanismo que contribuye a la amplificación y diversificación de radicales reactivos durante el progreso de la lesión arteriosclerótica implica a la NOS. Los

macrófagos activados presentes en el área lesionada expresan el isoenzima inducible (iNOS), capaz de producir grandes cantidades de NO, que rápidamente interactúa con el anión superóxido para formar peroxinitrito, un intermediario altamente reactivo. La reacción para formar peroxinitrito se produce a una elevada velocidad, tres o cuatro veces más rápida que la dismutación de superóxido por la superóxido dismutasa. El peroxinitrito, además de reducir la disponibilidad de NO, a elevadas concentraciones es citotóxico y produce daño oxidativo a proteínas, lípidos y DNA, que suele evaluarse por la presencia de residuos de nitrotirosina. El aumento de iNOS y nitrotirosina en las lesiones arterioscleróticas de conejos hipercolesterolémicos evidencia la importancia de este mecanismo en la Arteriosclerosis [Hayashi, 2006, p. 10485]. Numerosas evidencias indican que, bajo ciertas condiciones experimentales, tanto la eNOS como la iNOS pueden ser también una fuente importante de iones superóxido. Para ello se requiere el “desacoplamiento” del enzima. En el estado desacoplado, los electrones que fluyen desde el dominio reductasa hasta el dominio oxigenasa de la NOS son desviados al oxígeno molecular en lugar de a la arginina (el sustrato normal), resultando en la producción de superóxido en lugar de NO. El desacoplamiento de la NOS se ha observado habitualmente bajo condiciones de limitada disponibilidad de arginina o del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) [Heitzer, 2000, p. 2673].

El desacoplamiento de NOS podría ser importante en la hipercolesterolemia y otras situaciones de riesgo cardiovascular, ya que está perfectamente establecido que la administración exógena de arginina o BH4 mejora la disfunción endotelial e, incluso, retrasa o revierte la progresión de las lesiones ateroscleróticas en éstas situaciones [Böger, 1998, p. 1842; Hayashi, 2006, p. 10485]. Respecto a los factores implicados en el desacoplamiento de la NOS, estudios en células endoteliales han establecido que tanto el LDLn [Pritchard, 1995, p. 510] como, y principalmente, el LDLox [Vergnani, 2000, p.1261], son capaces de estimular la producción endotelial de anión superóxido (y disminuir la de NO) vía interacción con el receptor LOX-1 [Cominacini, 2001, p. 13750]. En todos estos estudios, los efectos fueron revertidos por la adición de LNAME, un inhibidor de la eNOS, o arginina, el sustrato habitual del enzima.

El aumento de peroxinitrito podría mediar la oxidación del cofactor de la NOS, tetrahidrobiopterina (BH₄) [Heitzer, 2001, p. 2673], e inactivarlo como cofactor al producir dihidrobiopterina (BH₂) [Laursen, 2001, p. 1082], o podría oxidar directamente el núcleo zinc-tiolato de la eNOS, produciendo la liberación de zinc desde la enzima [Zou, 2002, p. 817]. Cualquiera de las dos posibilidades conduciría al desacoplamiento de la NOS. El aumento de ADMA (dimetilarginina asimétrica) observado durante la incubación de células endoteliales con LDLn u LDLox podría contribuir al desacoplamiento de la NOS [Böger, 2000, 1842].

La ADMA es un inhibidor endógeno de la NOS que, en la actualidad, está recibiendo considerable interés por su posible contribución a la disfunción endotelial. La concentración normal de ADMA en plasma es del orden de 1-2 μ M, habiéndose descrito elevaciones en distintas patologías tales como hipertensión, hiperlipemia, hiperhomocisteinemia, enfermedad coronaria, oclusión arterial periférica, fallo cardíaco congestivo, accidentes cerebrovasculares, hipertensión pulmonar, enfermedad renal avanzada, etc. Además, la ADMA parece ser un predictor de mortalidad cardiovascular o mortalidad por cualquier causa en pacientes con insuficiencia renal crónica y eventos coronarios agudos. No está claro si la ADMA es un marcador de enfermedad cardiovascular o, por el contrario, es un factor predisponente [Sydow, 2003, p. 41].

El origen del posible aumento de ADMA en la hipercolesterolemia todavía es desconocido. A nivel metabólico, los diferentes derivados metilados de la arginina derivan de la degradación de proteínas con residuos de arginina metilados, que posteriormente son degradados enzimáticamente y eliminados vía renal. En este sentido, la elevación de ADMA podría ser debida a un aumento de su síntesis o disminución de su degradación, a una disminución de su eliminación y/o a una modificación en los niveles de metabolitos recursos.

Diferentes estudios han demostrado que la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de ADMA (proteína-arginina N-metiltransferasas (PRMTs) y dimetil-arginina dimetilaminohidrolasa (DDAH), respectivamente) es regulada por las condiciones redox. Así, la expresión génica de PRMTs en células endoteliales en cultivo se incrementa en presencia de LDLn y LDLox de forma dosis-dependiente

[Böger, 2000, p. 1842], y la activación génica se bloquea en presencia de pirrolidina ditiocarbamato, un antioxidante intracelular.

El aumento de la concentración de ADMA en células endoteliales en cultivo o en pacientes con disfunción endotelial se asocia con aumento de la producción de radicales libres del oxígeno [Sydow, 2003, p. 41]. Se desconoce si la elevación de ADMA es causa o consecuencia del aumento del estrés oxidativo. La actividad de las enzimas PRMTs y DDAH es sensible al estado redox. Por lo tanto, el estrés oxidativo a nivel endotelial podría estimular la producción de ADMA y/o inhibir su degradación. A su vez, tanto el estrés oxidativo como el aumento de ADMA podrían contribuir al desacoplamiento de la eNOS, facilitando su participación en la generación de superóxido con una consiguiente retroalimentación positiva. Aún debe establecerse la concentración de ADMA mínima capaz de interactuar con la eNOS “in vivo”.

3.2.6. Causas de dislipidemias

El defecto genético responsable de la alteración es aún desconocido, aunque existen diversos genes candidatos y no se ha podido identificar una alteración o mutación única. Se ha establecido que la enfermedad podría transmitirse a través de un mecanismo autosómico dominante. Se ha observado que en los pacientes afectados las mutaciones en el gen de la LpL son frecuentes y dan lugar a una enzima con actividad disminuida. El gen de la LpL es particularmente propenso a mutaciones y se han descrito cerca de 40 mutaciones de este gen de las que algunas se localizan en el segmento C terminal (residuos 313 a 448) y alteran la función del ligando, y otras en el dominio N (del residuo 1 al 312), que deprimen la función enzimática lipolítica y disminuyen el catabolismo de VLDL, lo que ocasiona la acumulación de estas partículas en el plasma y la disminución de las HDL. No obstante, se desconoce por el momento el peso específico que estas mutaciones tienen en causa de la hipertrigliceridemia familiar. Se conocen tres mutaciones localizadas en el dominio N. De ellas la Asp9Asn y la Asn291Ser, cuya prevalencia en su forma heterocigota es del 3-5%, se asocian a un aumento del 20-30% de los Triglicéridos séricos, una reducción de colesterol de HDL y un aumento del riesgo de cardiopatía isquémica (riesgo relativo: 1,3). Por otra parte, la Gly188Glu, la menos frecuente (1/ 1.000), es la que más deprime la actividad enzimática, induce un mayor aumento de los

Triglicéridos (80%), una mayor disminución del colesterol de HDL y un aumento más importante del riesgo coronario (riesgo relativo: 5/1). El polimorfismo Ser447Ter, que se localiza en la zona C terminal y afecta la función del ligando, reviste un especial interés porque, además de ser la más frecuente (su prevalencia en la población general es del 20%), se asocia a concentraciones relativamente mayores de las HDL, menor aumento de los Triglicéridos (8%) y consecuentemente menor riesgo de enfermedad coronaria (riesgo relativo: 0,8).

Como causas secundarias de Hipercolesterolemia se encuentran numerosas patologías. Así, el pobre control glucémico, la resistencia a la acción periférica de la insulina y la obesidad van a determinar la aparición de alteraciones lipídicas en la diabetes mellitus. Entre ellas, la más frecuente es la hipertrigliceridemia, por aumento en la síntesis hepática de VLDL y disminución de la actividad de la LPL debido al defecto de insulina, lo que provocará un menor aclaramiento de VLDL y quilomicrones plasmáticos. En el hipotiroidismo, la base patogénica de la dislipemia parece residir en una alteración de la actividad de los receptores LDL, que disminuye ante los bajos niveles de tiroxina. Durante el embarazo o en el consumo excesivo de alcohol es frecuente la hipertrigliceridemia a expensas de VLDL; además, si la concentración de triglicéridos es elevada, se producirá un aumento del colesterol total y de sus fracciones. En la obesidad, la ingesta elevada de ácidos grasos saturados y colesterol reducirá la actividad de los receptores de LDL, al tiempo que la hiperproducción de VLDL favorecerá su transformación en LDL. En el síndrome nefrótico la dislipemia está relacionada con el incremento en la síntesis de apo B que acompaña al descenso en la concentración de albúmina sérica. A medida que la hipoalbuminemia se intensifica, la secreción hepática de VLDL se incrementa en respuesta a la llegada masiva de ácidos grasos libres al hígado. En la insuficiencia renal crónica, colestasis hepática y disfunción hepatocelular se produce un déficit progresivo de la actividad de la LCAT que genera HC, a expensas del colesterol no esterificado. Por otro lado, la elevación del cLDL que se observa cuando se determina por los métodos habituales, suele corresponder a la presencia de una lipoproteína anormal (LpX) originada en la regurgitación de la lecitina biliar hacia el plasma, donde se asocia con el colesterol libre, la albúmina y la apo C. De forma paralela se suele producir un marcado descenso de las HDL. Las dislipemias son también frecuentes en otras situaciones clínicas como paraproteinemia, toma

simultánea de fármacos como X-bloqueantes, diuréticos tiazídicos, hormonas esteroideas, derivados del ácido retinoico o fármacos inhibidores de las proteasas (terapia anti VIH).

3.2.7. Valores normales de lípidos sanguíneos

Las pruebas de los lípidos sanguíneos no deben llevarse a cabo durante situaciones de estrés o enfermedades agudas (como infarto de miocardio reciente, ictus, embarazo, traumatismo, pérdida de peso o utilización de algunos fármacos) y no deben efectuarse en pacientes hospitalizados hasta 2-3 meses después de la enfermedad. Los resultados anómalos de las pruebas de los lípidos sanguíneos siempre deben confirmarse con una nueva muestra, preferiblemente una semana después, antes de iniciar o modificar un tratamiento (Wallach, 2002, p. 666-678).

3.2.7.1. Colesterol-HDL sérico

La variación intraindividual puede ser entre 3.6 a 12.4%. Los valores normales se encuentran en hombres entre 33 y 59 mg/dL y en mujeres entre 39 y 59 mg/dL. Valores mayores de 60 mg/dL es un factor de riesgo negativo de coronariopatía. Se observan valores aumentados en ejercicio enérgico, aumento del aclaramiento de los triglicéridos (lipoproteínas de muy baja densidad –VLDL), consumo moderado de alcohol, tratamiento con insulina, tratamiento con estrógenos orales, enfermedades familiares de los lípidos con protección frente a la aterosclerosis. El colesterol HDL se considera disminuido a valores menores a 32 mg/dL en hombres o a 38 mg/dL en mujeres, lo cual puede ser a causa de estrés y enfermedades recientes (infarto agudo de miocardio, ictus, cirugía, traumatismos), inanición (la muestra sin ayuno es 5-10% inferior), obesidad, falta de ejercicio, hábito tabáquico, diabetes mellitus, hipotiroidismo e hipertiroidismo, hepatopatías agudas y crónicas, nefrosis, uremia, algunos fármacos (esteroides anabolizantes, progestágenos, betabloqueantes, antihipertensivos, tiazidas, neomicina y fenotiacinas), enfermedades genéticas (hipertrigliceridemia familiar, hipoalfalipoproteinemia familiar, enfermedad de Tangier homocigota, déficit familiar de lecitina-colesterol-aciltransferasa y enfermedad del ojo de pez, enfermedad de Niemann-Pick

no neuropática, déficit de HDL con xantomas planos y variantes I y II del déficit de apo A-1 y apo C-III.

3.2.7.2. Colesterol-LDL sérico

Menos de 100 mg/dL es el nivel óptimo de colesterol correspondiente a un nivel reducido de riesgo para cardiopatía isquémica. Entre 100 y 129 mg/dL es el nivel de LSL próximo al óptimo. Entre 130 y 159 mg/dL es lo fronterizo o limítrofe con alto nivel de LDL. Entre 160 a 189 mg/dL se considera un nivel alto de colesterol. Superior a 190 mg/dL son niveles excesivamente elevados, con un riesgo incrementado de cardiopatía isquémica. El aumento del colesterol-LDL se ve aumentado en hipercolesterolemia familiar, hiperlipemia combinada familiar, diabetes mellitus, hipotiroidismo, síndrome nefrótico, insuficiencia renal crónica, dieta rica en colesterol y en grasas totales y saturadas, embarazo, mieloma múltiple, disgammaglobulinemia, porfiria, enfermedad de Wolman, enfermedad de los depósitos de ésteres de colesterol, anorexia nerviosa, utilización de fármacos (esteroides anabolizantes, betabloqueadores, antihipertensivos, progestágenos, carbamacepina). Se ve disminuida en enfermedad de graves, abetalipoproteinemia, tratamiento con estrógenos por vía oral.

3.2.7.3. Colesterol total sérico

Se utiliza en el control del aumento del factor de riesgo de coronariopatía, detección de las hiperlipemias primarias y secundarias y en el control del tratamiento de las hiperlipemias. Existen interferencias en enfermedades, variación intraindividual, posición, estación del año, fármacos, cuando estos valores se utilizan para diagnosticar y tratar las hiperlipemias. La variación intraindividual puede ser entre 4 y 10% para el colesterol total sérico. Los valores repetidos del colesterol deben rondar los 30 mg/dL. Es preciso que el coeficiente de variación sea menor a 3%. Los valores del colesterol son hasta un 8% más elevados en invierno que en verano; un 5% más bajos si la muestra de sangre se obtiene cuando el paciente está en sedestación que cuando se encuentra en bipedestación, y un 10-15%

diferentes cuando el paciente se encuentra en decúbito frente a la bipedestación.

