



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación**

**“Efecto antioxidante e hipolipemiante del
Neem (*Azadirachta indica*)”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

PRESENTA

IBt. ORDOÑEZ RUIZ IDRIS MAGDALENA

DIRECTORES:

DRA. GLORIA DÁVILA ORTIZ

DR. MIGUEL ÁNGEL A. IBÁÑEZ HERNÁNDEZ



México, D. F.

Enero de 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 1 del mes de diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENCB-IPN para examinar la tesis titulada:

Efecto antioxidante e hipolipemiente de extractos de hojas del Neem (*Azadirachta indica*)

Presentada por la alumna:

Ordóñez
Apellido paterno

Ruiz
Apellido materno

Idris Magdalena
Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	1	5	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez
Hernández


Dra. Gloria Davila Ortiz


Dr. José Luis Muñoz Sánchez


Dra. Cristian Jiménez Martínez


Dr. Juan Carlos Santiago Hernández


Dr. Sergio Enrique Meza Toledo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Manuel Jesús Piñón López



SEP
Escuela Nacional de
Ciencias Biológicas
Sección de Estudios
de Posgrado
e Investigación



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 6 del mes de Enero del año 2012, la que suscribe Idris Magdalena Ordóñez Ruíz alumna del Programa de Biomedicina y Biotecnología Molecular con número de registro 001424, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Gloria Dávila Ortiz y el Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández y cede los derechos del trabajo intitulado "Efecto antioxidante e hipolipemiante del Neem (*Azadirachta indica*)", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección gdavilao@yahoo.com y mibanez_01@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A tenamente,


IBt. Idris Magdalena Ordóñez Ruíz


Dra. Gloria Dávila Ortiz


Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez
Hernández.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
Índice de Figuras	iv
Índice de Cuadros	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Especies reactivas de oxígeno.....	1
I.1.1 Estrés oxidativo	1
I.2 Lípidos en el cuerpo humano	2
I.2.1 Triacilglicéridos.....	3
I.2.1.1 Emulsificación y digestión de los triacilglicéridos de la dieta	4
I.2.1.2 Utilidad de los triacilglicéridos	4
I.2.1.3 Adipocitos	5
I.2.2 Colesterol	6
I.2.2.1 Obtención de colesterol en la dieta	7
I.2.2.2 Síntesis de colesterol	8
I.2.2.3 Transporte del colesterol del hígado a los tejidos periféricos	9
I.2.2.4 Transporte del colesterol de la periferia al hígado	9
I.2.2.5 Regulación de la homeostasis del colesterol	10
I.2.2.6 Formación de ateromas	11
I.4 Tratamientos farmacológicos hipolipemiantes	12
I.5 Tratamientos hipolipemiantes alternativos.....	14
I.5.1 Compuestos fenólicos y flavonoides	15
I.6 Compuestos antioxidantes	17
I.7 Neem	18
I.7.1 Toxicidad del Neem (<i>A. indica</i>)	19
I.8 ANTECEDENTES	21
I.9 HIPOTESIS	22
I.10 JUSTIFICACIÓN	22
I.11 OBJETIVOS	23
I.11.1 Objetivo General	23
I.11.2 Objetivos Específicos	23

II METODOLOGÍA.....	24
II.1 Material biológico	24
II.2.1 Análisis químico proximal.....	25
II.2.1.1 Determinación de la Humedad.....	25
II.2.1.2 Determinación de cenizas por incineración	25
II.2.1.2.1 Procedimiento	25
II.2.1.3 Determinación de Materia grasa	26
II.2.1.3.1 Procedimiento	26
II.2.1.4 Determinación de proteínas por micro-Kjeldahl.....	26
II.2.1.4.1 Procedimiento	27
II.2.1.5 Determinación de Carbohidratos totales.....	27
II.2.1.5.1 Procedimiento	28
II.2.2 Determinación de metabolitos secundarios de interés	28
II.2.2.1 Determinación de Compuestos fenólicos.....	28
II.2.2.1.1 Procedimiento	29
II.2.2.2 Determinación de Flavonoides.....	29
II.2.2.2.1 Procedimiento	29
II.2.3 Obtención de extractos de las hojas del Neem.....	30
II.2.3.1 Extracto acuoso (infusión).....	30
II.2.3.2 Extracto etanólico.....	30
II.2.4 Caracterización del contenido de carbohidratos, fenólicos y flavonoides de las hojas de Neem y de los extractos acuoso y etanólico por cromatografía en placa fina	31
II.2.4.1 Desarrollo de la cromatografía en placa fina	31
II.2.4.3 Determinación del Factor de retención (Rf)	32
II.2.5 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos	32
II.2.5.1 Método del DPPH.....	32
II.2.5.1.1 Procedimiento	33
II.2.5.2 Método de quelación del ión Cobre	33
II.2.5.2.1 Procedimiento	34
II.2.5.3 Método de quelación del ión Hierro	34
II.2.5.3.1 Procedimiento	34
II.2.5.4 Método para determinar el poder reductor.....	34
II.2.5.4.1 Procedimiento	35
II.2.6Cultivo de las líneas celulares.....	35
II.2.6.1 Línea celular Hep G2	35
II.2.6.1.1 Procedimiento	35
II.2.6.2 Diferenciación de fibroblastos 3T3L1 a adipocitos.	36

II.2.6.1 Procedimiento	36
II.2.7 Tratamiento de las líneas celulares con los diferentes extractos de Neem.....	37
II.2.8 Evaluación del efecto hipolipemiente	38
II.2.8.1 Determinación de colesterol (Método CHOD-PAP)	38
II.2.8.1.1 Procedimiento	38
II.2.8.1.2 Calculo de concentración de colesterol	39
II.2.8.2 Determinación de triacilglicéridos (Método GPO-PAP)	39
II.2.8.2.1 Procedimiento	39
II.2.8.2.2 Cálculo de concentración de triacilglicéridos	40
III RESULTADOS.....	41
III.1 Análisis químico proximal.....	41
III.2 Compuestos fenólicos totales en hojas del Neem.	42
III.3 Rendimiento de obtención de extracto etanólico	42
III.4.1 Identificación de carbohidratos	43
III.4.1.1 Identificación de carbohidratos de los extractos de hojas del Neem obtenidos con los diferentes disolventes.....	43
III.4.1.2 Identificación de carbohidratos de los extractos acuosos y etanólico de hojas de Neem ...	44
III.4.2 Identificación de compuestos fenólicos totales	45
III.4.2.1 Identificación de compuestos fenólicos totales en los extractos obtenidos por hojas del Neem por 7 diferentes disolventes	45
III.4.2.2 Identificación de compuestos fenólicos totales delos extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem	46
III.4.3 Identificación de flavonoides	47
III.4.3.1 Identificación de flavonoides en los extractos obtenidos por hojas del Neem por 7 diferentes disolventes.....	47
III.4.3.2 Identificación de flavonoides del extracto acuoso y etanólico	48
III.4 Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides en extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem.....	49
III.5 Actividad antioxidante	50
III.5.1 Actividad sobre el radical DPPH	50
III.5.2 Actividad quelante de Cobre	51
III.5.3 Actividad quelante de Hierro	52
III.5.4 Poder Reductor	53
III.6 Efecto de los extractos sobre la línea celular HepG2	54
III.6.1 Tratamiento con extracto acuoso	54
III.6.1.1 Colesterol secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo.....	54
III.6.1.2 Triacilglicéridos secretados por las células HepG2 en el medio de cultivo	55

III.6.2 Tratamiento con extracto etanólico	56
III.6.2.1 Colesterol secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo	56
III.6.2.2 Triacilglicéridos secretados por las células HepG2 en el medio de cultivo	57
III.7 Efecto de los extractos sobre la línea celular 3T3L1 durante la diferenciación celular	58
III.7.1 Tratamiento con extracto acuoso	58
III.7.1.1 Colesterol contenido en los adipocitos 3T3L1	58
III.7.1.2 Triacilglicéridos contenidos en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular.....	59
III.7.2 Tratamiento con extracto etanólico	60
III.7.2.1 Colesterol contenido en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular	60
III.7.2.2 Triacilglicéridos contenidos en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular.....	61
III.7.3 Tratamiento con extracto acuoso a la línea celular 3T3L1 antes y durante la diferenciación a adipocitos	62
III.7.3.1 Colesterol contenido en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular	62
III.7.3.2 Triacilglicéridos contenidos en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular.....	63
III.7.4 Tratamiento con extracto etanólico a la línea celular 3T3L1 antes y durante la diferenciación a adipocitos	64
III.7.4.1 Colesterol contenido en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular	64
III.7.4.2 Triacilglicéridos contenidos en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular.....	65
IV.DISCUSIÓN	66
V. CONCLUSIONES	82
VII. REFERENCIAS	83
Anexo 1. Descripción de la especie	89
Anexo 2 Reveladores de cromatografía en placa fina.....	91

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura general de un triacilglicérido	3
Figura 2. Desarrollo de un adipocito.	6
Figura 3. Estructura del colesterol.....	6
Figura 4. Membrana plasmática.....	7
Figura 5. Distribución general del colesterol en el organismo.	8
Figura 6. Vista general de la biosíntesis del colesterol.	8
Figura 7. Captación de las LDL.....	9
Figura 8. Estructura general de los flavonoides.....	16
Figura 9. Neem (<i>A. indica</i>).	18
Figura 10. Esquema General de Trabajo.....	24

Figura 11. Reacción de formación de hidroxifurfural o furfural para identificación de carbohidratos. ...	28
Figura 12. Reacción de flavonoides con $AlCl_3$	29
Figura 13 Reacción de captación del radical libre del DPPH por un antioxidante.....	33
Figura 14. Macromoléculas presentes en hojas del Neem en los períodos de floración y fructificación.	41
Figura 15. Compuestos fenólicos y flavonoides en hojas del Neem en los períodos de floración y fructificación.....	42
Figura 16. Cromatograma de los extractos con los diferentes sin usar reveladores. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 17. Cromatograma de los extractos de hojas de Neem obtenidos con los diferentes disolventes revelados con p-anisaldehído-ácido sulfúrico, específico para carbohidratos.	43
Figura 18. Cromatograma en placa fina de extractos acuosos y etanólico de las hojas del Neem en el período de floración tratada con p-anisaldehído-ácido sulfúrico para identificar carbohidratos.....	44
Figura 19. Cromatograma en placa fina de extractos de hojas del Neem en el período de floración obtenidos con 7 diferentes disolventes tratada con p-anisaldehído-ácido acético glacial para identificar compuestos fenólicos.	45
Figura 20. Cromatograma en placa fina de extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem en el período de floración tratada con p-anisaldehído-ácido acético glacial para identificar compuestos fenólicos.	46
Figura 21. Negativo de cromatograma en placa fina de extractos de hojas del Neem en el período de floración obtenidos con 7 diferentes disolventes tratada con revelador de $AlCl_3$ para identificar flavonoides a 365nm	47
Figura 22. Negativo de cromatograma en placa fina de extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem en el período de floración tratada con revelador de $AlCl_3$ para identificar flavonoides a 365 nm	48
Figura 23. Compuestos fenólicos y flavonoides en extractos acuoso y etanólico de hojas del Neem en el período de floración.....	49
Figura 24. Actividad antiradical de extractos acuosos y etanólicos de hojas del Neem en el período de floración durante 30 min a diferentes concentraciones equivalentes de ácido gálico.	50
Figura 25. Capacidad secuestrante de Cu de los extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem en el período de floración a diferentes concentraciones.....	51
Figura 26. Capacidad quelante del Fe en presencia de extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem en el período de floración a diferentes concentraciones.....	52
Figura 27. Poder Reductor en presencia de los extractos acuosos y etanólico de hojas de Neem en el período de floración con diferentes concentraciones.....	53
Figura 28. Colesterol secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo durante el tratamiento con extracto acuoso de 24 h de extracción de hojas de Neem en floración.	54

Figura 29. Triacilglicéridos secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo durante el tratamiento con extracto acuoso de 24 h de extracción de hojas de Neem en floración.	55
Figura 30. Colesterol secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo durante el tratamiento con extracto etanólico de hojas de Neem en el período de floración.	56
Figura 31. Triacilglicéridos secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo durante el tratamiento con extracto etanólico de hojas de Neem en el período de floración.	57
Figura 32. Colesterol en los adipocitos 3T3L1 tratados diariamente con extracto acuoso de hojas de Neem en el período de floración con 24 h de extracción durante la diferenciación.	58
Figura 33. Triacilglicéridos en los adipocitos 3T3L1 tratados diariamente con extracto acuoso de hojas de Neem en el período de floración con 24 h de extracción durante la diferenciación.	59
Figura 34. Colesterol en los adipocitos 3T3L1 tratados diariamente con el extracto etanólico de hojas de Neem en el período de floración durante la diferenciación.....	60
Figura 35. Triacilglicéridos en los adipocitos 3T3L1 tratados diariamente con el extracto etanólico de hojas de Neem en el período de floración durante la diferenciación.....	61
Figura 36. Colesterol en los adipocitos 3T3L1 pretratados y tratados diariamente con extracto acuoso con 24h de extracción de hojas de Neem en el período de floración durante la diferenciación.	62
Figura 37. Triacilglicéridos en los adipocitos 3T3L1 pretratados y tratados diariamente con extracto acuoso con 24 h de extracción de hojas de Neem en el período de floración durante la diferenciación..	63
Figura 38. Colesterol en los adipocitos 3T3L1 pretratados y tratados diariamente con extracto etanólico de hojas de Neem en el período de floración durante la diferenciación..	Error! Marcador no definido.
Figura 39. Triacilglicéridos en los adipocitos 3T3L1 pretratados y tratados diariamente con extracto etanólico de hojas de Neem en el período de floración durante la diferenciación..	Error! Marcador no definido.
Figura 40. Estructura de los estándares probados para actividad antioxidante	73

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Macromoléculas que son afectadas por las especies reactivas de oxígeno y el daño molecular provocado	2
Cuadro 2. Mecanismo de acción de fármacos hipolipemiantes.....	12
Cuadro 3. Mecanismo de acción de fármacos hipolipemiantes.....	13
Cuadro 4. Extracción con diferentes disolventes de las hojas de Neem. Se realizó la extracción durante 24 h con cada uno de los disolventes.....	31
Cuadro 5. Reveladores específicos para carbohidratos, fenólicos y flavonoides.....	32

ABREVIATURAS

CFT	Compuesto fenólicos totales
CF	Compuestos fenólicos
FI	Flavonoides
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
CoQ	Coenzima Q
TNFR	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad
rLDL	Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
Qm	Quilomicrón
VLDL	Lipoproteína de muy baja Densidad
HMG-CoA	Hidroxidroximetilglutaril-CoA reductasa
ACAT	Colesterol acil transferasa
PPAR α	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
TG	Triacilglicéridos
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
% ARA	% Actividad antirradical
CHOD-PAP	Cholesterol oxidase-phenol + aminophenazone
GPO-PAP	Glycerol-3-phosphate - phenol + aminophenazone
TCA	Ácido Tricloroacético

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO's) son una variedad de moléculas y radicales (especies químicas con un electrón desapareado), derivados de oxígeno molecular (Turrens, 2003). Un estado en el que aparecen excesivas cantidades de ERO's se conoce como estrés oxidativo, esto conduce a daños moleculares, como por ejemplo oxidando a las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Este es un factor de riesgo que aunado a las dislipidemias pueden conducir a la formación de ateromas y accidentes cerebrovasculares. Para prevenir estos padecimientos, se recomienda el uso de fármacos hipolipemiantes, sin embargo; provocan efectos secundarios indeseados y los costos para adquirirlos son elevados por lo que no son accesibles para toda la población que no cuenta con recursos o algún tipo de seguridad social. Por esta razón, se ven orillados a recurrir a la medicina alternativa, como es el uso de remedios herbales por las propiedades que les confieren los compuestos contenidos en las plantas y sus partes, fotoquímicos como los compuestos fenólicos (CF) y flavonoides (FI) con propiedades antioxidantes e hipolipemiantes.

El Neem (*Azadirachta indica*) es un árbol proveniente de la India, que ha sido introducido desde hace algunas décadas a Latinoamérica y del que se han publicado diversos reportes acerca de sus extensas propiedades en diversas ramas, desde la agropecuaria hasta la medicinal. Por esta razón, este trabajo se enfocó en determinar el efecto antioxidante e hipolipemiante de extractos de hojas de Neem (*A. indica*). Esto se llevó a cabo con hojas de Neem recolectadas en el período de floración y fructificación a las que se les realizó un análisis químico proximal y se determinaron los CF y FI, encontrándose en las hojas en el período de floración una mayor cantidad de estos. A partir de estos resultados se seleccionaron las hojas en el período de floración para la obtención de extractos acuosos y etanólicos y se les determinó el contenido de compuestos fenólicos y evaluó la actividad antioxidante, encontrándose que en los extractos acuosos con 24 h de extracción existía un mayor contenido de CF y FI y una mayor actividad antioxidante con respecto a los extractos etanólicos. Por último, se evaluó el efecto de los extractos acuosos de 24 h de extracción y etanólicos de las hojas de Neem en el período de floración sobre el metabolismo de células de hepatocarcinoma HepG2 y fibroblastos 3T3L1 diferenciados a adipocitos y no se observó ningún efecto citotóxico de ambos extractos sobre las líneas celulares, pero si se registró un efecto hiperlipemiante e

hipolipemiante en la liberación y almacenaje de lípidos en las líneas celulares por lo que se recomienda un uso moderado de ambos tipos de extractos de Neem, ya que con los resultados obtenidos se puede inferir que el uso indiscriminado de estos, podrían causar reacciones contrarias a las deseadas de quién los consuma que pueden ser nocivas para la salud.

ABSTRACT

The reactive oxygen species (ROS) are molecules and radical(chemical species with a disapper electron) from molecular oxygen (Turrens, 2003). A state in which they appear excessive amounts of ROS is known as oxidative stress, this leads to molecular damage such as oxidized low-density lipoprotein (LDL).This is a risk factor which together to dyslipidemias increases the potential of formation of atheromas and cerebrovascular accidents. To prevent these ailments the doctors recommend the use of hypolipidemic drugs, it has some disadvantages because causes side effects and these are expensive and not all the population that has monetary resources or social security to acquire. For that reason, they finding treatment with alternative medicine like herbal medicine because has properties that confer the compounds contained in plants and their parts, phytochemicals such as phenolic compounds (PC) and flavonoids (FI) with antioxidant and lipid lowering.

The Neem (*Azadirachta indica*) is a tree from India, which has been introduced from Latin America decades ago and who have published several reports on his extensive properties in various fields, from agriculture to medicine. That is this work focused on determining the antioxidant and lipid lowering effect of leaf extracts of Neem (*A. indica*). This was studied with Neem leaves collected in the flowering and fruiting period to which they were made proximal chemical analysis and determined the PC and FI, found on leaves in the flowering period of more of these. From these results we selected leaves in the flowering period for obtain an ethanolic and aqueous extracts, what were analyzed to know the phenolic content and evaluate the antioxidant activity. Founded in the aqueous extracts with 24 h of extracting was greater PC and FI content and higher antioxidant activity compared to ethanol extracts. Finally, we evaluated the effect of aqueous extracts of 24 h of extraction and ethanolic neem leaves in the flowering period on the metabolism of hepatocarcinoma cells Hep G2 and fibroblasts 3T3L1 differentiated to adipocytes and there was no cytotoxic effect of both extracts on cell lines, but if there was a hypolipidemic and hyperlipidemic effect in the release and storage of lipids in the cell lines. With the results obtained it can be inferred that the indiscriminate use of these could cause unwanted reactions contrary to the consumer who can be harmful to health.



I. INTRODUCCIÓN

I.1 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO's) son una variedad de moléculas y radicales (especies químicas con un electrón desapareado), derivados de oxígeno molecular (Turrens, 2003). Cuando las ERO's se encuentran en bajas concentraciones, debido a la expresión de enzimas antioxidantes; involucran mecanismos de respuesta celular como defensas ante infecciones, como mediadores en cuadros de inflamación (Gadoth & Göbel, 2011).

La mitocondria es el principal proveedor de ATP en forma de energía química y son las responsables del uso de más del 90% del oxígeno en la célula. De este, del 1-2% se reduce a anión superóxido (H_2O_2), ya que durante el transporte de electrones se forma el radical de la coenzima Q (CoQ) que puede transferir un electrón al O_2 . El H_2O_2 , a su vez puede ser totalmente reducido a agua o parcialmente reducido a radical hidroxilo ($OH\bullet$), por la presencia de metales de transición reducidos, como el Fe^{2+} y Cu^+ . El $OH\bullet$ es uno de los oxidantes más fuertes en la naturaleza (Turrens, 2003). La mayoría de los daños de las ERO's, a nivel macromoléculas, se observan en los ácidos nucleicos (ADN/ARN), lípidos y proteínas, durante el estrés oxidativo (Cuadro1) (Akterin, 2008).