Se encuentran aumentados en hiperlipoproteinemias, hiperalfalipoproteinemia (enfermedad de los depósitos de ésteres de colesterol), obstrucción biliar, enfermedad de Von Ierke, hipotiroidismo, Nefrosis (debida a nefritis crónica, trombosis de la vena renal, amiloidosis, LES, periarteritis o glomerulosclerosis diabética), enfermedades pancreáticas (diabetes mellitus, pancreatocistomía total, pancreatitis crónica), embarazo, algunos fármacos (progestágenos, esteroides anabolizantes, corticoides, algunos diuréticos). Se encuentra disminuido en lesión grave de la célula hepática (debida a sustancias químicas, fármacos, hepatitis), hipertiroidismo, desnutrición, enfermedades mieloproliferativas, anemia crónica, tratamiento con cortisona y ACTH, hipobetalipoproteinemia y abetalipoproteinemia, enfermedad de Tangier, infecciones, inflamaciones, utilización de fármacos (hepatotóxicos como alopurinol, tetraciclinas, eritromicina, isoniacida e inhibidores de la monoaminooxidasa; inhibición de síntesis de andrógenos, clorpropamida, clomifeno y fenformina, clofibrato).

Colesterol mg/dL				
	LDL	HDL	TOTAL	LDL/HDL
Nivel deseable/riesgo bajo	<130	<60	<200	0.5-3.0
Nivel limítrofe/riesgo moderado	130-159	35-60	200-239	3.0-6.0
Nivel elevado/riesgo elevado	≥160	<35	≥240	>6.0

Tabla 3. Valores normales de Colesterol, HDL y LDL.

3.2.7.4. Triglicéridos

La variación diurna provoca niveles más bajos de triglicéridos por la mañana y más elevados en torno al mediodía. La variación intraindividual

de los triglicéridos séricos es del 12-40%; la variación analítica es del 5-10%. Según la asociación americana del corazón los límites normales con bajo riesgo de encuentran por debajo de 150 mg/dL, los límites arriba de lo normal son entre 151 y 199 mg/dL, los límites de 200 a 499 mg/dL son altos, mientras que arriba de los 500 mg/dL se encuentran muy altos, con alto riesgo. Los niveles de triglicéridos deben medirse con ayuno de 12 a 14 horas, ya que aumentan por un periodo de tiempo después de las comidas. Los niveles séricos se encuentran en un 80% en VLDL y en un 15% en LDL. Se encuentran aumentados en hiperlipemias genéticas, hiperlipemias secundarias, gota, pancreatitis, algunos fármacos (diuréticos tiacídicos, esteroides anabolizantes, colestiramina, corticoides, amiodarona e interferón), embarazo. Se encuentran disminuidos en abetalipoproteinemia, desnutrición, cambios dietéticos, pérdida de peso reciente, ejercicio enérgico, algunos fármacos (ácido ascórbico, clofibrato, fenformina, asparaginasa, metformina, progesterona, ácido aminosalicílico). Los triglicéridos no constituyen un predictor potente de aterosclerosis o coronariopatía y no son un factor de riesgo independiente. También están inversamente relacionados con los niveles de colesterol HDL.

3.2.8. Consecuencias de la alteración de lípidos

Las manifestaciones clínicas dependen de la concentración de Triglicéridos. Así, con concentraciones inferiores a 5,70 mmol/L (500 mg/dL) la mayoría de los pacientes no presentan manifestaciones externas de la enfermedad. En cambio, las infrecuentes concentraciones superiores a 11,40 mmol/L (1.000 mg/dL) en esta enfermedad pueden acompañarse de dolor abdominal, xantomas eruptivos, lipemia retinal, y hepatoesplenomegalia, con riesgo elevado de pancreatitis. El riesgo de estos enfermos de presentar cardiopatía isquémica prematura no está claro, es controvertido, ya que las partículas VLDL grandes no se consideran aterogénicas. Sin embargo, la frecuente coexistencia de concentraciones bajas de colesterol de HDL y la asociación con otras alteraciones mencionadas anteriormente, justifican los hallazgos de un riesgo cardiovascular elevado en estos individuos. Evidencias recientes sugieren que la relación entre la concentración de triglicéridos y el riesgo cardiovascular podría ser mayor que el previamente reconocido, posiblemente debido

a las alteraciones asociadas en el metabolismo lipídico. En un estudio de seguimiento durante 20 años se confirmó que las concentraciones iniciales de triglicéridos eran predictores de mortalidad entre familiares de primer grado de sujetos con hipertrigliceridemia familiar, independientemente de la concentración de colesterol y otras variables.

La principal consecuencia clínica de la hipercolesterolemia es el desarrollo de cardiopatía isquémica en cualquiera de sus formas: infarto agudo de miocardio o angina de pecho. La segunda entidad clínica en importancia sería la enfermedad cerebrovascular, cuya causalidad no está tan demostrada de forma directa. Otras entidades clínicas serían la disección y aneurismas de aorta, isquemia intestinal, insuficiencia renal, patología vascular periférica, tromboembolismo, disfunción eréctil, xantomas tendinosos y xantelasmas cutáneos. La base anatómo-patológica de todas estas formas clínicas radica en la placa de ateroma: una acumulación de células y partículas lipídicas que provoca un estrechamiento del vaso de forma significativa y una alteración del endotelio vascular que favorecerá su disfunción y progresión de la patología.

IV. JUSTIFICACIÓN

En algunos pacientes la simple reducción en la dieta de alimentos ricos en grasas saturadas, ocasiona la disminución de los niveles séricos de lípidos. Sin embargo, en un alto índice de individuos esto no es así, lo que obliga a la administración de medicamentos hipolipemiantes, como estatinas (inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa), las resinas de unión a ácidos biliares (colestiramina y colestipol) y los derivados del ácido fibríco o fibratos. Sin embargo, su alto costo y los efectos adversos que poseen, limitan su uso sobre todo en personas con bajo poder adquisitivo.

Guatemala no cuenta con estudios, que indique porcentaje de casos, prevalencias, ni programas de prevención, los cuales reducirían el índice de mortalidad de enfermedades coronarias y diabetes mellitus, mediante la información, el diagnóstico y tratamiento del Síndrome Metabólico; sin embargo, las enfermedades cardiovasculares (EC) son la causa principal de mortalidad y morbilidad en países desarrollados y va en camino de convertirse en un problema de salud significativo a nivel mundial (Scout 2004). En Guatemala en el año 2003, las enfermedades cardiovasculares se encontraron entre las causas de mortalidad prioritarias, dentro de las cuales infarto agudo del miocardio presentó una tasa de 1.73/10,000 hab., enfermedad cerebro vascular 1.34/10,000 hab., e hipertensión arterial 1.89/10,000 hab., de las cuales todas tienen como causa fisiopatológica el colesterol elevado.

El aumento en la incidencia de eventos cardiovasculares a nivel latinoamericano producidos por síndrome metabólico y la baja accesibilidad en salud en nuestro país necesita el uso racional de tratamientos farmacológicos accesible económicamente para la población y que posean actividad científicamente demostrada. La evidencia en guatemaltecos del potencial de plantas medicinales en los hábitos alimenticios como tratamiento y prevención de eventos cardiovasculares es de suma importancia para mejorar la calidad de vida de la población guatemalteca. El desconocimiento del potencial terapéutico de plantas medicinales ha llevado a la carencia de un uso racional de plantas que resuelva la creciente incidencia de hiperlipidemia producto de dietas inadecuadas e inaccesibilidad a medicamentos en la población. Los resultados de este ensayo clínico pretenden demostrar la eficacia de la Rosa de Jamaica como tratamiento alternativo para resolver la hipertrigliceridimia y un esquema de dosificación (momento de administración), con un alcance a mediano y largo plazo como tratamiento curativo y preventivo.

V. OBJETIVOS

5.1. Generales

5.1.1 Evaluar el efecto hipotrigliceridémico antes y durante las comidas de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* mediante parámetros bioquímicos en pacientes que presentan valores de triglicéridos superiores a 150 mg/dL .

5.2. Específicos.

5.2.1. Establecer las condiciones de extracción y parámetros de calidad para la elaboración del extracto de *H. sabdariffa* L.

5.2.2. Determinar la concentración promedio de antocianinas en el extracto de *H. sabdariffa* L. mediante métodos espectrofotométricos.

5.2.3. Establecer la relación entre concentración de antocianinas y actividad hipotrigliceridémica para el grupo “administración 30 minutos antes de las comidas” y para el grupo “durante de las comidas”.

VI. HIPOTESIS

- 6.1. “Existe actividad hipotrigliceridemiante en un extracto de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)”.
- 6.2. “El extracto de *H. sabdariffa* L. presenta mayor actividad hipotrigliceridemiante al administrarlo 30 minutos antes de las comidas”.

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo de trabajo

Docentes y Personal Administrativo de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala con triglicéridos sanguíneos superiores a 150 mg/dL.

7.1.1. Criterios de inclusión

7.1.1.1. Pacientes con diagnóstico triglicéridos sanguíneos superiores a 150 mg/dL.

7.1.1.2. Pacientes mayores de 25 años.

7.1.1.3. Carta de consentimiento para participar en el estudio.

7.1.1.4. Género masculino o femenino.

7.1.2. Criterios de exclusión

7.1.2.1. Pacientes renuentes a recibir el tratamiento experimental.

7.1.2.2. Pacientes con tratamiento farmacológico hipolipemiante, diuréticos tiacídicos, colestiramina, corticosteroides, amiodarona.

7.1.2.3. Pacientes que cambien sus hábitos alimenticios (dieta) o energéticos.

7.2. Medios

7.2.1. Recursos humanos

7.2.1.1. Investigador: Rodrigo Castañeda Molina.

7.2.1.2. Asesora: Licda. Sully Cruz Velázquez.

7.2.1.3. Revisora: MSc. Licda. Eleonora Gaitán Izaguirre.

7.2.2. Recursos Institucionales

7.2.2.1. Unidad de Salud, USAC

7.2.2.2. Laboratorio biológico de Unidad de salud Universidad de San Carlos de Guatemala

7.2.2.3. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

7.2.2.4. Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales (LIEXVE), Facultad de Ingeniería, USAC.

7.2.3. Material y Equipo

7.2.3.1. Papelería en general y útiles de oficina.

7.2.3.2. Equipo de computo (computador, impresora, internet)

7.2.3.3. Algodón

7.2.3.4. Alcohol

- 7.2.3.5. Guantes desechables
- 7.2.3.6. Jeringa
- 7.2.3.7. Tubos vacutainer
- 7.2.3.8. Banda Elástica
- 7.2.3.9. Reactivos de laboratorio
- 7.2.3.10. Carta de Consentimiento
- 7.2.3.11. Trifoliar informativo
- 7.2.3.12. Documentos de toma de datos Químicos y Clínicos
- 7.2.3.13. Extracto de Rosa de Jamaica
- 7.2.3.14. Espectrofotómetro UV-VIS
- 7.2.3.15. Potenciómetro
- 7.2.3.16. Marmita de concentración
- 7.2.3.17. Marmita de extracción
- 7.2.3.18. Desecadora
- 7.2.3.19. Goteros dosificados

7.3. Procedimiento

7.3.1. Análisis del material Vegetal (Rosa de Jamaica)

- 7.3.1.1. Adquisición del material vegetal (*Hibiscus sabdariffa* L.).
- 7.3.1.2. Realización del examen de Identidad de la droga vegetal (*H. sabdariffa* L.).
- 7.3.1.3. Secado y Molienda de la droga vegetal (*H. sabdariffa* L.).
- 7.3.1.4. Determinación del procedimiento de extracción para elaborar el extracto de *H. sabdariffa* L. a partir de sólidos totales.
- 7.3.1.5. Elaboración del extracto fluido de *H. sabdariffa* L por medio de un Rotavapor.
- 7.3.1.6. Determinación de la concentración de antocianinas a la longitud de onda de absorción máxima (entre 510-524nm) en un espectrofotómetro con corrección a 700nm a valores de pH de 1 y 4.5.
- 7.3.1.7. Realización de las pruebas de calidad del extracto de *H. sabdariffa* L.
- 7.3.1.8. Envasado y etiquetado del extracto de *H. sabdariffa* L. para administración en pacientes.

7.3.2. Evaluación de los valores de lípidos en sangre iniciales y distribución del extracto a los pacientes

7.3.2.1. Determinación de los valores sanguíneos de colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos, previos al tratamiento con el extracto de Rosa de Jamaica.

7.3.2.2. Distribución de los pacientes en forma aleatoria a uno de dos grupos, “administración 30 minutos antes de las comidas” y “administración durante las comidas”.

7.3.2.3. Entrega del Extracto de Rosa de Jamaica a los pacientes que cumplan con todos los criterios de inclusión y exclusión.

7.3.2.4. Inducción para la forma de administración, resolución de dudas, y comienzo del tratamiento (día 1 de tratamiento).

7.3.3. Determinación de los valores de lípidos en sangre durante el periodo de tratamiento con el extracto de Rosa de Jamaica

7.3.3.1. Determinación de los valores sanguíneos de colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos, después de cada mes de tratamiento con extracto de Rosa de Jamaica durante 2 meses (a los días 30 y 60 días de tratamiento).

7.3.3.2. Determinación de la actividad del extracto y diferencias entre grupos.

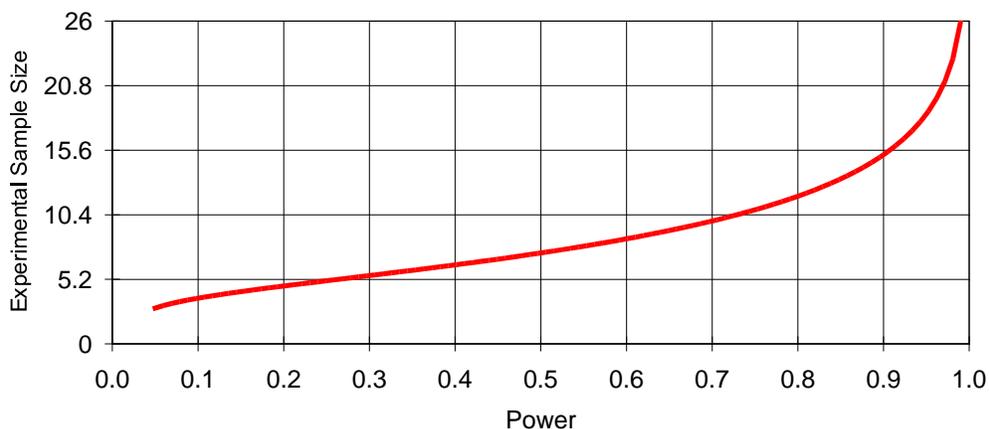
7.4. Diseño de la Investigación

7.4.1. **Tipo de Estudio:** Ensayo clínico: Experimental prospectivo, analítico y de intervención con aleatorización. Diseño pareado.

7.4.2. **Distribución:** Distribución aleatoria de los individuos en 2 grupos, “administración 30 minutos antes de las comidas”, y “administración durante las comidas”.

7.4.3. **Variables analizadas:** Concentración de antocianinas en Extracto de Rosa de Jamaica, HDL en sangre, LDL en sangre, triglicéridos en sangre y colesterol total en sangre.