I.1.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se puede definir como un estado en el que aparecen excesivas cantidades de ERO's (Akterin, 2008). Las ERO's pueden tener origen en la cadena respiratoria en la mitocondria, pero también por el consumo de cigarro, la contaminación, radiación UV o ionizante.

Cuadro 1. Macromoléculas que son afectadas por las especies reactivas de oxígeno y el daño molecular provocado

MACROMOLECULAS	DAÑO OXIDATIVO
ADN/ARN	<ul style="list-style-type: none"> • Principalmente por OH• mutaciones en los pares de bases (rearrreglos, deleciones, inserciones y amplificación de secuencias). • A nivel cromosomal; mutaciones puntuales que activan o inactivan genes relacionados con promoción o activación de tumores. • Vías de señales de transducción nuclear o citoplasmática por H₂O₂ dirige el desplazamiento de la subunidad inhibitoria del factor de transcripción citoplasmático-nuclear. <p>El ARN es más propenso que el ADN; esto se debe a su accesibilidad, ya que el ADN se encuentra relativamente menos asociado con proteínas, porque contiene una extensiva distribución subcelular y a el RNA citoplasmático se encuentra próximo a la mitocondria donde mayoritariamente se forman las ERO's.</p>
Proteínas	<ul style="list-style-type: none"> • Todos los residuos de aminoácidos de las proteínas son susceptibles a la oxidación por OH•. • Ataque sobre los enlaces peptídicos glutamil, aspartil y prolil, y sobre los residuos de aminoácidos azufrados, cisteína y metionina. • Sobre los residuos de aminoácidos aromáticos, formando derivados hidroxil y carbonilo que pueden introducirse a proteínas, peroxidación lipídica y reducción de carbohidratos.
Lípidos	<ul style="list-style-type: none"> • Interactúan con los receptores de membrana, como es el Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR), y aumenta la sensibilidad de sus ligandos o se activan en ausencia de los ligandos. • En particular el OH•, induce la peroxidación lipídica, que afecta la membrana disminuyendo su fluidez e interfiriendo con su integridad. • Pueden oxidar a las LDL (ox-LDL), induciendo la formación de la placa ateromatosa.

(Berlett & Stadtman, 1997; Wiseman & Halliwell, 1996; Li *et al.*, 2006; Schultz *et al.*, 2005; Hung *et al.*, 2006.)

I.2 Lípidos en el cuerpo humano

Los lípidos son un grupo heterogéneo de compuestos, incluyendo grasas, aceites, esteroides, ceras y compuestos relacionados. En el cuerpo humano se producen varios tipos de lípidos:

1. Triacilglicéridos

-
2. Colesterol
 3. Lípidos polares: fosfolípidos y esfingolípidos

Mientras que los lípidos polares y el colesterol se encuentran en las membranas celulares, los triacilglicéridos (TG) se limitan básicamente a los tejidos grasos, que los almacenan y liberan (Palmer, 2008). Los lípidos que provienen de los alimentos, principalmente los triacilglicéridos, durante la digestión se transforman a monoacilglicéridos y ácidos grasos libres, los cuales se resintetizan en los enterocitos del duodeno para formar parte de las lipoproteínas conocidas como quilomicrones (Qm). Todos los productos hidrófobos y liposolubles de la digestión, forman lipoproteínas para facilitar su transporte a los tejidos por el plasma (Mayes, 1997).

I.2.1 Triacilglicéridos

La principal forma del almacenamiento de energía en los organismos es en el tejido adiposo como triacilglicéridos (Figura1).

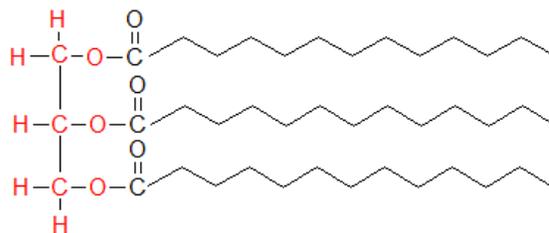


Figura 1. Estructura general de un triacilglicérido. En color rojo se representa el glicerol y en negro, tres ácidos grasos esterificados.

Las principales características de los triacilglicéridos son las siguientes:

1. Ofrecen mayor aporte energético en comparación a los carbohidratos y las proteínas. Esto se debe a su bajo contenido en oxígeno comparado a los carbohidratos, proporcionan la mitad de la masa de estos, pero esencialmente no suministran energía metabólica.
2. En las células grasas, se almacenan completamente libres de agua. En contraste, las proteínas y los carbohidratos, incluyendo el glucógeno, siempre deben mantenerse en un medio acuoso.

A causa de esta eficiencia de almacenamiento, tiene sentido que la mayor parte del exceso de carbohidratos y proteínas de la dieta, sea convertida a grasa, mientras que sólo una fracción limitada es almacenada como glucógeno (Palmer, 2008). Los triacilglicéridos se localizan almacenados en los adipocitos (tejido adiposo) (Mayes, 1997).

I.2.1.1 Emulsificación y digestión de los triacilglicéridos de la dieta

Cuando los triacilglicéridos se obtienen de la dieta, la digestión de estos depende de dos componentes:

1. **Ácidos biliares:** Estos actúan como detergentes y emulsifican aquellas pequeñas moléculas de grasa ingerida, en micelas pequeñas y de esta manera hacen que los triacilglicéridos sea accesibles a la digestión enzimática.
2. **Lipasa:** Es una enzima con actividad de esterasa. Esta es secretada por el páncreas, hidroliza triacilglicéridos a 2-monoacilglicérol y dos moléculas de ácidos grasos libres, que son captados por las células epiteliales del intestino delgado (duodeno), para ser incorporados en las lipoproteínas (Qm) y ser distribuidos a los órganos. Actúa sobre las moléculas de triacilglicéridos en la superficie de las micelas formadas por los ácidos biliares en el intestino (Mayes, 1997).

Vale la pena destacar que los ácidos grasos liberados, actúan como detergentes de sí mismos y este proceso contribuye a la suspensión de las grasas restantes. Si faltaran los ácidos biliares o la lipasa (debido al mal funcionamiento del hígado o del páncreas o la obstrucción de los conductos excretores), se produce una mala absorción de grasa y esta aparecerá en las heces, lo que se conoce como esteatorrea (Palmer, 2008).

I.2.1.2 Utilidad de los triacilglicéridos

Los productos finales de la digestión (ácidos grasos y monoacilglicerol), se resintetizan a triacilglicéridos para formar parte de los Qm en el quimo, los cuales se incorporan al sistema linfático desde el intestino hasta llegar al conducto torácico,

para incorporarse al sistema circulatorio para poder llegar al tejido adiposo, corazón y músculo, que por medio de la lipoproteinlipasa endotelial se digieren aproximadamente el 80% del total de triacilglicéridos, mientras que el 20% restante es captado por el hígado (Mayes, 1997).

Los ácidos grasos libres, en los tejidos periféricos, se pueden utilizar de dos formas diferentes:

1. Directamente: son captados por los tejidos que requieren energía y degradados por β -oxidación.
2. Indirectamente: después de la conversión inicial a los cuerpos cetónicos (acetoacetato y β -hidroxibutirato) en el hígado. El cerebro solo consume cuerpos cetónicos durante el ayuno (Mayes, 1997).

El segundo producto de la digestión de la grasa, el glicerol, es captado por el hígado. Esta molécula es fosforilada por la glicerol quinasa, después deshidrogenada a dihidroxiacetona fosfato y luego utilizada en la glucólisis o en la gluconeogénesis. Por lo tanto, el glicerol contribuye a mantener un suministro mínimo de glucosa en tiempos de inanición (Palmer, 2008).

I.2.1.3 Adipocitos

Los adipocitos (Figura 2), juegan un papel importante en la síntesis, almacenamiento e hidrólisis de los triacilglicéridos. Estos los almacenan durante los períodos de exceso de calorías pero movilizan esta reserva durante la insuficiencia de calorías. A lo largo del desarrollo, los adipocitos adquieren un complejo accesorio de enzimas y de proteínas para llevar a cabo la lipogénesis, el transporte intracelular de ácidos grasos y la lipólisis (Cornelius *et al.*, 1994). Los adipocitos captan y liberan el glicerol y ácidos grasos libres, que contribuyen a la relación de la glucosa hepática y periférica en el metabolismo. Con respecto a la homeostasis de la glucosa, el tejido adiposo, el corazón y el músculo esquelético, son tejidos conocidos por su expresión y relación del transportador dependiente de glucosa-insulina, que facilita la entrada de la glucosa posprandial en estas células (Kahn, 1996). Por lo tanto, los adipocitos

comprenden un programa de diferenciación en la relación de los genes implicados en la morfología celular, almacenamiento y liberación de los triacilglicéridos, metabolismo de la glucosa y la homeostasis energética (Nanbu-Wakao *et al.*, 2002).

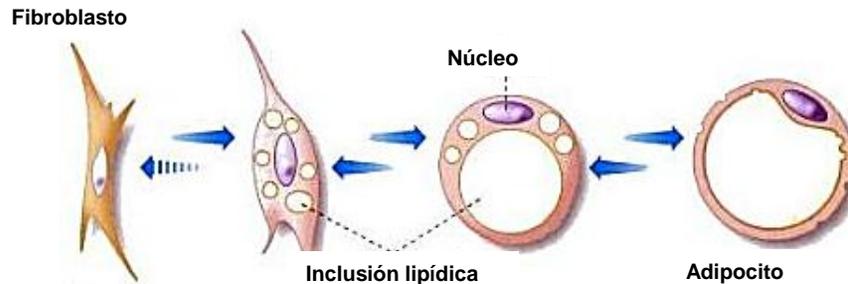


Figura 2. Desarrollo de un adipocito. De un tipo de fibroblastos, surge por producción y fusión de gotas pequeñas de lípidos, un adipocito maduro con una inclusión lipídica grande (Modificado de Welsch & Sobotta, 2009).

I.2.2 Colesterol

La estructura molecular del colesterol (Figura 3), no presenta similitud con la de los triacilglicéridos. Sin embargo, ambos son de naturaleza hidrofóbica, por lo que comparten el mismo mecanismo de transporte de los lípidos en el torrente sanguíneo, a través de las lipoproteínas (Mayes, 1997).

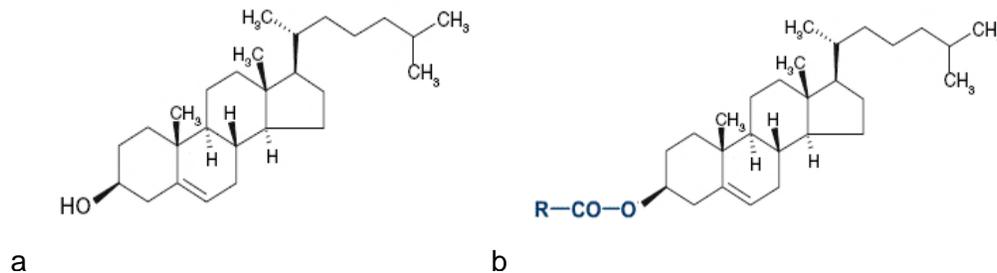


Figura 3. Estructura del colesterol a) Colesterol libre. b) Colesterol esterificado.

El colesterol puede obtenerse tanto de la dieta o por síntesis *de novo* en el hígado. Sin embargo, no puede degradarse, por lo tanto, no tiene un papel importante en el metabolismo energético (Mayes, 1997).

En la célula se presenta como un constituyente principal de la membrana plasmática (Figura 4). Controla propiedades físicas de esta estructura, que son importantes para la función de proteínas de membrana como receptores y transportadores.

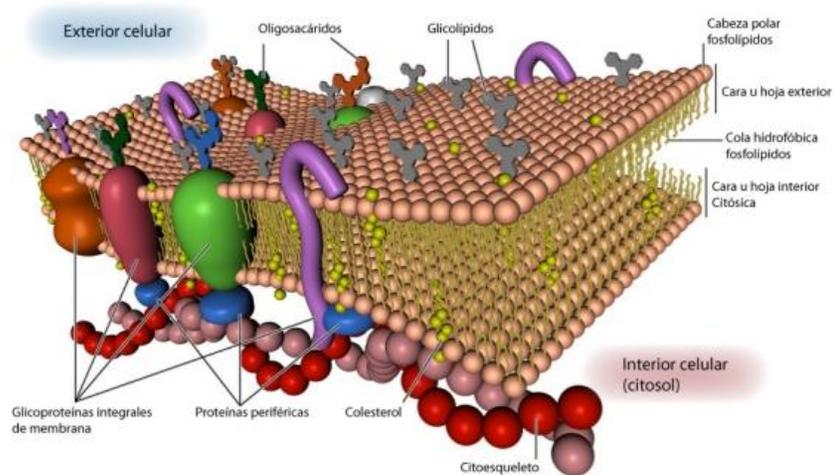


Figura 4. Membrana plasmática. Compuesta por colesterol en un 20% para conferirle estabilidad (URL1).

Además, el colesterol es el precursor de los ácidos biliares, de la vitamina D y de todas las hormonas esteroideas: andrógenos, estrógenos, progestágenos, glucocorticoides y mineralocorticoides (Palmer, 2008).

I.1.2.1 Obtención de colesterol en la dieta

El colesterol ingerido es absorbido en los intestinos e incorporado en los Qm (unión de una proteína y 10^7 moléculas de triacilglicéridos). El colesterol permanece en los Qm remanentes que finalmente serán fagocitados y degradados en el hígado, para que ahí se formen las lipoproteínas de muy baja densidad, donde el colesterol se incorpora, las cuales son transformadas a lipoproteínas de baja densidad, que son las que distribuyen finalmente todo el colesterol a las células en el organismo (Figura 5) (Palmer, 2008).

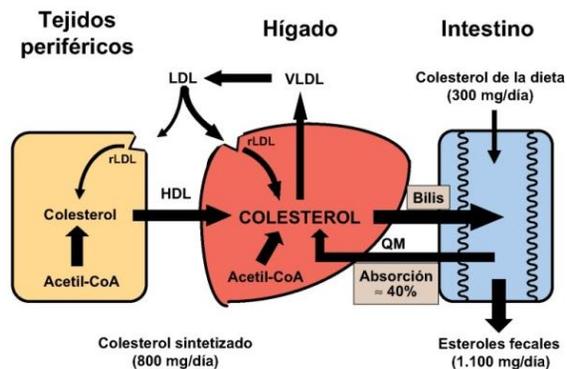


Figura 5. Distribución general del colesterol en el organismo. HDL: lipoproteínas de alta densidad; rLDL: receptor para las lipoproteínas de baja densidad (LDL); Qm: quilomicrones; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad (Ros, 2006).

I.1.2.2 Síntesis de colesterol

El principal sitio de la biosíntesis del colesterol es el hígado. Comienza en la mitocondria con el acetil-CoA, que se utiliza para sintetizar el hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA). Posteriormente, en el retículo endoplásmico liso, la HMG-CoA reductasa actúa sobre el HMG-CoA para producir mevalonato, que a su vez se convierte a varios compuestos isoprenoides. La reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa es el paso fundamental de la biosíntesis, lo que significa que a partir de este punto en adelante los sustratos se convierten en un esteroide. El ATP se utiliza para la carboxilación, la introducción del enlace doble C=C y la polimerización. La reacción más interesante es la ciclación del escualeno a lanosterol y posteriormente a colesterol (Figura 6) (Palmer, 2008).

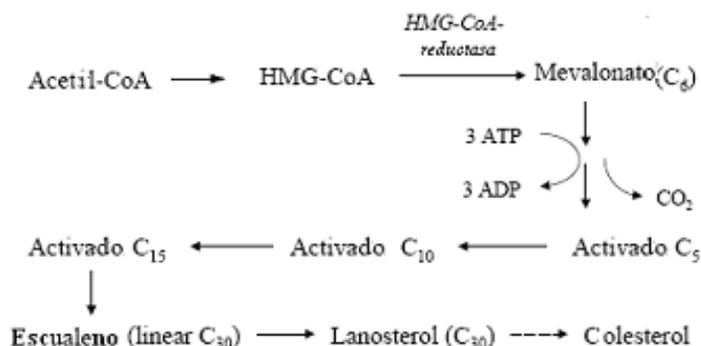


Figura 6. Vista general de la biosíntesis del colesterol. Se indica desde la síntesis del HMG-CoA, la polimerización a escualeno y la ciclación a lanosterol para formar finalmente el colesterol.

I.1.2.3 Transporte del colesterol del hígado a los tejidos periféricos

Cuando el colesterol es requerido por órganos extrahepáticos, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que se sintetizan en el hígado, transportan los triacilglicéridos y el colesterol (libre y esterificado) a las células de todo el organismo a través del torrente circulatorio. Las VLDL se convierten en lipoproteínas de baja densidad (LDL), después de depositar los triacilglicéridos en los tejidos extrahepáticos (Figura 5). Las LDL, que contienen el colesterol (aproximadamente el 50% de los lípidos de estas lipoproteínas es colesterol), son captadas por los tejidos extrahepáticos por endocitosis mediada por receptor (Figura 7) (Mayes, 1997).

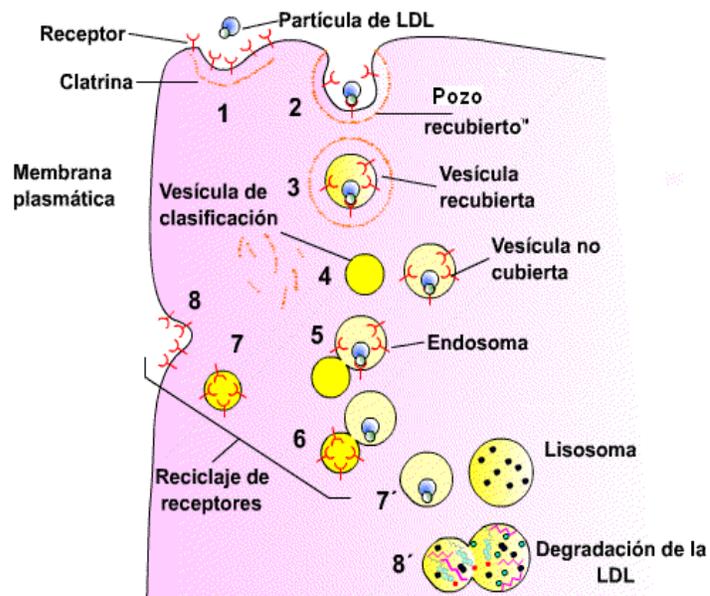


Figura 7. Captación de las LDL. Se indica el reconocimiento de las LDL por su receptor en la superficie celular, la fusión del endosoma con los lisosomas y el reciclaje del receptor (URL 2)

I.1.2.4 Transporte del colesterol de la periferia al hígado

El colesterol se transporta desde la periferia al hígado principalmente como colesterol esterificado (Figura 5b), por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Figura 3). Esta lipoproteína contiene el 50% de proteínas y el 50% de lípidos, por tanto su densidad es alta, propiedad de la que se deriva su nombre.

Un alto contenido de HDL en sangre periférica se asocia con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular, ya que su función es recolectar todo el colesterol libre que se encuentre no asociado a membranas o a lipoproteínas, porque evita la formación de ateromas. Como HDL, el colesterol es captado por el hígado para reciclarlo nuevamente en las lipoproteínas o se utiliza para la formación de los ácidos biliares, por lo que el otro nombre conferido a las HDL es “colesterol bueno”. A las lipoproteínas LDL, también se les denomina “colesterol malo” por su función contraria a la HDL, o sea las formadoras de ateromas (Palmer, 2008).

I.1.2.5 Regulación de la homeostasis del colesterol

Es un proceso vital para la estructura y función celular. Este control se obtiene por una serie de eventos en la célula, que le permiten un equilibrio adecuado entre la demanda y el consumo de colesterol para evitar el exceso y la acumulación (Soccio & Breslow, 2004).

La evolución de múltiples vías para prevenir la acumulación intracelular de colesterol libre, refleja el efecto dañino del exceso del colesterol celular (Tabas, 1997). Para mantener en equilibrio los niveles de colesterol en las células, se cuenta con receptores para las LDL para captar al colesterol exógeno (Defesche, 2004; Gent & Braakam, 2004) (Figura 5). Estos receptores se localizan en hendiduras en la membrana celular llamados pozos recubiertos, que se unen específicamente a la LDL. Después de la unión, el complejo receptor de lipoproteína se introduce a las células por endocitosis a través de los pozos recubiertos. Las vacuolas se fusionan con los lisosomas, donde las LDL se degradan por hidrólisis enzimática, liberándose el colesterol al citoplasma para el posterior metabolismo celular (Goldstein *et al.*, 1983; Tabas & Krieger 1990; Krieger, 1998).