7.4.4. **Tamaño de Muestra:** Se tomaron 14 individuos en cada grupo. La muestra se calculó con base en la Curva Característica de operación que se indica a continuación:



Los parámetros para calcular la gráfica fueron $\alpha = 0.05$, Poder = 0.90, una diferencia mínima esperada dentro de cada grupo de 50 mg/dL, y una desviación estándar estimada de 56 mg/dL [Dupont, W & Plummer, W. 1998. Power and Sample Size Calculations for Studies Involving Linear Regression: Controlled Clinical Trials. A Review and Computer Program. Version 3.0.43].

7.4.5. **Diseño del Muestreo:** Los individuos fueron seleccionados al azar (muestreo totalmente aleatorio) para cada uno de los 2 grupos.

7.4.6. **Mediciones:** Una inicial, y una vez al mes durante 2 meses, con un total de 3 mediciones (0 días, 30 días y 60 días).

7.4.7. **Análisis estadístico:**

7.4.7.1. Evaluación de los tratamientos en forma individual por medio de la prueba de T de Student pareada (Inicial-final de valores de triglicéridos) para cada grupo (a una cola), con un valor de α de 0.05.

$$H_0: \mu_{\bar{d}} \leq 50 \text{ mg/dL}$$

$$H_a: \mu_{\bar{d}} > 50 \text{ mg/dL}$$

\bar{d} = Promedio de la diferencia entre Triglicéridos Iniciales (T_o) y Finales (T_f).

El valor de 50 fue establecido como mínima reducción de triglicéridos para considerarse como un tratamiento efectivo, tomando en cuenta que el valor normal límite de triglicéridos es entre 150 y 200 mg/dL. Por lo tanto 50 mg/dL es la reducción mínima para alcanzar rangos normales.

7.4.7.2. Si ambos grupos tienen efecto, se deben comparar entre sí. Se evaluó como variable la diferencia de ambos grupos y se compararán con la prueba de t de Student a una cola para grupos independientes con un α de 0.05, previo a realizarla debió probarse homocedasticidad.

H₀: $\mu_{\bar{d}}$ (administración 30 minutos antes de las comidas) \leq $\mu_{\bar{d}}$ (administración durante de las comidas)

H_a: $\mu_{\bar{d}}$ (administración 30 minutos antes de las comidas) $>$ $\mu_{\bar{d}}$ (Administración durante de las comidas)

VIII. RESULTADOS

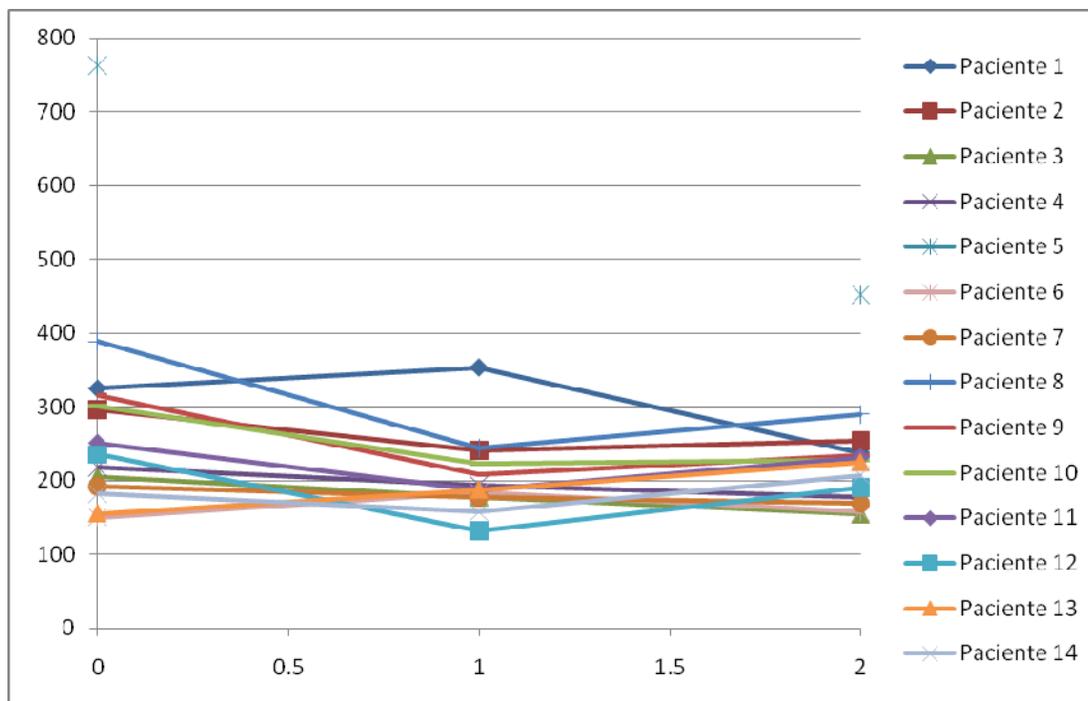
De acuerdo a los análisis de sangre realizados en los 14 pacientes que se administraron el extracto de Rosa de Jamaica 30 minutos antes de las comidas en un período de 60 días, se observa en el siguiente cuadro los resultados de triglicéridos séricos antes de recibir el tratamiento de rosa de Jamaica, 30 días después de haber comenzado el tratamiento, y 60 días después de haber comenzado el tratamiento. A su vez, se observa la reducción de triglicéridos séricos de cada paciente y la reducción promedio del grupo obtenida a los 30 y 60 días de tratamiento.

Cuadro No. 1. Concentración de triglicéridos séricos en el grupo “antes de las comidas” antes del tratamiento, a los 30 días de tratamiento y a los 60 días de tratamiento.

Paciente	Concentración de triglicéridos en mg/dL				
	Día 0	Día 30	Día 60	Reducción a los 30 días	Reducción a los 60 días
1	325.0	353.8	238.2	-28.8	86.80
2	296.4	241.3	253.5	55.10	42.90
3	205.1	177.4	154.3	27.70	50.80
4	218.3	194.4	176.7	23.90	41.60
5	762.8	nsp	452.2	nsp	310.6
6	150.3	184.5	158.3	-34.20	-8.000
7	192.3	177.6	169.6	14.70	22.70
8	388.1	244.6	289.8	143.5	98.30
9	316.4	208.8	235.1	107.6	81.30
10	300.9	222.6	228.0	78.30	72.90
11	250.6	186.7	231.7	63.90	18.90
12	235.4	131.8	190.5	103.6	44.90
13	155.2	187.4	224.9	-32.20	-69.70
14	182.5	157.4	207.5	25.10	-25.00
Promedio				42.17	54.93
Desviación				56.46	86.80

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de la Unidad de Salud, Ciudad Universitaria

Gráfica No. 1. Concentración de triglicéridos (mg/dL) en sangre (eje Y) en el grupo “antes de las comidas” antes del tratamiento, en el mes 1 y mes 2 de tratamiento (eje X).



Análisis estadístico

Prueba de t pareada a una cola para las medias de valores iniciales y finales del grupo “antes de las comidas)

- Grados de libertad: 13
- Coeficiente de Correlación: 0.9480
- Estadístico t: 2.368
- Valor crítico de t (una cola): 1.7709
- Valor p (una cola): 0.034

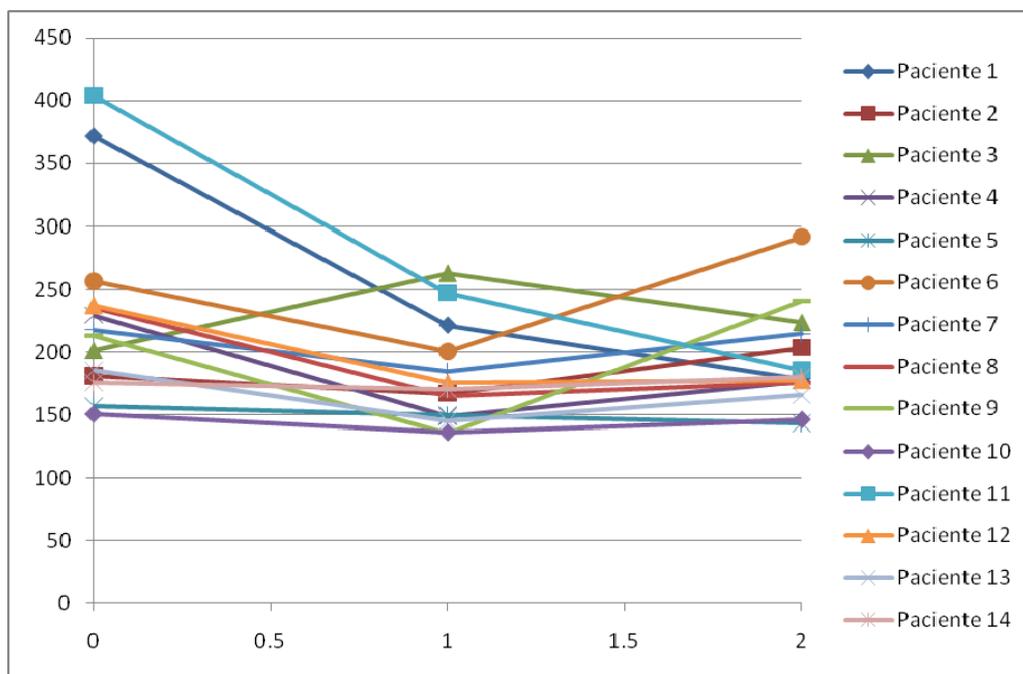
De acuerdo a los análisis de sangre realizados en los 14 pacientes que se administraron el extracto de Rosa de Jamaica durante las comidas en un período de 60 días, se observa en el siguiente cuadro los resultados de triglicéridos séricos antes de recibir el tratamiento de rosa de Jamaica, 30 días después de haber comenzado el tratamiento, y 60 días después de haber comenzado el tratamiento. A su vez, se observa la reducción de triglicéridos séricos de cada paciente y la reducción promedio del grupo obtenida a los 30 y 60 días de tratamiento.

Cuadro No. 2. Concentración de triglicéridos séricos en el grupo “durante de las comidas” antes del tratamiento, a los 30 días de tratamiento y a los 60 días de tratamiento.

Paciente	Concentración de triglicéridos en mg/dL				
	Día 0	Día 30	Día 60	Reducción a los 30 días	Reducción a los 60 días
1	372.1	221.4	178.7	150.7	193.4
2	181	167.1	203.6	13.90	-22.60
3	201.4	263.1	223.8	-61.70	-22.40
4	229.5	148.7	176.8	80.80	52.70
5	157.0	150.0	143.5	7.000	13.50
6	256.7	200.3	291.9	56.40	-35.20
7	217.5	184.6	214.5	32.90	3.000
8	235.4	165.2	175.9	70.20	59.50
9	212.8	135.9	240.9	76.90	-28.10
10	150.4	136.4	146.2	14.00	4.200
11	404.2	247.3	185.7	156.9	218.5
12	237.2	175.2	177.4	62.00	59.80
13	185.4	145.5	165.4	39.90	20.00
14	175.6	170.0	180.0	5.600	-4.400
Promedio				50.39	36.56
Desviación				57.59	78.44

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de la Unidad de Salud, Ciudad Universitaria

Gráfica No. 2. Concentración de triglicéridos (mg/dL) en sangre (eje Y) en el grupo “durante de las comidas” antes del tratamiento, en el mes 1 y mes 2 de tratamiento (eje X).



Análisis estadístico

Prueba de t pareada a una cola para las medias de valores iniciales y finales del grupo “antes de las comidas)

- Grados de libertad: 13
- Coeficiente de correlación: 0.156
- Estadístico t: 1.774
- Valor crítico de t (una cola): 1.77093
- Valor p (una cola): 0.105

Homocedasticidad entre los grupos antes y durante las comidas

- Estadístico de Levene: 0.027
- gl1: 1
- gl2: 26
- p: 0.871

Ambos grupos no pueden compararse porque únicamente el grupo antes de las comidas presenta el efecto esperado superior a 50 mg/dL. Se comprueba la homocedasticidad entre varianzas al estar el valor p (0.871) superior a 0.05, sin embargo no pueden compararse.

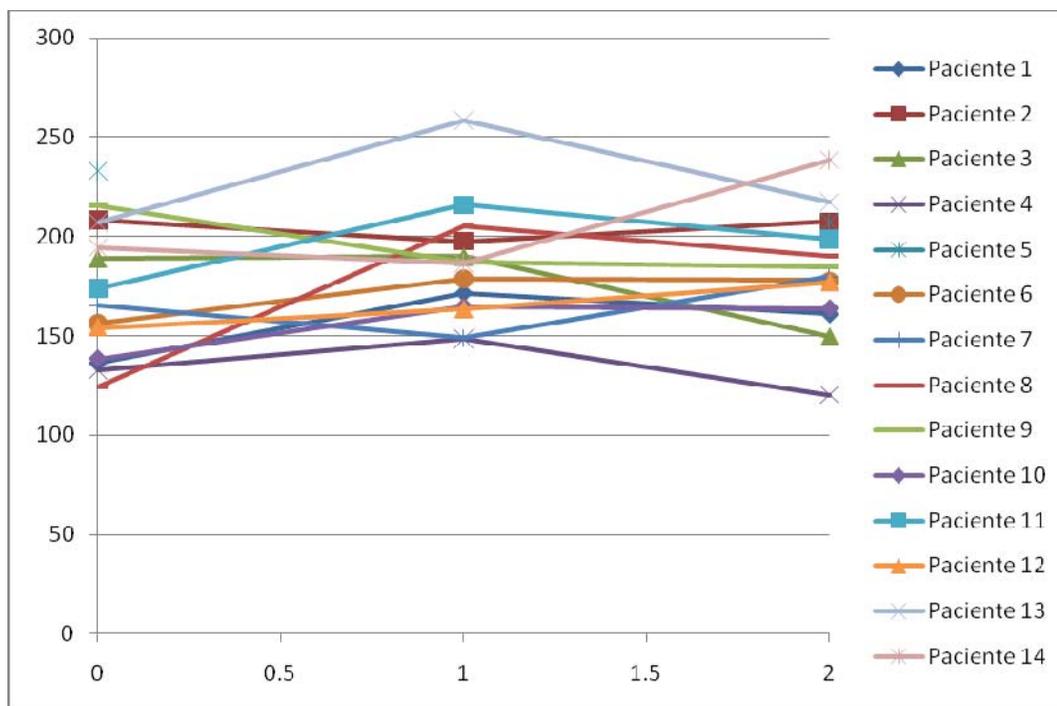
De acuerdo a los análisis de sangre realizados en los 14 pacientes que se administraron el extracto de Rosa de Jamaica 30 minutos antes de las comidas en un período de 60 días, se observa en el siguiente cuadro los resultados de Colesterol Total antes de recibir el tratamiento de rosa de Jamaica, 30 días después de haber comenzado el tratamiento, y 60 días después de haber comenzado el tratamiento. A su vez, se observa la reducción del colesterol total sérico de cada paciente y la reducción promedio del grupo obtenida a los 30 y 60 días de tratamiento.

Cuadro No. 3. Concentración de Colesterol total (mg/dL) en sangre en el grupo “antes de las comidas” antes del tratamiento, a los 30 días de tratamiento y a los 60 días de tratamiento.