El colesterol esterificado y los triacilglicéridos, de nueva síntesis, también son depositados en las inclusiones lipídicas citoplasmáticas (Kellner-Weibel *et al.*, 2001). Estas inclusiones son metabólicamente activas, ya que los lípidos que contienen se

están reciclando constantemente, a través de la hidrólisis y la re-síntesis (Brown & Goldstein, 1980).

Por otra parte, se ha comprobado que el colesterol esterificado se captura preferentemente en inclusiones ya existentes, en lugar de formar partículas nuevas de lípidos (Kellner-Weibel *et al.*, 2001). Por lo tanto, estas inclusiones son importantes para la homeostasis del colesterol celular que también implica el colesterol esterificado. Además, la esterificación del colesterol por la acil-coenzima A colesterol acil transferasa (ACAT), tiene un papel de protección hacia la célula, porque es una enzima de unión a membrana citoplasmática que utiliza el colesterol y ácidos grasos-CoA de cadena larga, como sustrato para producir ésteres de colesterol (Chang *et al.*, 1997), esto se debe a que los ésteres son menos citotóxicos que el colesterol libre (Tabas, 2002).

I.1.2.6 Formación de ateromas

Alto niveles de LDL y especies reactivas de oxígeno, son los factores de riesgo aterogénico, ya que la unión de estos produce LDL oxidadas (LDL-ox). Las LDL-ox migran a la capa íntima de las arterias de pequeño calibre, en donde son captadas por los macrófagos y se acumulan de forma masiva en su citoplasma, esta acumulación cambia la forma de los macrófagos, por lo que se les llama células espumosas. Las células espumosas y los linfocitos T, se acumulan en la capa íntima de las arterias y activan la liberación de citosinas y factores de crecimiento, que estimulan la proliferación de músculo liso y la acumulación de componentes de tejido conjuntivo generando una gruesa capa fibrosa de tejido conjuntivo sobre un núcleo rico en lípidos, cuya estructura constituye la placa ateromatosa (Dvorkin *et al.*, 2010).

Con base en los efectos descritos previamente que originan las ERO's y las dislipidemias, se siguen pautas para disminuir el riesgo aterogénico, a través del cambio de hábitos alimenticios (dieta vegetariana) y con tratamientos farmacológicos hipolipemiantes.

I.4 Tratamientos farmacológicos hipolipemiantes

En general, valores por arriba de 200 mg/dL de colesterol total en circulación, se consideran un alto riesgo aterogénico, por lo tanto, éste deberá considerarse para la terapia con agentes hipolipemiantes (Report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, 1988).

Los fármacos hipolipemiantes más utilizados son: Estatinas, resinas, ácido nicotínico, fibratos y ezetimbe (Cuadro 2) (Pallardo, 2010).

Cuadro 2. Mecanismo de acción de fármacos hipolipemiantes

Fármacos	Mecanismos de acción
Inhibidores de la HMG-CoA reductasas (Estatinas)	Inhiben la síntesis del colesterol y aumentan los receptores hepáticos para las LDL
Resinas	Secuestran las sales biliares impidiendo la circulación enterohepática del colesterol. Aumentan los receptores de las LDL
Ácido nicotínico	Inhibe la secreción de las VLDL
Fibratos	Estimulan a los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARα). Inhiben la lipólisis. Inhiben la secreción de las VLDL
Ezetimbe	Inhiben la absorción intestinal del colesterol

(Pallardo, 2010)

En el cuadro 3 se especifican los principales tipos y dosis de fármacos hipolipemiantes, la modificación que provocan en las lipoproteínas y los efectos secundarios que ocasionan.

Cuadro 3. Mecanismo de acción de fármacos hipolipemiantes

Clase	Fármaco (dosis/día)	Modificación lípidos	Efectos secundarios	Contraindicaciones
Estatinas	*Lovastatina (10-80mg)			
	*Pravastatina (10-40 mg)			
	*Simvastatina (10-80 mg)	LDL:↓18-60%	Miopatía	Hepatopatía activa o crónica
	*Fluvastatina (20-80 mg)	HDL:↑5-15%	Aumento sérico de las enzimas hepáticas	
	*Atorvastatina (10-80 mg)	TG:↓7-37%		
	*Rovastatina (5-40 mg)			
Resinas	*Colestina (8-24 g)	LDL:↓15-30%	Flushing	Hepatopatía crónica Gota Diabetes ulcera péptica
	*Colestipol (10-30 g)	HDL:↑15-25%	Hiperglucemia Hiperuricemia Hepatotoxicidad	
Fibratos	Gemfibrozol (1.2g)	LDL:↓5-20%	Dispepsia	Nefropatía y/o hepatopatía grave
	Fenofibrato (145 mg)	HDL:↑10-20%	Miopatía Litiasis biliar	
Ezetimibe	Ezetimibe (10 mg)	LDL:↓18-20%	No definidos	Hepatopatía activa o crónica

(Pallardo, 2010)

Además de los fármacos referidos, con un efecto limitado o parcial, ocasionalmente se han empleado; ácidos grasos ω -3 (reducción de síntesis de triacilglicéridos y VLDL) y estanoles (disminución de la absorción intestinal del colesterol) (Pallardo, 2010). Sin embargo, los elevados costos de tratamientos farmacológicos han motivado a la población necesitada a recurrir a tratamientos alternativos como el uso de remedios herbolarios.

I.5 Tratamientos hipolipemiantes alternativos

Las primeras fuentes históricas de las esencias contenidas en plantas aromáticas y medicinales surgen de Egipto, donde se relata que desde el siglo 40 a. C., ya se preparaban de cedro. Los egipcios instruyeron en estas prácticas a los griegos, que a su vez las transmitieron a los romanos. En la Edad Media, los árabes perfeccionaron la destilación de las plantas aromáticas favoreciendo así el desarrollo de la naciente y rudimentaria farmacia. En el siglo XIII, los alquimistas vendían aceites esenciales, siendo uno de los más cotizados el de romero. En el siglo XV eran conocidas las esencias de almendras amargas, espliego, canela, ginebra, rosa, salvia y lavanda, entre otras, y un siglo después, más de sesenta se añadían a estas, pero en el siglo XVII prácticamente estaban aisladas. En el siglo XIX, se practicaron los primeros análisis químicos de esencias y otros principios activos de los vegetales. Con la aplicación del microscopio y la química analítica, nació la farmacoquímica. En 1811 se aisló la morfina del opio y se desarrolló un movimiento de investigación, a escala mundial, para conocer la composición química de los vegetales e inició la base de la industria farmacéutica, de perfumería y condimentaría actual (García-Nieto, 2000). En la actualidad, cerca del 8% de la población mundial depende de medicina alternativa basada en plantas. Con excepción de la homeopatía, las propiedades de las plantas curativas se evalúan por sus compuestos químicos. Se estima que cerca de 70,000 plantas, incluyendo árboles, se usan en la medicina.

La medicina Ayurveda o medicina tradicional de la India, utiliza cerca de 200 plantas para sanar diferentes padecimientos. La medicina tradicional china utiliza 5757 plantas que se encuentran enlistadas en la Enciclopedia de Medicina Tradicional China (Daniel, 2006). En México, de las 22,000 especies de plantas que existen, se estima que más de 500 tienen usos medicinales (Lozoya, 1994; Aguilar, 1999).

En la medicina herbal, el término de hierbas se usa de tal manera que no se refiere únicamente a las plantas herbáceas, sino también a la corteza, raíces, hojas, semillas, flores, frutos, arbustos, enredaderas y extractos de los mismos; que son apreciados por sus cualidades como; sabor, aroma o curativas. En el caso de la

botánica, el término se refiere a las plantas productoras de semillas no leñosas con tallos que se caen al final de la temporada de cultivo (Craig, 1999).

Acerca de este tipo de terapia alternativa se han realizado algunas investigaciones, en donde se ha sugerido el uso regular del ajo, puede ser eficaz para reducir el riesgo de ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares, debido a que disminuye totalmente las concentraciones de las LDL y triacilglicéridos, sin afectar la concentración de las HDL (Kleijnen *et al.*, 1989; Warshafsky *et al.*, 1993). También, el limoncillo (*Cymbopogon citratus*) (140 mg/dL), que es rico en geraniol y citral; provoca un descenso en las concentraciones de LDL después del consumirlo por 3 meses (Elson *et al.*, 1989). Se ha demostrado que las semillas en polvo de alholva (*Trigonella foenum-graecum*), también pueden tener actividad hipocolesterolemica, esto probado en sujetos que padecían de concentraciones elevadas de LDL en la sangre, experimentaron una reducción significativa de estas y de los triacilglicéridos, sin ningún cambio en la concentración de las HDL después de consumir 100 g de este por 20 días (Sharma & Raghuram, 1990; Sharma *et al.*, 1991). Los compuestos responsables de estos efectos son derivados de flavonoides (con grupos hidroxilo y fenólicos), y las excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Havsteen, 1983; Peres, 1994).

I.5.1 Compuestos fenólicos y flavonoides

Los compuestos fenólicos o polifenoles, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas de 8,000 compuestos distintos, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y diferentes actividades biológicas. La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales, varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuestos que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular (Martínez- Valverde *et al.*, 2000). Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes

protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados como mecanismos de defensa (Butler, 1992; Balasundram *et al.*, 2006; Ferreres *et al.* 2008).

Los flavonoides, son un grupo de polifenoles de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos: dos anillos de benceno unidos a través de un anillo pirona o pirán heterocíclico (Martínez- Valverde *et al.*, 2000) (Figura 8).

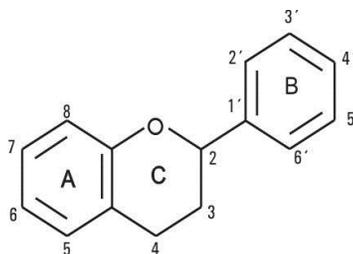


Figura 8. Estructura general de los flavonoides.

Los flavonoides funcionan como pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo de los daños que producen los agentes oxidantes, como los rayos UV, la contaminación ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos, entre otros. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas y verduras. Representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Aherne & O'Brien, 2002). Se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes (especialmente las angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas; y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas flavonoides), como glicósidos (la mayoría de las veces), como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros. Cuando se consumen, una fracción se elimina por la orina y la mayoría por la bilis (Donovan *et al.*, 2006). Sus efectos citoprotectores, son conocidos en fibroblastos, en queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales, cultivados en presencia de sulfoxina-butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa (Merck, S.A., 2000). Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para evitar la peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos

o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro (Laughton *et al.*, 1989; Ursini *et al.*, 1994). Existen numerosos estudios donde se reportan los efectos de los flavonoides, que determinan la estabilidad de los ácidos grasos, lípidos, aceites y lipoproteínas de baja densidad, frente a la oxidación *in vitro* (Hirano *et al.*, 2001; Terao *et al.*, 2001). Se ha reportado que las catequinas, derivadas del té verde y negro, tienen actividad hipocolesterolemia, antiaterogénico, antiobesidad y antioxidante (Ito *et al.*, 1983).

I.6 Compuestos antioxidantes

Se define como agente antioxidante a cualquier sustancia que, cuando está presente a dosis bajas en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato, incluyéndose en éste a todas las moléculas orgánicas e inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA. Estos pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas y DNA; pueden quelar iones metálicos de transición, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , y depuran los radicales libres. Debido a este hecho, se han descrito los efectos protectores en patologías tales como; diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones vírales, úlcera (estomacal y duodenal) e inflamaciones (Saskia *et al.*, 1998). También tienen actividades antivirales y antialérgicas (Gryglewski *et al.*, 1987).

Las ERO's se controlan por un sistema enzimático de defensa antioxidante compuesto por 4 enzimas: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa.

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides (Bors *et al.* 1990), son:

- Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4- oxo del anillo C (Rice-Evans, 1996; Cody *et al.*, 1998).

-
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C, necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

Los flavonoides eliminan las ERO's por estos mecanismos y de esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células (Martínez- Flores *et al.*, 2002). Entre las especies vegetales, de las que se ha mencionado actividad antioxidante, se encuentra el Neem.

I.7 Neem

El Neem (*Azadirachta indica*) se conoce desde hace más de 2000 años como una de las plantas medicinales más versátiles, teniendo un amplio espectro de actividad biológica (Biswas *et al.*, 2002). Es un árbol tropical siempre verde (Figura 9), de la familia Meliaceae y de la subfamilia Meloideae (Girish *et al.*, 2008).



Figura 9. Neem (*A. indica*). a) Árbol de Neem. b) Flores. c) Frutos (URL 3, URL 4, URL 5)

El árbol de Neem es nativo de la zona Este de la India y Burma, crece al Sureste de Asia y Oeste de África; algunos árboles recientemente se plantaron en el Caribe, muchos países de Centroamérica y México. El árbol de neem se introdujo a México por Baja California Sur en 1989, por un grupo de productores privados dedicados a la horticultura orgánica en San José del Cabo (Osuna, 2000; Leos & Salazar, 2002). En 1992 se introdujo al Valle Yaqui, Sonora (Moreno 1996). A partir de 1994, los árboles se plantaron en otros estados, como; Baja California Sur, Sinaloa, Sonora, Nayarit, Colima, Campeche, San Luis Potosí, Guerrero, Quintana Roo, Yucatán, Nuevo León, Veracruz, Oaxaca, Morelos, Chiapas, Guanajuato, Tabasco, Tamaulipas y Durango, dentro de los más importantes (Cruz, 1998; INIFAP, 1999).

Desde la antigüedad, todas las partes del árbol de Neem se han utilizado para la elaboración de remedios caseros contra diversos padecimientos (Chopra, 1956; Chatterjee & Pakrashi, 1994), tanto las hojas, el fruto y la corteza. El aceite de Neem y el extracto de corteza y hojas (Thakur *et al.*, 1981), se utilizan como terapéuticos para padecimientos como la lepra, helmintiasis intestinal, desordenes respiratorios, constipación, así como del mejoramiento de la salud en general (Basu *et al.*, 1931). El aceite de Neem también presenta varios usos en infecciones de la piel (Chopra, 1956). La corteza, las hojas, la raíz, las flores y el fruto, al mezclarse curan la morbilidad sanguínea, afecciones biliares, prurito, úlceras en piel y ardor (Mitra *et al.*, 1963). Entre otras propiedades conferidas al árbol de Neem, se encuentra su capacidad como antiséptico, cicatrizante y contra enfermedades de la piel (Kirtikar & Basu, 1931; Biswas *et al.*, 2002). También se ha revelado que la parte soluble en agua del extracto alcohólico de las hojas, posee importantes propiedades antiinflamatorias, antiserotonina, anticonceptivas y actividad hepatoprotectora (Chattopadhyay *et al.*, 1986, 1987a, 1992, 1993), actividad hipolipidémica en ratas alimentadas con dieta aterogénica, antihiperlipidémica así como actividad hipotensora (Chattopadhyay *et al.*, 1987b; Chattopadhyay, 1995, 1997).

I.7.1 Toxicidad del Neem (*A. indica*)

Entre los usos y aplicaciones de los extractos de Neem está su empleo como pesticida e insecticida, debido a las restricciones que existen por los químicos sintéticos que han sido identificados como altamente tóxicos o peligrosos, y por su alto espectro, ya que se sabe puede usarse como larvicida, acaricida y nematocida. Se ha observado que los extractos etanólicos de las semillas de Neem, protegen de plagas a los granos, durante el almacenamiento (Dunkel *et al.*, 1995). El aceite de las semillas y las fracciones volátiles, tienen efectos adversos en el ciclo gonadotrófico y la ovoposición de las hembras de *Anopheles stephensi* y *Anopheles culicifacies*, afectando la vitelogénesis (Dhar *et al.*, 1996). También se ha demostrado toxicidad oral de extracto metanólico de hojas de Neem en ratones (Kanungo, 1996), se identificaron signos de enfermedad y malestar, espasmos gastrointestinales, apatía, hipotermia y convulsiones terminales, lo que llevó a la muerte de estos. La

administración intravenosa del extracto acuoso de hoja, a una dosis superior de 40 mg / kg de peso corporal, provocó manifestaciones tóxicas y muerte en conejillos de indias (Kanungo, 1996). Dosis sucesivas de 500 a 200 mg /kg de peso corporal, disminuyeron la frecuencia cardiaca y la hipertensión arterial en conejillos de indias (Jacobson, 1995). Las gallinas Hisex Brown, alimentadas con una dieta que contenía 2% y 5% de hojas de Neem, desarrollaron hepatonefritis a partir del día 7 al 35 después de su nacimiento y una alteración significativa en los parámetros sanguíneos (Ibrahim *et al.*, 1992).

Extractos crudos de Neem causaron genotoxicidad en células germinales de ratones machos, al administrárseles dosis de 0.5-2 g/kg de peso corporal durante 6 semanas. En estos se observaron algunos cambios estructurales en los cromosomas meióticos, junto con roturas cromosómicas y la relación anormal de genes que controlan la forma de los espermatozoides (Awasthy, 2001). También se ha demostrado que la administración por vía oral del extracto acuoso de las hojas, genera un efecto anticonceptivo en ratones (Despande *et al.*, 1980; Kanungo, 1996).

La administración de extractos acuosos de las hojas de Neem en ratas albinas, durante 48 días, causó disminución en la cantidad, motilidad y en la velocidad de los espermatozoides, probablemente debido a la deficiencia de andrógenos (Aladakatti *et al.*, 2001). La administración oral de 20-60 mg de polvo seco de la hoja a ratas, durante 24 días, provocó disminución en el peso de la vesícula seminal y próstata y cambios reversibles histológicos a través de su propiedad antiandrogénica (Kasutri *et al.*, 1997).

I.8 ANTECEDENTES

En textos aryuvedas que datan de 1500 A.C., se menciona el uso del Neem como tratamiento contra la malaria (Wilcox *et al.*, 2004). En 1900 comenzaron a adoptar su uso las colonias británicas en la India, como una alternativa de sustitución de la quinina y en 1920, lo comenzaron a utilizar para suprimir cuadros continuos de fiebres en países asiáticos (Crevost & Pételot, 1929). Actualmente, la mayoría de las investigaciones realizadas sobre el Neem, se enfocan a sus propiedades como bioinsecticida, también se han realizado estudios sobre sus efectos en la malaria, por lo que en África se introdujo la utilización de Neem a la medicina local en forma de extracto acuoso.

La investigación química sobre los productos del árbol de Neem, se emprendió a mitad del Siglo XX, con el aislamiento del nimbidin, primer componente aislado del aceite de Neem (Siddiqui, 1942). Actualmente, más de 135 componentes han sido aislados de diferentes partes del árbol y muchas revisiones también han sido publicadas sobre la química y la diversa estructura de estos compuestos (Koul *et al.*, 1990; Chatterjee *et al.*, 1994). Se ha demostrado que porciones solubles del extracto alcohólico de hojas de Neem, tienen actividad antiinflamatoria, antiserotonina, anticonceptiva y hepatoprotectora (Chattopadhyay *et al.*, 1986, 1987a; 1993, 1992), así como actividad hipolipidémica, hipoglicemiante e hipotensiva, en ratas inducidas a padecer diabetes con estreptozotocina. Los resultados reflejaron cambios en su perfil lipídico. Sin embargo, aunque se demostró que podría disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, asociado a la hiperglicemia, no se reportó el mecanismo por el cual se llevaba a cabo esta propiedad. También se reveló, por análisis químicos, la existencia de flavonoides en estos extractos que podrían estar relacionados con las actividades antes mencionadas (Chattopadhyay, 2004).

I.9 HIPOTESIS

Los extractos de Neem (*Azadirachta indica*) tienen efecto antioxidante y afectan el metabolismo de lípidos, entonces podrían disminuir el estrés oxidativo y provocar un efecto hipolipidémico para prevenir enfermedades cardiovasculares.

I.10 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, se ha reportado un aumento de defunciones por problemas de hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes y obesidad, en la población mundial que se encuentra sometida a factores como; stress, sedentarismo, consumo de alimentos con excesivo contenido de grasas y carbohidratos (comida rápida), tabaquismo y alcoholismo, entre otros, considerándose un problema de salud pública a nivel mundial, con el consecuente impacto socioeconómico que esto provoca. Los medicamentos para prevenir o controlar estos problemas son poco accesibles para la población que no cuenta con algún tipo de seguridad social, por lo que recurren a remedios herbales. Para la utilización de los fármacos existen protocolos a seguir, sin embargo; no existen pautas previamente establecidas sobre la dosis y el tiempo de consumo de los remedios herbales, ya que al igual que los medicamentos, el uso prolongado e indiscriminado de estos, también podría causar daños a la salud por los efectos secundarios. Además, se ignora las dosis necesarias o recomendadas según el grado o magnitud del problema de salud que se desea aliviar, así como, contraposiciones de estos ante algún medicamento o alimento que se encuentren consumiendo simultáneamente. Con base en esto, en este trabajo se determinó el efecto antioxidante e hipolipidémico del Neem, estableciendo las condiciones, dosis y tiempo de consumo recomendables.

I.11 OBJETIVOS

I.11.1 Objetivo General

- Determinar el efecto antioxidante e hipolipemiante de extractos de hojas de Neem (*A. indica*).