Paciente	Concentración de Colesterol total en mg/dL				
	Día 0	Día 30	Día 60	Reducción a los 30 días	Reducción a los 60 días
1	136.2	171.7	161.0	-35.50	-24.80
2	208.3	197.7	207.4	10.60	0.900
3	189.0	189.9	149.5	-0.900	39.50
4	132.8	148.4	120.3	-15.60	12.50
5	233.0	nsp	207.0	nsp	26.00
6	156.4	178.6	177.8	-22.20	-21.40
7	165.2	148.8	179.8	16.40	-14.60
8	124.5	205.1	190.4	-80.60	-65.90
9	215.5	187.4	184.5	28.10	31.00
10	138.4	164.8	163.8	-26.40	-25.40
11	173.9	215.9	198.7	-42.00	-24.80
12	154.1	163.4	177.1	-9.300	-23.00
13	207.0	258.5	217.4	-51.50	-10.40
14	194.4	186.4	238.6	8.000	-44.20
Promedio				-16.99231	-10.328571
Desviación				30.51591	29.535856

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de la Unidad de Salud, Ciudad Universitaria

Gráfica No. 3. Concentración de Colesterol total (mg/dL) en sangre (eje Y) en el grupo “antes de las comidas” antes del tratamiento, en el mes 1 y mes 2 de tratamiento (eje X).



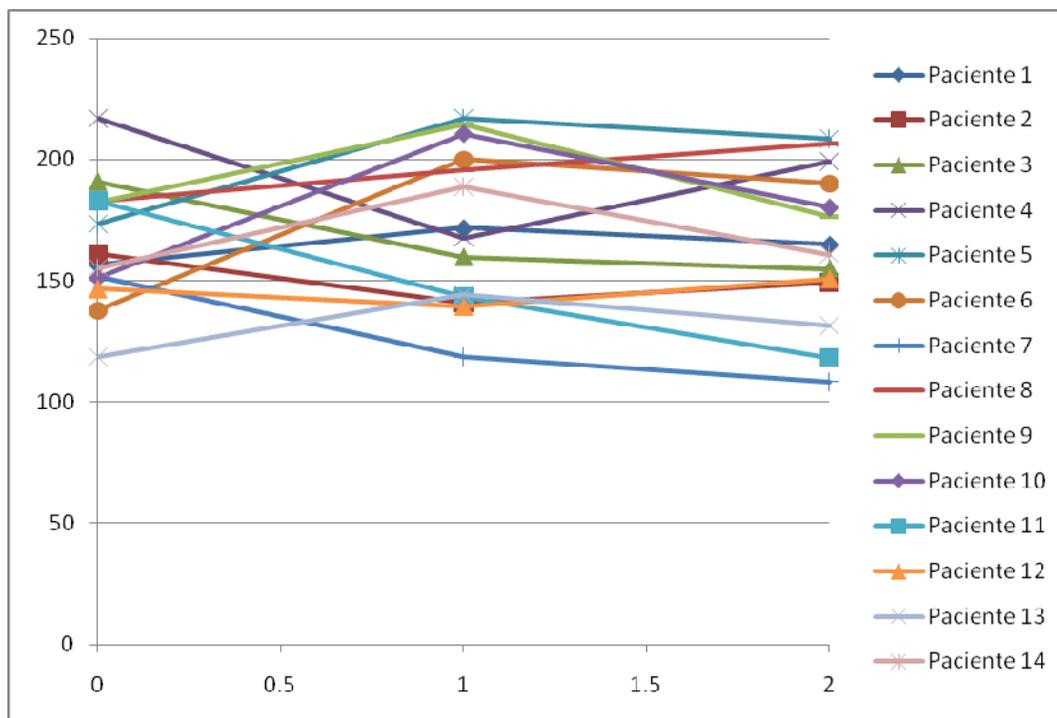
De acuerdo a los análisis de sangre realizados en los 14 pacientes que se administraron el extracto de Rosa de Jamaica durante las comidas en un período de 60 días, se observa en el siguiente cuadro los resultados de Colesterol Total antes de recibir el tratamiento de rosa de Jamaica, 30 días después de haber comenzado el tratamiento, y 60 días después de haber comenzado el tratamiento. A su vez, se observa la reducción del colesterol total sérico de cada paciente y la reducción promedio del grupo obtenida a los 30 y 60 días de tratamiento.

Cuadro No. 4. Concentración de Colesterol total en sangre en el grupo “durante las comidas” antes del tratamiento, a los 30 días de tratamiento y a los 60 días de tratamiento.

Paciente	Concentración de Colesterol total en mg/dL				
	Día 0	Día 30	Día 60	Reducción a los 30 días	Reducción a los 60 días
1	156.5	171.8	164.9	-15.30	-8.4
2	161.0	141	149.2	20.00	11.8
3	190.8	159.7	154.9	31.10	35.9
4	216.9	167.8	199.2	49.10	17.7
5	173.4	217.2	208.7	-43.80	-35.3
6	137.7	200.0	190.1	-62.30	-52.4
7	151.6	118.6	108.3	33.00	43.3
8	183.0	195.6	206.4	-12.60	-23.4
9	182.6	214.5	176.4	-31.90	6.2
10	151.3	210.7	180.3	-59.40	-29
11	182.8	143.4	118.2	39.40	64.6
12	146.6	139.5	150.7	7.100	-4.1
13	118.8	144.4	131.4	-25.60	-12.6
14	155.4	188.8	160.8	-33.40	-5.4
Promedio				-7.471	0.6357
Desviación				37.41	32.20

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de la Unidad de Salud, Ciudad Universitaria

Gráfica No. 4. Concentración de Colesterol total (mg/dL) en sangre (eje Y) en el grupo “durante las comidas” antes del tratamiento, en el mes 1 y mes 2 de tratamiento (eje X).



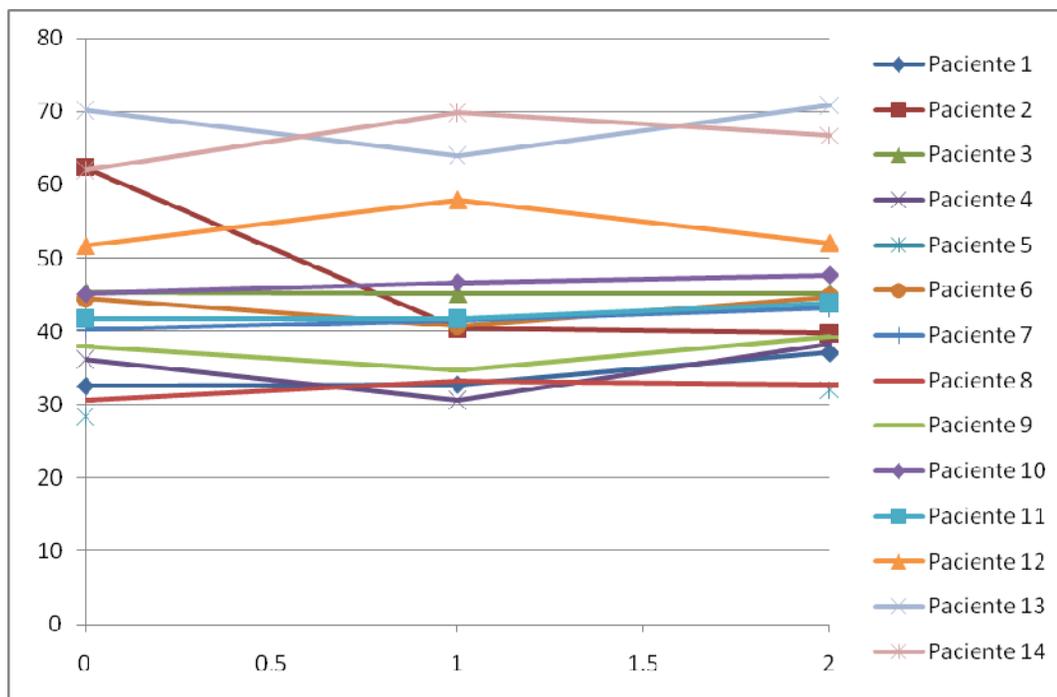
De acuerdo a los análisis de sangre realizados en los 14 pacientes que se administraron el extracto de Rosa de Jamaica 30 minutos antes de las comidas en un período de 60 días, se observa en el siguiente cuadro los resultados de Colesterol de alta densidad (HDL) antes de recibir el tratamiento de rosa de Jamaica, 30 días después de haber comenzado el tratamiento, y 60 días después de haber comenzado el tratamiento. A su vez, se observa la reducción del Colesterol de Alta Densidad (HDL) sérico de cada paciente y la reducción promedio del grupo obtenida a los 30 y 60 días de tratamiento.

Cuadro No. 5. Concentración de Colesterol de Alta densidad (HDL) en sangre en el grupo “antes de las comidas” antes del tratamiento, a los 30 días de tratamiento y a los 60 días de tratamiento.

Paciente	Concentración de Colesterol de Alta densidad (HDL) en mg/dL				
	Día 0	Día 30	Día 60	Reducción a los 30 días	Reducción a los 60 días
1	32.6	32.8	37.1	-0.20	-4.50
2	62.4	40.4	39.8	22.0	22.6
3	45.3	45.1	45.2	0.20	0.10
4	36.2	30.6	38.3	5.60	-2.10
5	28.4	Nsp	32.0	Nsp	-3.60
6	44.5	40.7	44.7	3.80	-0.20
7	40.2	41.5	43.2	-1.30	-3.00
8	30.6	33.2	32.7	-2.60	-2.10
9	37.9	34.7	39.2	3.20	-1.30
10	45.1	46.7	47.7	-1.60	-2.60
11	41.7	41.7	43.9	0.00	-2.20
12	51.7	58.0	52.1	-6.30	-0.40
13	70.2	64.0	70.9	6.20	-0.70
14	62.	69.9	66.7	-7.90	-4.70
Promedio				1.62	-0.336
Desviación				7.40	6.77

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de la Unidad de Salud, Ciudad Universitaria

Gráfica No. 5. Concentración de Colesterol-HDL (mg/dL) en sangre (eje Y) en el grupo “antes de las comidas” antes del tratamiento, en el mes 1 y mes 2 de tratamiento (eje X).



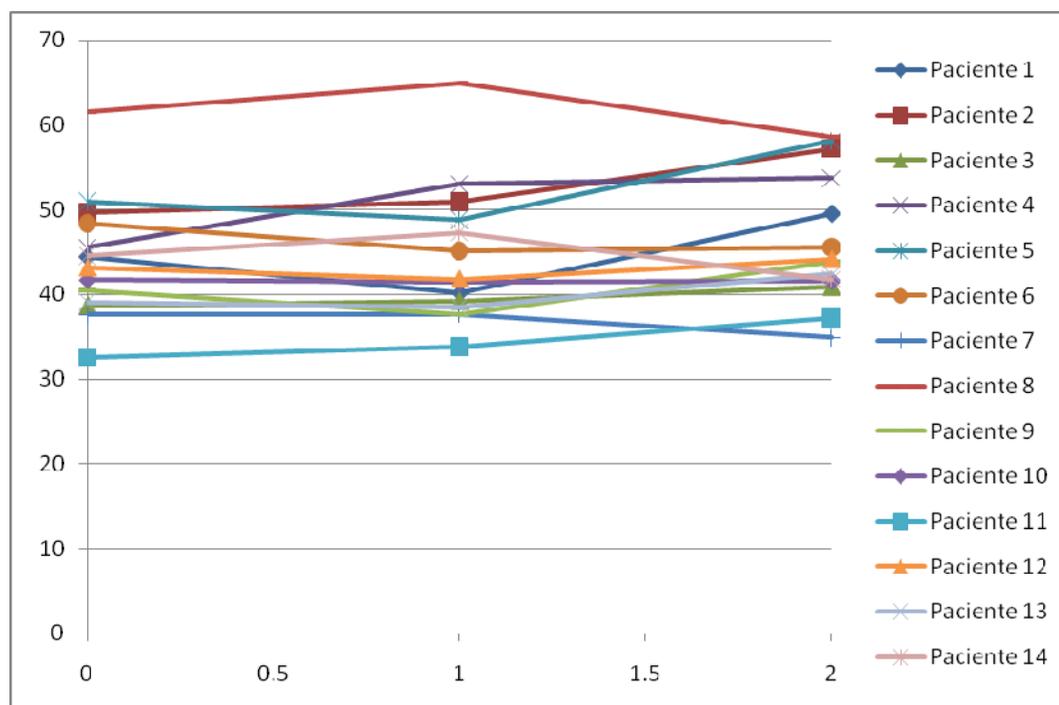
De acuerdo a los análisis de sangre realizados en los 14 pacientes que se administraron el extracto de Rosa de Jamaica durante las comidas en un período de 60 días, se observa en el siguiente cuadro los resultados de Colesterol de alta densidad (HDL) antes de recibir el tratamiento de rosa de Jamaica, 30 días después de haber comenzado el tratamiento, y 60 días después de haber comenzado el tratamiento. A su vez, se observa la reducción del Colesterol de Alta Densidad (HDL) sérico de cada paciente y la reducción promedio del grupo obtenida a los 30 y 60 días de tratamiento.

Cuadro No. 6. Concentración de Colesterol de Alta densidad (HDL) en sangre en el grupo “durante las comidas” antes del tratamiento, a los 30 días de tratamiento y a los 60 días de tratamiento.

Paciente	Concentración de Colesterol de Alta densidad (HDL) en mg/dL				
	Día 0	Día 30	Día 60	Reducción a los 30 días	Reducción a los 60 días
1	44.4	40.2	49.5	4.20	-5.10
2	49.7	50.9	57.2	-1.20	-7.50
3	38.7	39.2	40.9	-0.50	-2.20
4	45.5	53.0	53.7	-7.50	-8.20
5	50.9	48.8	58.1	2.10	-7.20
6	48.4	45.1	45.6	3.30	2.80
7	37.6	37.7	34.9	-0.10	2.70
8	61.5	64.9	58.6	-3.40	2.90
9	40.5	37.6	43.9	2.90	-3.40
10	41.7	41.4	41.6	0.30	0.100
11	32.6	33.8	37.2	-1.20	-4.60
12	43.2	41.8	44.2	1.40	-1.00
13	39.1	38.5	42.4	0.60	-3.30
14	44.6	47.3	41.8	-2.70	2.80
Promedio				-0.128	-2.23
Desviación				3.06	4.04

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de la Unidad de Salud, Ciudad Universitaria

Gráfica No. 6. Concentración de Colesterol-HDL (mg/dL) en sangre (eje Y) en el grupo “durante las comidas” antes del tratamiento, en el mes 1 y mes 2 de tratamiento (eje X).



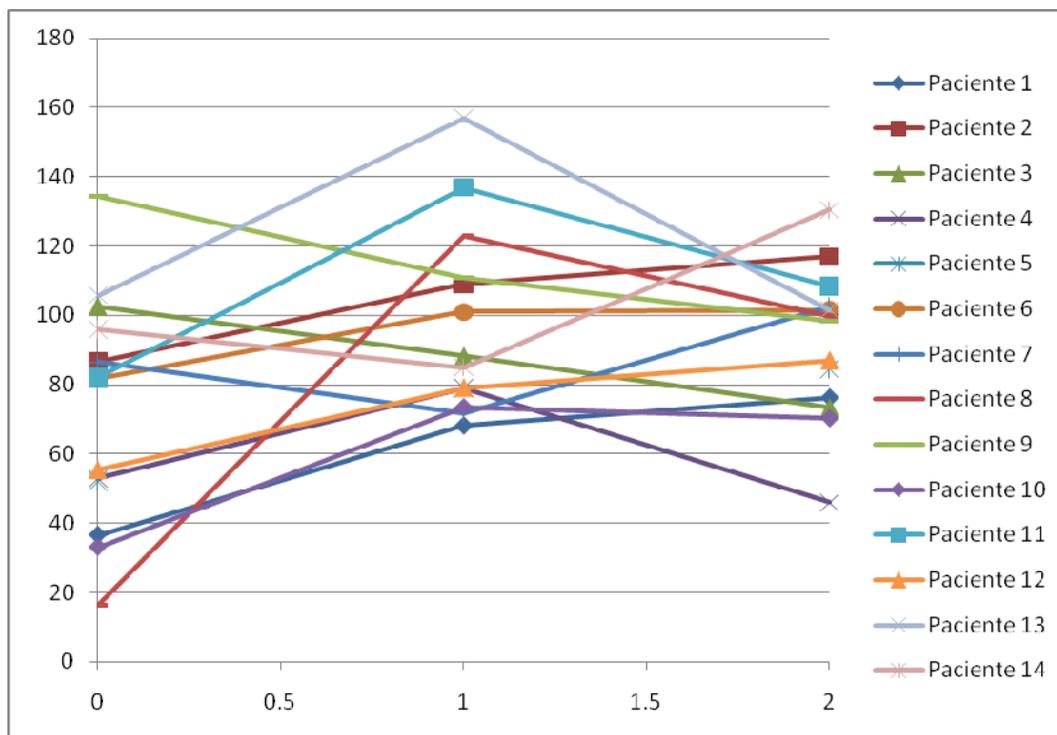
De acuerdo a los análisis de sangre realizados en los 14 pacientes que se administraron el extracto de Rosa de Jamaica 30 minutos antes de las comidas en un período de 60 días, se observa en el siguiente cuadro los resultados de Colesterol de baja densidad (LDL) antes de recibir el tratamiento de rosa de Jamaica, 30 días después de haber comenzado el tratamiento, y 60 días después de haber comenzado el tratamiento. A su vez, se observa la reducción del Colesterol de Baja Densidad (LDL) sérico de cada paciente y la reducción promedio del grupo obtenida a los 30 y 60 días de tratamiento.

Cuadro No. 7. Concentración de Colesterol de Baja densidad (LDL) en sangre en el grupo “antes de las comidas” antes del tratamiento, a los 30 días de tratamiento y a los 60 días de tratamiento.

Paciente	Concentración de Colesterol de Baja Densidad (LDL) en mg/dL				
	Día 0	Día 30	Día 60	Reducción a los 30 días	Reducción a los 60 días
1	36.60	68.20	76.30	-31.60	-39.70
2	86.60	109.0	116.9	-22.40	-30.30
3	102.7	88.30	73.40	14.40	29.30
4	52.90	78.90	46.00	-26.00	6.90
5	52.00	Nsp	84.50	Nsp	-32.50
6	81.80	101.0	101.4	-19.20	-19.60
7	86.50	71.80	102.6	14.70	-16.10
8	16.30	123.0	99.70	-106.7	-83.40
9	134.3	110.9	98.30	23.40	36.00
10	33.10	73.6	70.40	-40.50	-37.30
11	82.10	136.9	108.4	-54.80	-26.30
12	55.30	79.00	86.90	-23.70	-31.60
13	105.80	157.0	101.6	-51.20	4.200
14	95.90	85.00	130.4	10.90	-34.50
Promedio				-24.05	-19.64
Desviación				35.74	30.69

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de la Unidad de Salud, Ciudad Universitaria

Gráfica No. 7. Concentración de Colesterol-LDL (mg/dL) en sangre (eje Y) en el grupo “antes de las comidas” antes del tratamiento, en el mes 1 y mes 2 de tratamiento (eje X).



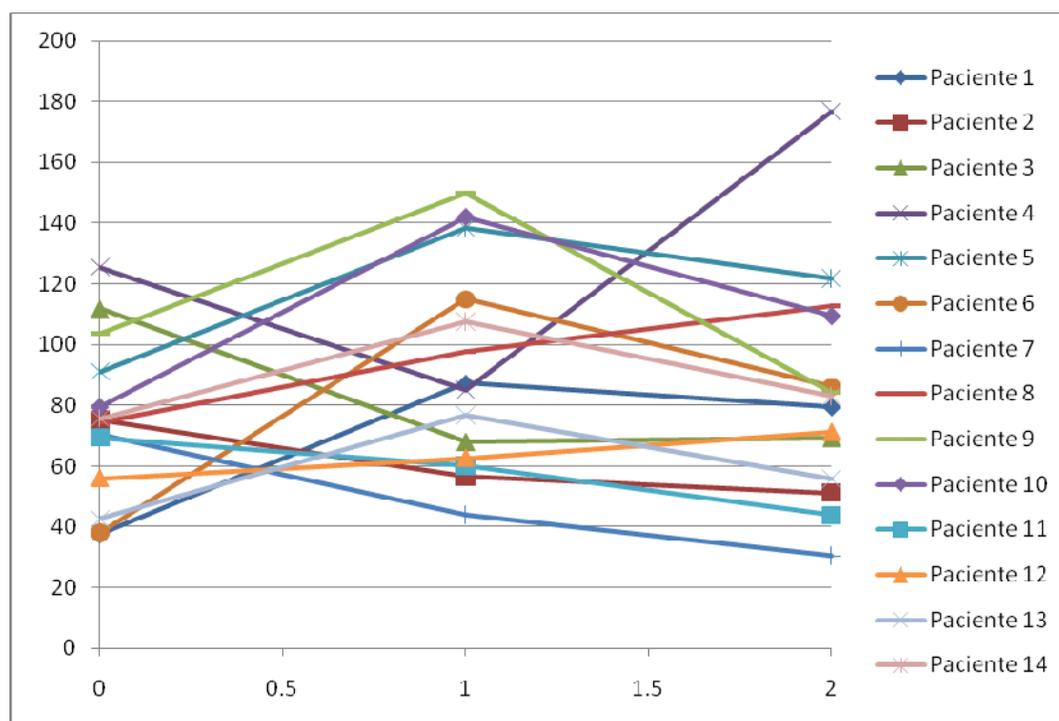
De acuerdo a los análisis de sangre realizados en los 14 pacientes que se administraron el extracto de Rosa de Jamaica durante las comidas en un período de 60 días, se observa en el siguiente cuadro los resultados de Colesterol de baja densidad (LDL) antes de recibir el tratamiento de rosa de Jamaica, 30 días después de haber comenzado el tratamiento, y 60 días después de haber comenzado el tratamiento. A su vez, se observa la reducción del Colesterol de Baja Densidad (LDL) sérico de cada paciente y la reducción promedio del grupo obtenida a los 30 y 60 días de tratamiento.

Cuadro No. 8. Concentración de Colesterol de Baja densidad (LDL) en sangre en el grupo “durante las comidas” antes del tratamiento, a los 30 días de tratamiento y a los 60 días de tratamiento.

Paciente	Concentración de Colesterol de Baja Densidad (LDL) en mg/dL				
	Día 0	Día 30	Día 60	Reducción a los 30 días	Reducción a los 60 días
1	37.70	87.30	79.60	-49.6	-41.9
2	75.10	56.70	51.20	18.4	23.9
3	111.8	67.90	69.20	43.9	42.6
4	125.5	85.10	176.8	40.4	-51.3
5	91.10	138.4	121.9	-47.3	-30.8
6	38.00	114.9	86.10	-76.9	-48.1
7	70.50	44.00	30.50	26.5	40.0
8	74.40	97.70	112.6	-23.3	-38.2
9	103.5	149.7	84.30	-46.2	19.2
10	79.50	142.00	109.4	-62.5	-29.9
11	69.40	60.10	43.80	9.30	25.6
12	56.00	62.70	71.20	-6.70	-15.2
13	42.60	76.80	55.90	-34.2	-13.3
14	75.70	107.5	83.00	-31.8	-7.30
Promedio				-17.14	-8.91
Desviación				39.22	33.24

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de la Unidad de Salud, Ciudad Universitaria

Gráfica No. 8. Concentración de Colesterol-LDL (mg/dL) en sangre (eje Y) en el grupo “durante las comidas” antes del tratamiento, en el mes 1 y mes 2 de tratamiento (eje X).



Cuadro No. 9. Reducción de los valores promedio de triglicéridos (TGS), lipoproteínas de baja densidad (LDL), Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y Colesterol Total (CT) durante 30 días de tratamiento con Rosa de Jamaica en los grupos “antes de las comidas” y “durante las comidas”.

Prueba de laboratorio	Reducción a los 30 días en mg/dL	
	“antes de las comidas”	“Durante las comidas”
TGS	42.17	50.39
LDL	-24.05	-17.14
HDL	1.623	-0.1285
CT	-16.99	-7.471

Fuente: Datos experimentales.

Cuadro No. 10. Reducción de los valores promedio de triglicéridos (TGS), lipoproteínas de baja densidad (LDL), Lipoproteinas de alta densidad (HDL) y Colesterol Total (CT) durante 60 días de tratamiento con Rosa de Jamaica en los grupos “antes de las comidas” y “durante las comidas”.

Prueba de laboratorio	Reducción a los 60 días en mg/dL	
	“antes de las comidas”	“Durante las comidas”
TGS	54.93	36.56
LDL	-19.63	-8.907
HDL	-0.3357	-2.229
CT	-10.33	0.6357

Fuente: Datos experimentales.

Se realizaron pruebas en laboratorio para determinar la proporción del solvente y la temperatura en las que el rendimiento de extracción fuera mayor. Los parámetros que permitieron evaluar el rendimiento de extracción fueron solidos totales, para evaluar la cantidad de solidos extraídos, y absorbancia a 524 nm, para evaluar a las antocianinas, siendo mayor absorbancia correspondiente a mayor concentración.

Cuadro No. 11. Determinación de condiciones de extracción (proporción de solvente y temperatura) a escala laboratorio de Rosa de Jamaica previo a la realización de las extracciones a escala piloto a partir de solidos totales y absorbancia de máxima absorción de antocianinas.

Temperatura	Etanol al 20%		Etanol al 30%	
	Solidos totales	Absorbancia a 524 nm	Solidos totales	Absorbancia a 524 nm
25^o C	4.9311	0.118	4.7860	0.1526
60^o C	4.9837	0.1317	4.8805	0.1662
90^o C	5.004	0.1727	4.9400	0.2252

Fuente: Datos experimentales.

Cuadro No. 11. Parámetros de Calidad del extracto de Rosa de Jamaica

Prueba de calidad	Lote		
	1	2	3
pH	2.01 ± 0.12	1.76 ± 0.08	2.16 ± 0.09
Color	Rojo oscuro	Rojo oscuro	Rojo oscuro
Apariencia	Viscosa	Viscosa	Viscosa
Densidad relativa	1.07	1.18	1.12
Cantidad de materia prima utilizada	6 Kg	7.4 Kg	8.6Kg
Cantidad de solvente utilizada	60 L	74 L	105 L
Relación de materia prima/solvente	1.10	1:10	1:12
Cantidad de volumen obtenida	5.2 L	1.8 L	6.5 L
Solvente utilizado	Agua	Etanol 20%	Agua
Temperatura de extracción	55 ^o C	60 ^o C	60 ^o C
Cantidad de frascos (60mL) obtenida	85	30	100
Dosis	3mL	1 mL	2 mL
Concentración de antocianinas	5.35 mg/mL ± 0.04	13.45 mg/mL ± 0.08	7.24 mg/mL ± 0.02

Fuente: Datos experimentales

IX. DISCUSIÓN

La determinación de la actividad hipotriglicéridémica en humanos de un extracto de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) dependió de una serie de variables que se dividen en dos categorías, las variables clínicas y las variables químicas. Desde el punto de vista clínico, fue necesario definir y establecer la vía de administración, frecuencia, dosis y momento de administración. Desde el punto de vista químico, fue necesario definir y establecer el solvente, las condiciones de extracción, la relación de materia prima-solvente, el método adecuado para cuantificar y todos los parámetros de calidad.

Las variables clínicas fueron estableciéndose a partir del análisis de los nuevos avances que se tienen en farmacocinética de metabolitos secundarios, en particular de Antocianinas, ya que éstas constituirían el principio activo. En base a los mecanismos teóricos de absorción, distribución, metabolismo, eliminación y a la biodisponibilidad de Antocianinas, se determinó que la mejor vía de administración era la oral, ya que las antocianinas son más estables a valores ácidos de pH y una parte del proceso de absorción se realiza en el estómago donde el pH es sumamente ácido (entre 1.5 y 3.5); se determinó que la frecuencia adecuada era de tres veces al día, debido a que las antocianinas no son estables al pH sanguíneo y se degradan, por lo que su vida media es muy corta (1.3 a 7 horas); se consideraron dosis bajas de principio activo debido a la baja absorción de antocianinas (1%) a nivel sistémico; y se planteó la hipótesis en la investigación de que existe mayor actividad si el momento de administración es 30 minutos antes de cada comida comparado a durante las comidas, probablemente por una mayor absorción de principio activo, fundamentado en el hecho que los receptores intestinales donde se absorben las antocianinas pueden saturarse con la absorción de nutrientes provenientes de la ingesta de alimentos. Es importante analizar que en la presente investigación las variables químicas fueron estableciéndose a partir de la estabilidad química de las antocianinas, la cual consistió en revisión de literatura y en pruebas experimentales.