I.11.2 Objetivos Específicos

- Determinar el análisis químico proximal de las hojas de Neem (humedad, cenizas, proteína cruda, lípidos y carbohidratos totales).
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de las hojas de diferentes períodos y en extracto acuoso y etanólico.
- Caracterización de la composición de carbohidratos, compuestos fenólicos totales y flavonoides, presentes en los extractos de las hojas de Neem.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos acuosos y etanólico.
- Determinar el efecto de los extractos, acuoso y etanólico sobre la producción de colesterol y triacilglicéridos en las líneas celulares Hep G2.
- Determinar el efecto que tienen los extractos, acuoso y etanólico sobre la diferenciación de fibroblastos 3T3L1 a adipocitos.

II METODOLOGÍA

II.1 Material biológico

Hojas de Neem (*A. indica*) colectadas en los períodos de floración y fructificación (Abril-Junio de 2010) de árboles de 5 años, cultivados por el laboratorio de fitopatología del Departamento de interacciones planta-insecto en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, en el municipio de Yautepec, Morelos. Su localización geográfica; 18° 53´ de latitud norte y 99° 04´ de longitud este, con una altura a nivel del mar de 1,210 m. La temperatura media es de 22.7 °C, el tipo de clima es cálido sub-húmedo con lluvias en verano, con precipitación pluvial anual de 945.7 milímetros. Constituida principalmente por selva baja caducifolia, de clima cálido.

A continuación se presenta el esquema general del trabajo (Figura 10).

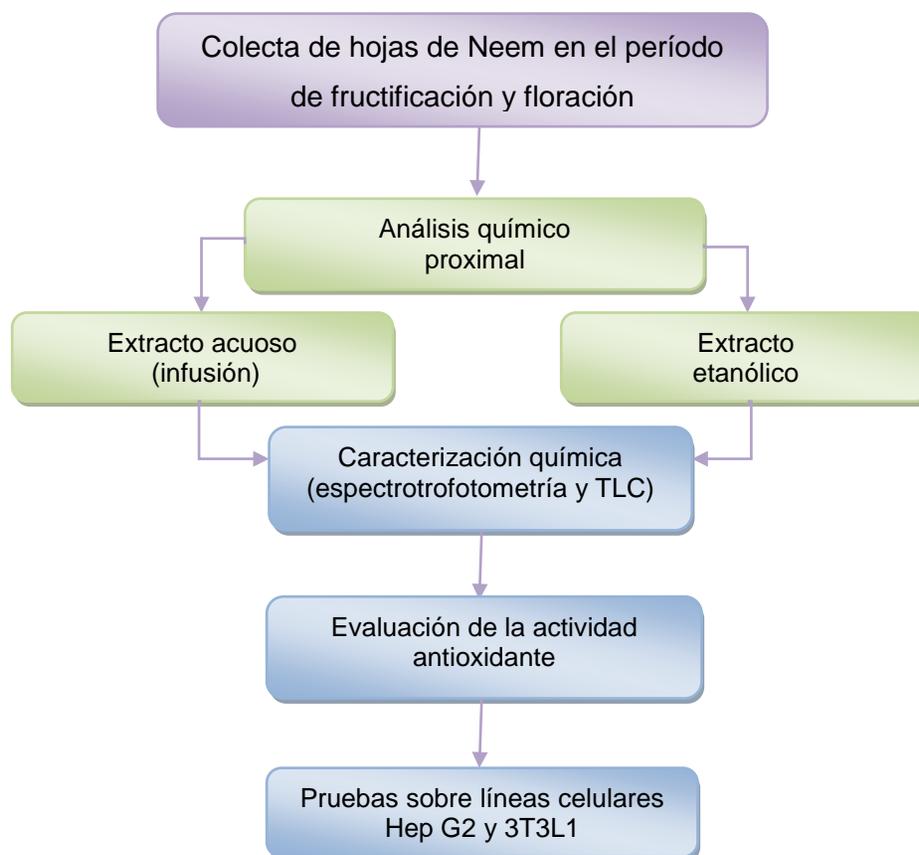


Figura 10. Esquema General de Trabajo

II.2.1 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal tiene como finalidad determinar los macronutrientes contenidos en las hojas de Neem, como son; minerales, lípidos, carbohidratos, fibra y proteínas. La humedad se determinó para poder correlacionarla con los resultados y realizar el reporte en peso húmedo y seco.

II.2.1.1 Determinación de la Humedad

Determinación gravimétrica, mediante secado de la muestra a 60 °C hasta registrar un peso constante (AOAC, 2005).

II.2.1.2 Determinación de cenizas por incineración

Es el método más común para cuantificar la totalidad de minerales en muestras biológicas y se basa en la descomposición de la materia orgánica, quedando solamente materia inorgánica en la muestra. Es eficiente ya que determina tanto cenizas solubles en agua e insolubles y solubles en medio ácido. Las muestras se calientan a temperaturas entre 500 y 600 °C, lo que provoca la ebullición, digestión, oxidación o calcinación del material, quedando al final solo la materia inorgánica (Nollet, 1996).

II.2.1.2.1 Procedimiento

Se colocaron los crisoles de porcelana en la estufa por 24 h, con el fin de eliminar humedad, posteriormente se registró el peso de estos, vacíos y con la muestra. La muestra se calcinó en mechero hasta que la muestra presentó una coloración blanquecina y no se observó la presencia de humo. Después, se introdujeron a la mufla a 500°C/4 h, de donde se depositaron en una estufa por 8 h, para después colocarlos en un desecador y pesar. El contenido de cenizas se obtuvo de la diferencia entre el peso del crisol con la muestra incinerada menos el peso del crisol sin muestra, ambos a peso constante.

II.2.1.3 Determinación de Materia grasa

Esta técnica se basa en una extracción semicontinúa empleando un disolvente orgánico no polar (éter de petróleo). En este método el disolvente, contenido en un matraz receptor, se calienta, se volatiliza y se condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente en el recipiente de sifón del equipo. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso (Nielsen, 2003).

II.2.1.3.1 Procedimiento

Para la determinación del contenido de grasa de las hojas de Neem se colocaron 20 g de hojas trituradas en cartuchos de papel filtro a peso constante, mismos que se depositaron en el interior del recipiente de sifón del equipo Soxhlet. Y se adicionaron aproximadamente 200 mL de éter de petróleo con punto de fusión de 67 °C, enseguida se conectó el matraz receptor al recipiente de sifón y este último al refrigerante a través de la unión esmerilada. El equipo Soxhlet se colocó en una parrilla a ebullición (60 °C) y en reflujo constante de 3 h aproximadamente. Terminado el tiempo de reflujo se sacaron los cartuchos de papel filtro y se colocaron en la campana de extracción hasta la completa evaporación del disolvente. Finalmente el cartucho de papel filtro se colocó en la estufa hasta que se obtuvo un peso constante del cartucho.

II.2.1.4 Determinación de proteínas por micro-Kjeldahl

Este método determina la materia nitrogenada total (Aurand *et al.*, 1987). Se basa en la determinación de la cantidad de nitrógeno orgánico contenido en productos orgánicos, en dos pasos consecutivos:

- a) La descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado.
- b) El registro de la cantidad de amoníaco obtenida de la muestra.

El método de Kjeldahl consta de las siguientes etapas:



En la etapa siguiente, mediante la acción de una base fuerte, generalmente hidróxido de sodio al 40%, se libera el amoníaco del sulfato de amonio. Cuando la valoración se va a efectuar por retroceso, el amoníaco liberado se arrastra con vapor y se recoge sobre un volumen exactamente medido de ácido bórico al 4%, de tal manera que se forma borato de amonio, el cual se titula directamente (Pearson, 1993). Para determinar el contenido de proteína cruda se multiplica por el factor de conversión de 6.25 para obtener el valor en g.

II.2.1.4.1 Procedimiento

Se pesaron 0.04 g de hojas trituradas y se añadieron a matraces de digestión micro-Kjeldahl con capacidad de 125 ml. La digestión se realizó con 10 mL de ácido sulfúrico concentrado y 0.5 g de catalizador. Se detuvo la digestión cuando la muestra se observó verde cristalina. Después se realizó la neutralización añadiendo a la muestra digerida 10 mL de NaOH 0.1N. Para la digestión se añaden al matraz receptor del destilado 10 mL de ácido bórico. Se detuvo la digestión cuando se recuperaron 25 mL de muestra que se tituló con 0.1 HCl. Se registró el volumen de HCl utilizado en la titulación. Para conocer el contenido de proteína en la muestra se la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{(V \times N \times meqN)}{\text{Peso de la muestra}(g)} \times 100$$

$$\% \text{ Proteína cruda} = \% \text{ de Nitrógeno} \times \text{Factor de conversión}$$

Dónde:

V= Volumen de HCl gastado hasta el vire

N= Normalidad del Ácido clorhídrico utilizado

meqN= Miliequivalentes del nitrógeno (0.014)

Factor de conversión=6.25

II.2.1.5 Determinación de Carbohidratos totales

La determinación de carbohidratos totales por el método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), consiste en la lectura espectrofotométrica a 490 nm de los

productos de formación de la reacción del fenol con los carbohidratos en presencia del ácido sulfúrico, que son el hidroximetilfurfural o el furfural (Figura 11).

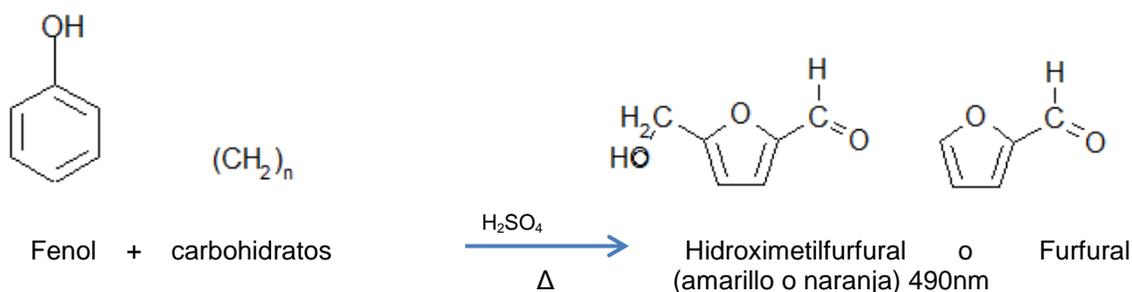


Figura 11. Reacción de formación de hidroxifurfural o furfural para identificación de carbohidratos. Se indica la reacción del fenol con los carbohidratos en presencia de ácido sulfúrico, para obtener los productos de reacción hidroxifurfural o furfural, que se leen a 490 nm.