Las variables químicas fueron estableciéndose a partir de la estabilidad de las Antocianinas, ya que tomando en cuenta la temperatura, concentración, luz, pH y solubilidad de éstas se definieron los parámetros de extracción. Se hicieron pruebas en laboratorio para determinar las condiciones, y se establecieron los parámetros de extracción (ver cuadro 11), como el solvente con mejor capacidad extractiva (ver cuadro 12), que fue etanol al 30% en el caso de antocianinas y etanol al 20% en caso de sólidos totales. La diferencia entre dichos

valores se debe a que otros metabolitos secundarios son más solubles en alcohol que las antocianinas, aumentando el valor de sólidos totales pero no la extracción de antocianinas. A mayor temperatura mayor capacidad de extracción, siendo 90° C la temperatura con mayor capacidad extractiva. Experimentalmente se trabajaron 2 lotes a escala piloto con agua y uno con etanol debido a que las diferencias eran poco significativas. La relación de materia prima y solvente se estableció en base a la literatura y a la capacidad del reactor para realizar las extracciones, encontrando conveniente 1:10. Se utilizó benzoato de sodio al 0.05% como preservante en base a la literatura y se congelaron los extractos para asegurar inocuidad. El pH del extracto era promedio de 2, lo cual mantenía estable el principio activo. Se utilizaron frascos color ambar para evitar la degradación por la luz, y los extractos debían mantenerse refrigerados por los pacientes para asegurar la estabilidad y evitar la degradación de antocianinas. La cuantificación de antocianinas fue aproximada y no es un valor certero ya que se carecía de estándares de antocianinas, por lo que se utilizó la fórmula $\%p/p = (A/\epsilon L) \times MW \times (V/Wt) \times 100$, donde, ϵ = absorptividad molar de la delphinidina-3-glucósido (23700), MW = masa molecular de antocianinas (518.5), DF = factor de dilución, V = volumen final (mL), Wt = peso de la muestra (mg), y L = longitud de la celda (1 cm). La identificación de antocianinas se realizó entre 520-522nm con un hombro a 440nm. La absorbancia real de antocianinas se corrigió con lecturas en pH de 1 y de 4.5 a longitudes de onda de 520 y 700 nm. A pesar de que la concentración de antocianinas difería en cada lote se ajustó la misma dosis al modificar la cantidad de gotas utilizadas en cada lote por cada paciente para ajustar 15 mg por dosis de antocianinas totales.

Desde el punto de vista del alcance y enfoque de este estudio, la farmacodinámica fue tomada en cuenta en el establecimiento de la dosis y en evaluar el efecto resultante, mientras que el mecanismo de acción del efecto no fue de interés. Sin embargo, se ha demostrado en otros estudios la capacidad de los antocianósidos por disminuir triglicéridos plasmáticos debido a la inhibición de la enzima glicerol-3-fosfato-acil-transferasa 1 (GPAT1), produciendo disminución en la síntesis de triglicéridos y con ello explicando su actividad hipotrigliceridémica. A su vez se ha demostrado en otros estudios la capacidad de los antocianósidos por aumentar concentraciones plasmáticas de HDL y disminuir LDL, debido a la inhibición de la Proteína Transportadora de Esteres de Colesterol (CETP), con lo que se promueve y facilita el transporte reverso de colesterol. Experimentalmente se utilizó una única dosis de concentración de antocianinas, establecida en promedio de 15 mg en el transcurso de los 2 meses de tratamiento, definida al observar en estudios recientes donde se evaluaba el efecto de la Rosa de Jamaica en

Colesterol sérico a diferentes concentraciones, que dosis de 10 mg disminuyeron ligeramente los triglicéridos sanguíneos, por lo que el establecimiento de la dosis fue definido al incrementar ligeramente dicho valor, esperando observar una mayor actividad.

Al evaluar la actividad hipotrigliceridémica de un extracto de Rosa de Jamaica en el grupo de 14 pacientes que se la administraron durante 2 meses, tres veces al día, antes de las comidas, puede observarse en el cuadro 1 un descenso promedio de 54.92 mg/dL con un valor de p de 0.034 y un valor de t de 2.368. Al ser el valor de t mayor al valor de t crítico (1.77093) y con el valor de p (0.034) menor a 0.05, se rechaza la hipótesis nula (**H₀**: $\mu_d \leq 50$ mg/dL) y se acepta la hipótesis alternativa (**H_a**: $\mu_d > 50$ mg/dL), considerándose diferencias significativas antes y después del tratamiento, demostrándose que el tratamiento con rosa de Jamaica antes de las comidas es efectivo en la disminución de triglicéridos. Se estableció como tratamiento efectivo una reducción mayor a 50 mg/dL debido a que el límite normal de triglicéridos séricos se encuentra entre 150 y 200 mg/dL, por lo que una mínima actividad requeriría por lo menos 50 para obtener datos normales.

Al evaluar la actividad hipotrigliceridémica de un extracto de Rosa de Jamaica en el grupo de 14 pacientes que se la administraron durante 2 meses, tres veces al día, durante las comidas, puede observarse en el cuadro 2 un descenso promedio de 36.56 mg/dL con un valor de p de 0.105 y un valor de t de 1.774. Al ser el valor de t menor al valor de t crítico (1.77093) y con el valor de p (0.105) mayor a 0.05, se acepta la hipótesis nula (**H₀**: $\mu_d \leq 50$ mg/dL) considerándose que no existe la reducción esperada de 50 mg/dL antes y después del tratamiento, demostrándose que el tratamiento con rosa de Jamaica durante las comidas es efectivo en la disminución de triglicéridos pero no lo esperado.

Ambos grupos, antes y durante las comidas, no pueden compararse porque únicamente el grupo antes de las comidas presenta el efecto esperado superior a 50 mg/dL. Se comprueba la homocedasticidad entre varianzas al estar el valor p (0.871) superior a 0.05, sin embargo no pueden compararse ya que solo un grupo se consideró efectivo.

Al comparar los resultados de la disminución de triglicéridos del grupo antes y durante las comidas, se pudo observar que en el grupo “antes de las comidas” se observan resultados con una mejor índice de correlación (0.948) que en el grupo “durante las comidas” (0.105). Lo que

intenta demostrar esta comparación de grupos es como la comida puede disminuir el efecto o actividad de un extracto por una probable disminución en la absorción de antocianinas por competitividad entre moléculas. Sin embargo, no debe considerarse al tratamiento “durante las comidas” como inefectivo, ya que puede observarse en el primer mes de tratamiento una disminución promedio 50.39 mg/dL, que en el segundo mes no se mantuvo. Esta disminución en actividad pudo deberse a incremento de grasas en la dieta, disminución en la adherencia al tratamiento o por mecanismos intrínsecos del extracto, los cuales no pudieron demostrarse. En las gráficas 1 y 2 puede observarse en ambos grupos, una mayor reducción de triglicéridos en el primer mes de tratamiento, siendo muy similares entre sí. En la mayoría de pacientes del grupo de antes de las comidas siguió reduciendo sus valores en el segundo mes, mientras que en el grupo durante las comidas, algunas personas incrementaron sus valores iniciales, lo cual hace sospechar un considerable cambio en la dieta. Sin embargo, a pesar del alto valor promedio en la reducción del grupo durante de las comidas en el primer mes de tratamiento, es el último resultado obtenido el utilizado para realizar el análisis y donde pueden observarse diferencias entre ambos grupos.

La actividad hipocolesterolémica del extracto de Rosa de Jamaica no pudo demostrarse, ya que para ello era necesario la reducción en los valores de Colesterol Total y Colesterol de baja densidad (LDL), mientras que los valores de Colesterol de alta densidad (HDL) debían aumentar, lo cual no fue demostrado experimentalmente en ninguno de los dos grupos, como puede observarse en los cuadros del 3 al 8. En los cuadros 9 y 10 se observa el efecto del tratamiento en cada uno de los lípidos sanguíneos (Triglicéridos, colesterol total, Colesterol HDL y Colesterol LDL) en el primer y segundo mes de tratamiento, respectivamente. En estos cuadros no se observa reducción en los valores de Colesterol Total o HDL, ni se observa incremento de LDL. Esto se debe a que experimentalmente se utilizó una dosis muy baja para presentar actividad hipocolesterolémica como lo ha demostrado la literatura, ya que la actividad hipocolesterolémica ha sido establecido a dosis de antocianinas de 40 mg por dosis. En el estudio, los valores de Colesterol Total, LDL y HDL fueron evaluados únicamente como control, ya que la dosis fue establecida en función de lo que ha reportado la literatura para disminuir triglicéridos. De igual forma para observar el efecto del tratamiento en los niveles séricos de colesterol hubiera sido necesario un monitoreo de por lo menos 3 meses.

X. CONCLUSIONES

- 10.1 El extracto de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) utilizado experimentalmente, con una dosis de antocianinas aproximada de 15 mg/dL, administrado antes y durante las comidas, mostró un efecto hipotrigliceridémico en el primer y segundo mes de tratamiento, al reducir los triglicéridos sanguíneos en pacientes con valores superiores a 150 mg/dL.
- 10.2 El extracto de rosa de Jamaica extraído con etanol al 30% y temperatura de 90° C presentó la mayor capacidad de extracción de antocianinas.
- 10.3 El extracto de rosa de Jamaica extraído con etanol al 20% y temperatura de 90° C presentó la mayor capacidad de extracción de sólidos totales.
- 10.4 Existe diferencia en la actividad hipotrigliceridémica de un Extracto de Rosa de Jamaica al administrarlo antes y durante las comidas, 3 veces al día, durante 2 meses.
- 10.5 La administración de un extracto de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) 30 minutos antes de cada comida (tres veces al día), durante un período de 2 meses, presenta una mayor actividad hipotrigliceridémica que al administrarse durante cada comida (tres veces al día), durante un período de 2 meses, con una reducción promedio de 54.92 y 36.56 mg/dL.
- 10.6 La administración de un extracto de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) 30 minutos antes de cada comida (tres veces al día) durante un período de 2 meses, es considerada un tratamiento efectivo al producir una disminución promedio de triglicéridos de 54.92 mg/dL, valor mayor al establecido como efectivo (50 mg/dL).
- 10.7 La administración de un extracto de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) durante cada comida (tres veces al día) durante un período de 2 meses, presentó actividad hipotrigliceridémica con una reducción promedio de 36.56, sin embargo no se le considera como tratamiento efectivo, al ser inferior al parámetro establecido como efectivo (50 mg/dL).
- 10.8 El extracto de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) utilizado experimentalmente, con una dosis de antocianinas de 15 mg/dL, no mostró actividad hipocolesterolémica en ninguno de los dos grupos, al no reducir los valores promedios de Colesterol Total ni LDL, y al no aumentar el Colesterol HDL.
- 10.9 Se comprobaron las 2 hipótesis experimentales al encontrar actividad hipotrigliceridémica en el extracto de Rosa de Jamaica, y al existir mayor actividad en la administración antes de cada comida.

XI. RECOMENDACIONES

- 11.1. Implementar en el sistema de Salud guatemalteco la investigación y la utilización de plantas medicinales como tratamientos efectivos y de bajo costo para la población.
- 11.2. Implementar en el Sistema guatemalteco de Hospitales la administración de Rosa de Jamaica a pacientes internados con triglicéridos superiores a 150 mg/dL.
- 11.3. Determinar la dosis mínima que presenta actividad hipotrigliceridémica de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* L. antes de cada comida, tres veces al día, durante un período de 6 meses, a concentraciones de antocianinas totales de 2.5, 5, 7.5 y 10 mg/dosis.
- 11.4. Evaluar la actividad hipotrigliceridémica de *Hibiscus sabdariffa* L. en un estudio doble ciego, con entrecruzamiento entre grupos, con dieta controlada, utilizando un placebo como grupo control.
- 11.5. Evaluar la actividad hipotrigliceridémica de las antocianinas, antes vrs durante las comidas, en un período de 6 meses de tratamiento.
- 11.6. Evaluar y comparar la actividad hipolipemiante de otras especies vegetales que presenten antocianinas.

XII. REFERENCIAS

- Abou-Arab, A., Abu-Salem, F., & Abou-Arab, E. (2011). Physico- chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus subdariffa*). *Journal of American Science*, 7(7): 445-456.
- Adams, J. (1973). Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. in acidified aqueous solution at 100 deg , *J. Sci. Food Agri.*24: 747-762.
- Adegunloye BJ, Omoniyi JO, Owolabi OA, Ajagbonna OP, Sofola OA, Coker HA. (1996). Mechanisms of the blood pressure lowering effect of the calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* in rats. *Afr J Med Med Sci.*;25:235–8.
- Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C., Reed, J., & Mukhtar, H. (2005). Anthocyanin- and Hydrolyzable Tannin-Rich Pomegranate Fruit Extract Modulates MAPK and NF-!B Pathways and Inhibits Skin Tumorigénesis in CD-1 Mice. *Int. J. Cancer: 113*, 423–433
- Ahmed-Belkacem A, Pozza A, Munoz-Martinez F, et al. Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Res* 2005;65:4852-60
- Akindahunsi, A, & Olaleye, M. (2003). Toxicological investigation of aqueous-methanolic extrac of the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. *J Ethnopharmacol*, 89(1), 161-164
- Ali, B., Wabel, N., & Blunden, G. (2005). Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Hibiscus sabdariffa*. *Phytother*, 19, 369–375
- Ali, O. (2010). Cytotoxicity of *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract. *Caryologia* 63(2), 157-161.
- Alonso, J. *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*. Corpus editorial y Distribuidora, Rosario, Argentina, 2007.
- Andersen, Ø., Markham, K. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. United States of America: CRC Press Taylor & Francis Group
- Aronow, W. Ahn C (1994). Correlation of serum lipids with the presence or absence of coronary artery disease in 1793 men and women aged >62 years. *Am J Cardiol*, 73:702-703.
- Attoe, e., and von Elbe, j. 1981. Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. *J. Food Sci.* 46, 1937.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., et al. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr*, 23,423-433.

- Bagchi, D., Sen, C., Bagchi, M., Atalay, M. (2004). Anti-angiogenic, Antioxidant, and Anticarcinogenic Properties of a Novel Anthocyanin-Rich Berry Extract Formula. *Biochemistry (Moscow)*, 69(1), 75-80.
- Bakowska-Barczak, A. (2005). Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – a review. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 14(2), 107-116.
- Balant LP, Benet LZ, Blume H, et al. (1991). Is there a need for more precise definitions of bioavailability? *Eur J Clin Pharmacol*;40:123-6.
- Becci PJ, Hess FG, Gallo MA, Johnson WD, Babish JG. (1983). Subchronic feeding study of grape colour extract in beagle dogs. *Food Chem Toxicol*;21:75-7.
- Bengtson C (1973). Ischaemic heart disease in women: a study based on a randomized population sample of women with myocardial infarction in Goteborg, Sweden. *Acta Med Scan Suppl*, 549:121-128.
- Blair, A., Shaul, W., Yuhanna, I., Conrad, P., Smart, E. (1999). Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem*, 274(45):32512-32519.
- Blaquer, A., Herrera-Arellano, A., Zamilpa, A., Olivar, T., Martínez, M. (2009) Interés de la flor de hibisco en problemas cardiovasculares. *Revista de Fitoterapia*, 9(1): 25-33.
- Böger, R., Bode-Böger, S., Szuba, A., Tsao, P., Chan, J., Tangphao, O., Blaschke, T., Cooke, J. (1998). Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation*, 98:1842-1847.
- Bolade, M., Oluwalana, I., & Ojo, O. (2009). Commercial Practice of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Beverage Production: Optimization of Hot Water Extraction and Sweetness Level. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(1): 126-131.
- Branger, J., van den Blink, B., Weijer, S., Gupta, A., van Deventer, S., Hack, C. (2003). Inhibition of coagulation, fibrinolysis, and endothelial cell activation by a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia. *Blood Journal*, 101(11), 4446-4448.
- Broennum-Hansen K, Flink JM. (1985). Anthocyanin colorants from elderberry (*Sambucus nigra* L.). Storage stability of the freeze dried product. *J Food Technol* 20: 725-733.
- Brouillard R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. Markakis P. *Anthocyanins as food colors*. Academic Press; 1-40.
- Cabrita L. 1999. Analysis and stability of anthocyanins. [dissertation]. University of Bergen, Department of Chemistry, Bergen.

- Chang, B. (2009). Metabolism of protocatechuic acid influences fatty acid oxidation in rat heart: New anti-angina mechanism implication. *Biochemical Pharmacology*, 77(6): 1096-1104
- Chen, C. y otros. (2003). Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Agric Food Chem*; 51(18):5472-7.
- Chou, E., Keevil, J., Aeschlimann, S., Wiebe, D., Folts, J., Stein, J. (2001). Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol*, 88, 553-555.
- Chumsri, P., Sirichote, A., Itharat, A. (2008). Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 30(1), 133-139.
- Collier, J., White, S., Dick, G., & Scott, D. (2004). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors reveal a unique mechanism of enhancing insulin secretion in 832/13 rat insulinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 1018–1023
- Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A., Garbin, U., Davoli, A., Campagnola, M., Pastorino, A., Lo Cascio, V., Sawamura, T. (2001). The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDLreceptor-1 reduces intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells trough an increased production of superoxide. *J Biol Chem*, 276:13750-13755.
- Dai, J., & Mumper, R. (2010). Plant Phenolics, Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15, 7313-7352
- Dietschy, J. (1997). Theoretical considerations of what regulates low-density lipoprotein and highdensity lipoprotein colesterol. *Am J Clin Nutr*, 65:1581-1589.
- Dietschy, J. (1997). Theoretical considerations of what regulates low-density lipoprotein and highdensity lipoprotein colesterol. *Am J Clin Nutr*, 65:1581-1589.
- Dreiseitel, A. (2011). In vitro bioactivities of dietary anthocyanins and proanthocyanidins: implications for bioavailability, neuroprotection and safety (Tesis de doctorado). Universidad Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Alemania.
- El-Saadany, S. (1991). Biochemical dynamics and hypocholesterlemic action of *Hibiscus sabdariffa* (Karkade). *Nahrung*; 35(6):567-76
- Elwood, P., Renaud, S., Sharp, D., Beswick, A., O'Brien, J., Yarnell, J. Ischemic heart disease and platelet aggregation. *Circulation* 1991;83:38-44.
- Escalante, Y. (2008). Variedades de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista digital alternativa*.
- Faria A, Pestana D, Azevedo J, et al. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - Putative involvement of GLUT2. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:1430-7.

- Felgines C, Talavera S, Texier O, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, Remesy C. Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *J Agric Food Chem* 2005;53:7721-7.
- Figueiredo P, George F, Tatsuzawa F, Toki K, Saito N, Brouillard R. 1999. New features of intramolecular copigmentation by acylated anthocyanins. *Phytochemistry* 51: 125-132.
- Frank, T., Janßen, M., Netzel, M., Straß, G., Kler, A., Kriesl, E., Irmgard Bitsch, I. (2005). Pharmacokinetics of Anthocyanidin-3-Glycosides Following Consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. Extract. *J Clin Pharmacol* 45(2), 203-210
- Furtado P, Figueiredo P, Chaves das Neves H, Pina F. 1993. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *J Photochem Photobiol, A* 75: 113-118.
- Galvano, F., Fauci, L., Vitaglione, P., Fogliano, V., Vanella, L., Felgines, C. (2007). Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. *Ann Ist super sanità* 43(4), 382-393.
- Garcia-Palazon A, Suthanthangjai W, Kajda P, Zabetakis I. 2004. The effects of high hydrostatic pressure on b-glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria * ananassa*). *Food Chem* 88: 7-10.
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos, 13(3), 27-36.
- Ghosh, D., & Konishi, T. (2007). Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts. Role in diabetes and eye function. *Asia Pac J Clin Nutr*, 16(2), 200-208.
- Giusti MM, Wrolstad RE. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem Eng J* 14: 217-225.
- Guo, H., Li, D., Ling, W., Feng, X., Xia, M. (2011). Anthocyanin Inhibits High Glucose-Induced Hepatic Mitochondrial Glycerol-sn-3-Phosphate Acyltransferase 1 Activation and Prevents Fatty Acid Synthesis through Protein Kinase C Zeta. *Journal of Lipid Research*. 52(5):908-22
- Gurrola-Díaz, C., García-López, P., Sánchez-Enríquez, S., Troyo-Sanromán, R., Andrade-González, I., Gómez-Leyva, J. (2010). Effects of *Hibiscus sabdariffa* extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomedicine*, 17, 500–505.
- Gylling, H. (2004). Cholesterol metabolism and its implications for therapeutic interventions in patients with hypercholesterolaemia. *Int J Clin Pract*, 58 (9) 859-866.

- Habermeyer, M., Fritz, J., Barthelmes, H., Christensen, M., Larsen, M., Boege, F., & Marko, D. (2005). Anthocyanidins Modulate the Activity of Human DNA Topoisomerases I and II and Affect Cellular DNA Integrity. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1395-1404.
- Hamilton CA (1997). Low-density lipoprotein and oxidised low-density lipoprotein: their role in the development of atherosclerosis. *Pharmacol Ther*, 74(1):55-72.
- Hansen, G; Niels-Christiansen, L; Immerdal, L; Danielsen, E. (2003). Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut*, 52:1414-1431.
- Harada K, Kano M, Takayanagi T, Yamakawa O, Ishikawa F. (2004). Absorption of acylated anthocyanins in rats and humans after ingesting an extract of Ipomoea batatas purple sweet potato tuber. *Biosci Biotechnol Biochem*;68:1500-7.
- Hayashi, T., Esaki, T., Sumi, D., Mukherjee, T., Iguchi, A., Chaudhuri, G. (2006). Modulating role of estradiol on arginase II expression in hyperlipidemic rabbits as an atheroprotective mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(27):10485-10490.
- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T (2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104(22):2673-2678.
- Heo, H., & Lee, C. (2005). Strawberry and Its Anthocyanins Reduce Oxidative Stress-Induced Apoptosis in PC12 Cells. *J. Agric. Food Chem*, 53, 1984-1989.
- Hernández-Pérez, F., Herrera-Arellano, A. (2011). Tratamiento de la hipercolesterolemia con Hibiscus sabdariffa. Ensayo clínico aleatorizado controlado. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 49 (5): 469-480.
- Hidalgo-Villatoro, S., Cifuentes-Reyes, W., Ruano-Solís, H., Cano-Castillo, L. (2009). Caracterización de trece genotipos de rosa de jamaica Hibiscus sabdariffa en Guatemala. *agronomía mesoamericana* 20(1): 101-109.
- Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP. (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of Hibiscus sabdariffa L. in hypercholesterolemic rats. *J Ethnopharmacology* 103(2):252-260.
- Hokanson JE, Austin M (1996). Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk*, 3:213-229.
- Horbowicz, M., Kosson, R., Grzesiuk, A., & Debskie, H. (2008). Anthocyanins of fruits and vegetables - their occurrence, analysis and role in human nutrition. *Vegetable crops research bulletin*, 68, 5-22.

- Horton, J; Goldstein, J; Brown, M. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109:1125-1131.
- Hou D, Fujii M, Terahara N, Yoshimoto M. Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins. *J Biomed Biotechnol* 2004;2004:321-5.
- Hsieh, P., Jin, J., Chiang, C., Chan, P., Chen, C., & Shih, K. (2009). COX-2-mediated Inflammation in Fat Is Crucial for Obesity-linked Insulin Resistance and Fatty Liver. *Obesity*, 17(6), 1150–1157.
- Hsu, C., Lin, Y., Chou, C., Zhou, S., Hsu, Y., Liu, C., Ku, F., & Chung, Y. (2009). Mechanisms of Grape Seed Procyanidin-induced Apoptosis in Colorectal Carcinoma Cells. *Anticancer research*, 29, 283-290.
- Huang HT. 1955. Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *J Agric Food Chem* 3: 141-146.
- Jackman, R., Yada, R., Tung, M., Speers, R. (1987). Anthocyanins as food colorants - a review. *J Food Biochem* 11: 201-247.
- Jordheim, M. (2007). Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms (tesis de doctorado). Universidad de Bergen. Noruega.
- Juliani, H., Welch, C., Wu, Q., Diouf, B., Malainy, D., & Simon, J. (2009). Chemistry and Quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for Developing the Natural-Product Industry in Senegal. *Journal of food science*, 74(2).
- Kay, C. (2006). Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutrition Research Reviews*, 19, 137-146.
- Keith ES, Powers JJ. 1965. Polarographic measurement and thermal decomposition of anthocyanin compounds. *J Agric Food Chem* 13: 577-579.
- Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T. F., Brouillard R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
- Laleh, G., Frydoonfar, H., Jameei, R., Zare, S. (2006). The Effect of Light, Temperature, pH and Species on Stability of Anthocyanin Pigments in Four Berberis Species. *Pakistan Journal of Nutrition* 5 (1), 90-92
- Laursen, J., Somers, M., Kurz, S., McCann, L., Warnholtz, A., Freeman, B., Tarpey, M., Fukai, T., Harrison, D. (2001). Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*, 103:1282-1288.

- Lazzé, M., Savio, M., Pizzala, R., Cazzalini, O., Perucca, P., Scovassi, A., Stivala, L., & Bianchi, L. (2004). Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogénesis* 25(8), 1427-1433.
- Lin, H., Chenb, J., Kuo, W. & Wang C., (2007). Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. On human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. *Chemico-Biological Interactions*, 165, 59-75.
- Lin, T., Lin, H., Chen, C., Lin, M., Chou, M., Wang,C. (2007). Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research* 27, 140– 145.
- Lluch, M. (2008). Influencia de los niveles de colesterol sobre el metabolismo de la arginina y el estrés oxidativo. Efectos del tratamiento con estatinas. Tesis de doctorado. Universidad de Valencia.
- Maccarone E, Maccarrone A, Rapisarda P. 1985. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *J Food Sci* 50: 901-904.
- Mahadevan, N., Kamboj, P. (2009) *Hibiscus sabdariffa* Linn, An Overview. *Natural Product Radiance*, Vol. 8(1), 77-83.
- Malik, M., Zhao, C., Schoene, N., Guisti, M., Moyer, M., & Magnuson, B. (2003). Anthocyanin-Rich Extract from Aronia meloncarpa E. Induces a Cell Cycle Block in Colon Cancer but Not Normal Colonic Cells. *Nutrition and cancer*, 46(2), 186–196
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C. (2005): Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. 1. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81:230S–242S.
- Markakis P. 1982. Stability of anthocyanins in foods. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis P (ed.), Academic Press Inc., New York, p.163-178.
- Matuschek, M., Hendriks, W., mcghie, T., Gordon, W. (2006). The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17 (1), 31-36.
- Mazza, G. (2007). Anthocyanins and heart health. *Ann Ist super sanità*, 43(4), 369-374 .
- Mazza, G., and Miniati, E. 1993. “Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains.” CRC Press, Boca Raton, FL.
- McGhie TK, Walton MC. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:702-13
- Miguel, M. (2011). Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(06), 07-15

- Milbury, P., Vita, J., Blumberg, J. (2010). Anthocyanins are Bioavailable in Humans following an Acute Dose of Cranberry Juice. *J Nutr.* 140, 1099–104.
- Nabae K, Hayashi SM, Kawabe M, et al. (2008). A 90-day oral toxicity study of purple corn color, a natural food colorant, in F344 rats. *Food Chem Toxicol*;46:774-80.
- Navab, M., Hama, S., Anantharamaiah, G., Hassan, K., Hough, G., Watson, A., Reddy, S., Sevanian, A., Fonarow, G., Fogelman, A. (2000). Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res*, 41:1495-1508.
- Ojeda, D., Jiménez-Ferrer. E., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J., Alvarez, L. (2010). Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiósides from *Hibiscus sabdariffa*. *J Ethnopharmacol*, 127(1), 7-10.
- Olawale, A. (2011). Studies in concentration and preservation of sorrel extract. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), pp. 416-423.
- Palamidis N, Markakis P. 1978. Stability of grape anthocyanin in carbonated beverages. *Semana Vitivinicola* 33:2633-2639.
- Pascual-Teresa, S., Moreno, D., García-Viguera, C. (2010). Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *International Journal of Molécular Sciences*, 11, 1679-1703.
- Passamonti, S.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 296, 631–636.
- Passamonti, S.; Vrhovsek, U.; Vanzo, A.; Mattivi, F. Fast access of some grape pigments to the brain. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7029–7034.
- Passamonti, S.; Vrhovsek, U.; Vanzo, A.; Mattivi, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett.* 2003, 544, 210–213.
- Pourrat H, Bastide P, Dorier P, Tronche P. (1967). Préparation et activité thérapeutique de quelques glycosides d'anthocyanes. *Chim Thérap*; 2:33-8.
- Prior R. L. 2004. Absorption and metabolism of anthocyanins: potential health effects in phytochemicals - mechanisms of action. In "Phytochemicals: mechanism of action". (Meskin M. S., Bidlack W. R., Davies A. J., Lewis D. S., Randolph R. K. Eds.) CRC Press, Boca Raton, pp. 1-19.
- Pritchard, K., Groszek, L., Smalley, D., Sessa, W., Wu, M., Villalon, P., Wolin, M., Stemerman, M. (1995). Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res*, 77(3):510-518.

- Qin, Y., Xia, Min., Ma, J., Hao, Y., Liu, J., Mou, H., Cao, Li., & Ling, W. (2009). Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am J Clin Nutr*, *90*, 485–492.
- Ramirez-Rodrigues, M., Plaza, M., Azeredo, A., Balaban, M., & Marshall, M. (2011). Physicochemical and Phytochemical Properties of Cold and Hot Water Extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science*, *76*(3), 428-435.
- Rechner, A., Kroner, C. (2007). Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis Research*, *116*, 327-334.
- Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins (tesis de doctorado). Universidad de Helsinki, Departamento de Quimica aplicada y Microbiología. Finlandia. 88 + 34 pp.
- Renaud SC, Beswick AD, Fehily AM, Sharp DS, Elwood PC. Alcohol and platelet aggregation: the Caerphilly prospective heart disease study. *Am J Clin Nutr* 1992;*55*:1012-7.
- Rosenson RS (2004). Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis*, *173*:1-12.
- Ruang Sri, P., Chumsri, P., Sirichote, A., & Itharat, A. (2008). Changes in quality and bioactive properties of concentrated Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *As. J. Food Ag-Ind.* *1*(02), 62-67.
- Sakamura S, Shibusa S, Obata Y. 1966. Separation of a polyphenoloxidase for anthocyanin degradation in eggplant. *J Food Sci* *31*: 317-319.
- Salah, A; Gathumbi, J & Vierling, W. (2002). Inhibition of intestinal motility by methanol extract of *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) in rats. *Phytother res.* *16*(3), 283-285.
- Sarni-Manchado P, Cheynier V, Moutounet M. 1997. Reactions of polyphenoloxidase generated caftaric acid o-quinone with malvidin 3-O-glucoside. *Phytochemistry* *45*: 1365-1369.
- Schmitt, E., Stopper, H. (2001). Estrogenic Activity of Naturally Occurring Anthocyanidins. *Nutrition and cancer*, *41*(1&2), 145–149
- Seeram, N.P., Bourquin, L.D., and Nair, M.G. 2001b. Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *J Agric Food Chem*, *49*: 4924–4929.
- Starr MS, Francis FJ. 1968. Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice. *Food Tech* *22*: 1293-1295.
- Stein, J., Keevil, J., Wiebe, D., Aeschlimann, S., Folts, J. (1999). Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation*, *100*, 1050-1055.