II.2.1.5.1 Procedimiento

Se pesaron 0.1 g de polvo de hojas y se homogenizó con 5 mL de etanol al 50% con un agitador vortex y se centrifugó a 5,000 g por 10 min, separando el sobrenadante, este procedimiento se realizó tres veces, colocando los tres sobrenadantes en un solo recipiente (Muzquiz *et al.*, 1992). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1 mL de los sobrenadantes y se les añadió 0.5 mL de fenol 5 % y 2.5 mL de H_2SO_4 concentrado. La curva de calibración se realizó con 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L de glucosa.

II.2.2 Determinación de metabolitos secundarios de interés

II.2.2.1 Determinación de Compuestos fenólicos

El procedimiento para determinar compuestos fenólicos consiste en el método de Folin-Ciocalteu, donde la concentración de polifenoles se detecta mediante la formación de sales de tungsteno y molibdeno, reducidas por oxidación de los fenoles, originando óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul. La intensidad de la coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos y posee una absorción máxima a 765 nm.

II.2.2.1.1 Procedimiento

Se pesaron 5 mg de hojas o extracto etanólico liofilizado y se disolvieron en 10 mL de etanol-agua (1:10 v/v). Se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. Se tomaron 20 μL de muestra y se le adicionaron 1580 μL de agua destilada y 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido con agua (1:2 v/v). Posteriormente, se le adicionaron 300 μL de Na_2CO_3 al 10% y se dejaron reposar por 2 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Las muestras se leyeron a 760 nm. Los resultados se expresaron en mg equivalente de ácido gálico por g de muestra. La curva de calibración se realizó con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL de ácido gálico.

II.2.2.2 Determinación de Flavonoides

Los flavonoides reaccionan con sales de aluminio y se produce un complejo colorido cuando se une al grupo 4 ceto del fenol del flavonoide (absorbe a 510 nm) (Figura 12).

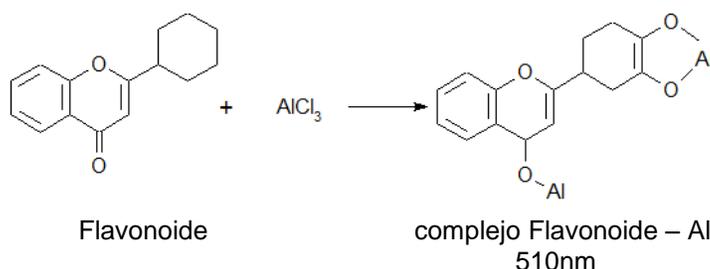


Figura 12. Reacción de flavonoides con AlCl_3 . Se forma un compuesto colorido que absorbe a 510 nm.

II.2.2.2.1 Procedimiento

Se pesaron 5 mg de hojas o extracto etanólico liofilizado y se disolvieron en 10 mL de etanol-agua (1:10). Se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. La determinación se realizó de acuerdo al método del AlCl_3 (Zhishen *et al.*, 1999). Se tomaron 100 μL de muestra y se le adicionaron 2000 μL de agua destilada y 150 μL de reactivo de NaNO_2 al 15%. Después de 6 minutos, se adicionaron 150 μL de AlCl_3 al 10%, luego de otros 6 minutos se le añadieron 2000 μL de NaOH 4% y 600 μL de agua destilada. Se incubaron 15 min temperatura ambiente se leyó a 760 nm. Los

resultados se expresaron como mg equivalentes de (+)-catequina por g de muestra. La curva de calibración se preparó con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL de (+)-catequina.

II.2.3 Obtención de extractos de las hojas del Neem

II.2.3.1 Extracto acuoso (infusión)

A partir de los resultados obtenidos del contenido de compuestos fenólicos, se determinó trabajar con las infusiones y extractos de las hojas recolectadas en el período de floración. De las recetas populares que se recomiendan para los extractos acuosos de Neem, se seleccionaron aquellas preparadas a partir de 1 hoja de Neem en 1 L de agua caliente. Para poder determinar la concentración real agregada, se pesaron las hojas de Neem obtenidas durante la floración, observándose un peso promedio de 50 mg,

El extracto acuoso se preparó en un frasco ámbar de 15mL que contenía 0.5 mg de hojas y se le añadieron 10 mL de agua destilada a punto de ebullición. Se cerró el frasco con tapón de plástico y se dejó reposando en un lugar fresco, seco y alejado de la luz.

II.2.3.2 Extracto etanólico

La obtención del extracto etanólico fue realizado de acuerdo a Chattopadyay, 2004. Se preparó un macerado de hojas en etanol al 70% (1:12.5 p/v). El extracto se filtró en una columna empacada con fibra de vidrio para eliminar restos de hojas y el filtrado se evaporó a sequedad en el rotavapor a 40°C. Los residuos del extracto se recuperaron en frascos de vidrio color ámbar y se liofilizaron. Se almacenaron en un lugar fresco y seco, alejados de la luz.

II.2.4 Caracterización del contenido de carbohidratos, fenólicos y flavonoides de las hojas de Neem y de los extractos acuoso y etanólico por cromatografía en placa fina

Para caracterizar los compuestos presentes en las hojas de Neem, se realizó una extracción de 24 h a T ambiente, con diferentes disolventes (1:10 p/v), un disolvente por día para conocer los compuestos que podrían estar presentes en las hojas por un acarreo de disolventes con diferente polaridad (Cuadro 4). Todos los extractos, con excepción del extracto acuoso, se concentraron con el rotavapor a 50°C y presiones de vacío entre 110-50 mmHg. El extracto acuoso se liofilizó.

Cuadro 4. Extracción con diferentes disolventes de las hojas de Neem. Se realizó la extracción durante 24 h con cada uno de los disolventes.

DIA	DISOLVENTE
1	Hexano
2	Cloroformo
3	Acetona
4	Acetato de Etilo
5	Etanol
6	Metanol
7	Agua destilada

El extracto acuoso, obtenido por infusión, también se liofilizó para facilitar la aplicación de este en las placas de sílica gel.

II.2.4.1 Desarrollo de la cromatografía en placa fina

Se usaron cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ de 5cm x 2.5 cm. Como fase móvil se utilizó; Tolueno:Acetato de Etilo:Ácido Fórmico (70:30:1 v/v). Se utilizaron reveladores específicos para identificar, carbohidratos, compuestos fenólicos y flavonoides (Cuadro 5 y Anexo 2).

Cuadro 5. Reveladores específicos para carbohidratos, fenólicos y flavonoides

REVELADOR	COMPUESTOS
p-anisaldehído-ácido sulfúrico	Carbohidratos
p-anisaldehído-ácido acético	Fenólicos
AlCl ₃	Flavonoides UV _{365nm}

(Wagner & Bladt, 2001)

II.2.4.3 Determinación del Factor de retención (Rf)

El factor de retención o Rf se define como la distancia recorrida por el compuesto de interés entre la distancia recorrida por la fase móvil.

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil}}$$

II.2.5 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos

Las técnicas para determinar la actividad antioxidante de los extractos acuosos y etanólico de las hojas de Neem, se realizaron con métodos ajustados para microplacas. Las concentraciones que se probaron para cada extracto fueron de: 100, 125, 250 y 500 µM equivalentes de ácido gálico. Las equivalencias de ácido gálico de cada extracto se obtuvieron a partir de la determinación de fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu, mencionado en el punto II.2.2.1.1. Las pruebas realizadas al extracto acuoso, se hicieron a diferentes tiempos de elaboración (24, 48 y 72 h). Como estándares de fenólicos se utilizaron: ácido gálico, catequina, vainillina y ácido cumárico. Todas las determinaciones se realizaron en ausencia de luz, por triplicado y se leyeron en un lector de microplacas con espectrofotómetro UV-Vis.

II.2.5.1 Método del DPPH

Se evaluó la capacidad que tienen los extractos acuosos y etanólico de Neem para neutralizar un radical por el método del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). El DPPH es un radical poco estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. En el ensayo, se determinó la concentración inicial de DPPH

(color azul-violeta) y la concentración resultante (amarillo pálido), una vez que se añadió el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en un cambio de coloración del DPPH, debida a la donación de electrones de la especie antioxidante (Figura 13) (Brand-Williams, 1995).

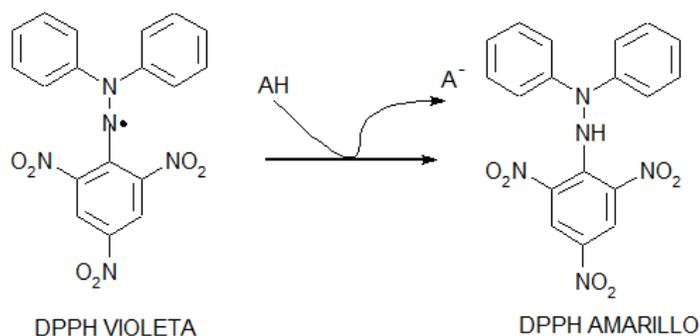


Figura 13 Reacción de captación del radical libre del DPPH por un antioxidante

II.2.5.1.1 Procedimiento

En una placa de 96 pozos, se añadió a cada pozo la concentración de prueba de cada extracto, ajustado a 50 μ L. Por último, se le añadieron 20 μ L de DPPH 125mM. Se registró la variación de absorbancia a 517 nm por intervalos de 5 minutos hasta alcanzar los 30 minutos. La actividad antioxidante de los extractos se reportó como % de Actividad antirradical con respecto al tiempo.

$$\% \text{ Actividad antirradical (\%ARA)} = \frac{1 - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia control}} \times 100$$

II.2.5.2 Método de quelación del ión Cobre

El pirocatecol violeta tiene afinidad por muchos iones como $\text{Mn}^{+2,+3}$, $\text{Fe}^{+2,+3}$, Co , $\text{Ni}^{+2,+3}$, Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} . En esta reacción se oxidan los grupos hidroxilo de los antioxidantes fenólicos a grupos quinonas, mientras que el complejo pirocatecol violeta- CuSO_4^{-2} se reduce a pirocatecol violeta- CuSO_4^- , produciendo una coloración amarillo-café que se lee a 632 nm.

II.2.5.2.1 Procedimiento

En una placa de 96 pozos, se añadió a cada pozo la concentración de prueba de cada extracto (ajustado a 50 μL), y se le añadieron 290 μL de regulador de Na-acetato 50 mM pH 6, 6 μL de pirocatecol violeta 4mM y 10 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1:1000). Las lecturas se realizaron inmediatamente a 