- Sumner, M., Elliott-eller, M., Weidner, G., et al. (2005). Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol*, 96, 810-814.
- Sydow, K., Münzel, T. (2003). ADMA and oxidative stress. *Atherosclerosis Suppl*, 4:41-51.
- Takeoka G., Dao L. 2002. Anthocyanins. In "Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals". (Hurst W. J. eds.) CRC press, Boca Boton. 219-241.
- Teller, N., Thiele, W., Marczylo, T., Gescher, A., Boettler, U., Sleeman, J., Marko, D. (2009). Suppression of the kinase activity of receptor tyrosine kinases by anthocyanin-rich mixtures extracted from bilberries and grapes. *J Agric Food Chem*, 57(8):3094-101.
- Thieme, H., Nass, J., Nuskovski, M., Bechrakis, N., Stumpff, F., Strauss, O., & Wiederholt, M. (1999). The effects of protein kinase C on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *IOVS*, 40(13), 3254-3261
- Tsoyi, K.; Park, H., Kim, Y., Chung, J., Shin, S., Lee, W., Seo, H., Lee, J., Chang, K., Kim, H. Anthocyanins from black soybean seed coats inhibit UVB-induced inflammatory cyclooxygenase-2 gene expression and PGE2 production through regulation of the nuclear factor-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J. Agric. Food Chem.*
- Tsuda T, Horio F & Osawa T (1999) Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Lett* 449, 179–182.
- Uittenbogaard, A., Shaul, P., Yuhanna, I., Blair, A., Smart, E. (2000). High density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem*, 275(15):11278-11283.
- Velasco, J. (2000). Guías de práctica clínica en prevención cardiovascular y rehabilitación cardíaca. *Rev Esp Cardiol*, 53:1095-1120.
- Vergnani, L., Hatrik, S., Ricci, F., Passaro, A., Manzoli, N., Zuliani, G., Brovkovich, V., Fellin, R., Malinski, T. (2000). Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability. *Circulation*, 101(11):1261-1266.
- Villeda, L. (2011). Estudio de Riesgo Cardiovascular en Docentes y Personal Administrativo de la facultad de ciencias químicas y farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala
- Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr* 2007;137:2043-8.
- von Elbe , J.H. and Schwartz , S.J. (1996) Colorants . In *Food Chemistry* (Fennema , O.R. , ed.), pp. 651 – 722 , Marcel Dekker , New York

- Wallace, T. (2011). Anthocyanins in Cardiovascular Disease. *Advances in Nutrition, An international Review Journal* 2:1–7
- Wallach, J. (2002). *Interpretación Clínica de las pruebas de laboratorio*. Masson. 4(ed).
- Wang, D. (2006). Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption. *Annu Rev Physiol*, 69:221-248.
- Wang, L & Stoner, G. (2008) Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269, 281–290.
- Weinstein S.L., Sanghera J.S., Lemke K., De Franco A.L., Pelech S.L. (1992) Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J. Biol. Chem*; 267:14955-14962.
- Wong, N., Cupples, L., Ostfeld, A., Levy, D., Kannel, W. (1989). Risk factors for long term coronary prognosis after initial myocardial infarction: the Framingham heart Study. *Am J Epidemiol*, 130:469-480.
- Woodward G, Kroon P, Cassidy A, Kay C. (2009). Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. *J Agric Food Chem*, 57,5271-5278.
- Wrolstad RE, Skrede G, Lea P, Enersen G. 1990. Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. *J Food Sci* 55: 1064-1072.
- Wu X, Cao G, Prior RL. (2002). Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr*;132:1865-71.
- Yi W, Akoh CC, Fischer J, Krewer G. (2006). Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by caco-2 human intestinal cell monolayers. *J Agric Food Chem*;54:5651-8.
- Yokotsuka K, Singleton VL. 1997. Disappearance of anthocyanins as grape juice is prepared and oxidized with PPO and PPO substrates. *Am J Enol Vitic* 48: 13-25.
- Zou, M., Shi, C., Cohen, R. (2002). Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric-oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*, 109:817-826.

XIII. ANEXOS

13.1. FICHA TÉCNICA DE ROSA DE JAMAICA

Nombre científico: *Hibiscus sabdariffa* Linn.

Sinonimias: *Hibiscus cruentus* Bertol.

Familia: Malvaceae.

Nombres populares: Roselle o Rozelle (Inglaterra), Karkadé (Francia, Egipto, Arabia, Sudán y norte de África), Bissap (Senegal), omutete (Namibia), Sorrel (Caribe y Jamaica), Jamaica o Rosa de Jamaica (Latinoamérica), Gongura o lalamgari (India).

Varietades: Según la naturaleza de su producción las variedades de *Hibiscus sabdariffa* han dado origen a tres grupos de variedades, que son: variedades productoras de fibra (altissima y bhagalpuriensis), variedades intermedias para fibra y cálices (intermedius, albus y ruber), y variedades para obtención de cálices por su cantidad de antocianinas (archer, temprano, victor, rico).



Descripción botánica: Hierba semileñosa, anual, erecta, 1-3m de alto, corteza roja, labra, con una raíz principal penetrante. Tiene un tallo cilíndrico liso, color rojo o verde oscuro. Hojas alternas, de 7.5-12-5cm de largo, lóbulos angostos, borde aserrado; nervadura central, con venación roja; glándula grande cerca de la base en el envés. Flores hermafroditas con bractéolas unidas con el cáliz (5 sepalos largos con epicaliz), axilares, forman una copa grande, carnosa, rojo oscura, pedículos cortos. Cáliz de 2 cm de largo en número de 5; 5 pétalos, 4-5cm de largo; estambres numerosos, ovario superior con 5 carpelos cerrados, placentación axial. Fruto en cápsula densamente estrigosa, más corta que el cáliz. Semillas puberulentas [Mahadevan & Kamboj, 2009, p. 79].

Agricultura: La Rosa de Jamaica se puede cultivar en clima tropical y subtropical del país, con altura sobre el nivel del mar de 0 a 1,400 metros y temperatura de 22°C. Esta planta crece bien en distintas clases de suelos y aún con bajo contenido de nutrientes (baja fertilidad), pero los más indicados son los suelos francos, con fertilidad moderada, principalmente en nitrógeno para evitar que la planta crezca demasiado y nos produzca el mayor número de cálices. Requiere lluvia mensual de 130-260mm en los primeros 3-4 meses de crecimiento. Crece en bosque seco y

monte espinoso subtropical, clima cálido, terreno húmedo (200-450 cc/año), pH 4.0-5-8, suelo arenoso-arcilloso rico en materia orgánica; resiste la sequía, adaptable a lugares secos. Polinización por insectos. Se propaga por semillas (5Kg/ha), sembradas en caja o cama a distancia de 8-10cm en cuadro, se entierran a 1-2cm de profundidad. Para la cosecha es necesario tomar como un indicador la abertura de la cápsula, lo cual se da de 5 a 6 meses después de la siembra, ya que en este tiempo brácteas y cálices alcanzan su tamaño óptimo [Hidalgo-Villatoro, 2009, p. 109].

Distribución: Nativa de Asia (India o Malasia) o África (Angola). Crece en los trópicos, como el Caribe, Centro América, México, India, África, Brasil, Australia, Hawái, Florida, Sudan, y Filipinas. En Guatemala se cultiva en tierras bajas de Baja Verapaz, El Progreso, Izabal, Huehuetenango, Quiché, Santa Rosa, Jutiapa, Jalapa y Petén [Hidalgo-Villatoro, 2009, p. 109].

Farmacognosia: La materia médica son las flores (cálices y epicálices) [Mahadevan & Kamboj, 2009, p. 79].

Composición química: Las flores (cálices) contienen: 1) ácidos orgánicos en un 15-30% (cítrico, hibiscico, málico, ascórbico, tartárico, oxálico, protocatéquico, clorogénico), 2) polisacáridos mucilaginosos en un 50% (ácidos urónicos en forma de sal y el resto ramnosa, arabinosa y pequeñas cantidades de glucosa, xilosa y manosa), 3) antocianinas en un 1.5 % (delfinidina-3-sambubiósido, cianidina 3-sambubiósido, hibiscina (delfinidina 3-xiloglucósido), cianidina-3-xiloglucósido, cianidina 3-monoglucósido, delfinidina 3-monoglucósido, delfinidina.), 4) otros constituyentes menores como flavonoides (hibiscitrina y su aglicona hibiscetina, gossipitrina, gossitrina, gossipetina, quercitina y sabdaritrina), polifenoles, y saponinas (β -sitosterol- β -D-galactopiranosido), fitosteroles (β -sitosterol, camosterol, ergosterol, estigmasterol), pectina, ácido aspártico y galacturónico [Mahadevan & Kamboj, 2009, p. 79].

Indicaciones terapéuticas: Hipertensión, hipercolesterolemia, disuria, infección urinaria, estreñimiento, gota, diabetes, hígado graso no alcohólico, glaucoma [Andersen & Markham, 2006, p. 475].

Farmacología: Las interacciones responsables de los usos terapéuticos se realizan a partir de: 1) Inhibición de Proteínas unidas a ATP, como Protein Quinasa C (PKC), Fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos (MAPK), quinasas c-Jun N-terminal (JNK), Quinasas Dependientes de Ciclinas (CDK), Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS) y Topoisomerasas I y II; 2) Inhibición de Receptores dependientes de ligandos, como Receptores de estrógenos y Receptores tirosina quinasas (Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR) y Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGFR)); 3) inhibición de

Enzimas Redox, como Lipoxigenasas (LOX), ciclooxigenasas (COX), xantina oxidasa (XO), metaloenzimas que catalizan la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS); 4) Modulación de proteínas reguladoras, como Proteína Transportadora de Esteres de Colesterol (CETP), glicerol-3-fosfato-acil-transferasa 1 (GPAT1), Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) [Andersen & Markham, 2006, p. 475].

Toxicología: La LD50 de extractos de cáliz de *H. sabdariffa* fue alrededor de 5000 mg/Kg, lo que indica que el extracto es no tóxico (Akindahunsi y Olaleye, 2003, p. 161).

13.2. HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Guatemala. _____.

Por éste conducto OTORGO MI CONSENTIMIENTO para participar la investigación denominada “Evaluación de la actividad Hipotrigliceridémica de un extracto de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en pacientes con triglicéridos superiores a 150 mg/dL, al administrarse antes y durante las comidas”. Hago constar que se me informó que mi participación se limita a:

- 1). Practicarme 4 estudios de Perfil Lipídico en sangre con un intervalo de 30 días entre cada uno.
- 2). Cumplir con la administración oral diaria tres veces al día por 60 días de:
(Tachar lo indicado)
() Extracto de Rosa de Jamaica 30 minutos antes de las comidas
() Extracto de Rosa de Jamaica durante las comidas
- 3). Reportar a mi médico cualquier malestar surgido durante el tratamiento.
- 4). Autorizar la publicación de los resultados obtenidos con total anonimato de los pacientes participantes.
- 5). No modificar mi dieta en el transcurso del estudio ni comenzar tratamiento farmacológico.

De igual manera hago constar que sé que el riesgo que corro durante el estudio es mínimo ya que no se utilizará ningún fármaco con efectos secundarios conocidos y que cualquiera de las sustancias que se me administrarán son de uso común en la dieta habitual del medio en el que habito.

Nombre _____
Firma

Teléfono _____ Correo electrónico: _____

13.3. HOJA DE TOMA DE DATOS DE EXAMENES DE SANGRE

UNIVERSIDAD DE SAN
CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE CC. QQ. Y
FARMACIA

Ciudad Universitaria, zona 12
Guatemala, Centroamérica

“Evaluación de la actividad Hipotrigliceridémica de un extracto de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en pacientes con triglicéridos superiores a 150 mg/dL, al administrarse antes y durante las comidas”.

Hoja de toma de datos

Nombre: _____ Código _____

Edad: _____ Fecha: _____

Exámenes de laboratorio

	Valor de Referencia
1. Colesterol sérico total _____	140-220 mg/dL
2. Colesterol de Alta densidad (HDL) _____	mayor de 40 mg/dL
3. Colesterol de Baja densidad (LDL) _____	Menor a 130 mg/dL
4. Triglicéridos _____	35-150 mg/dL

Químico biólogo responsable _____

Firma: _____

13.5. FOTOS DE LA ELABORACIÓN DEL EXTRACTO DE ROSA DE JAMAICA

13.5.1. Colocación de la materia vegetal en el Horno



13.5.2. Secado de la materia vegetal en el horno



13.5.3. Reactor CSTR



13.5.4. Materia prima dentro de Reactor CSTR



13.5.5. Materia prima con solvente dentro del Reactor CSTR durante el proceso de extracción



13.5.6. Descarga del extracto inicial del Reactor CSTR



13.5.7. Descarga del extracto inicial



13.5.8. Extracto inicial durante el proceso de Filtración



13.5.9. Sistema de Tuberías



13.5.10. Caldera pirotubular



13.5.11. Marmita de extracción con torre empacada



13.5.12. Extracto inicial dentro de Marmita de extracción durante el proceso de concentración



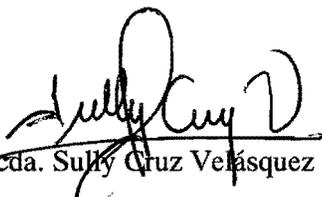
13.5.13. Extracto concentrado dentro de Marmita de extracción**13.5.14. Llave de Mariposa para descarga**

13.5.15. Extracto concentrado dentro de su envase primario**13.5.16. Frascos en almacenaje refrigerado**



Rodrigo Castañeda Molina

Autor de Tesis



Licda. Sully Cruz Velásquez

Asesora de Tesis



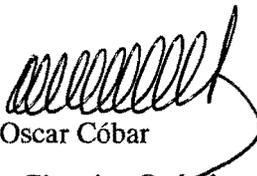
MSc. Eleonora Gattán Izaguirre

Revisora de Tesis



Licda. Lucrecia Martínez de Haase

Directora de la Escuela de Química Farmacéutica



Dr. Oscar Cobar

Decano de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia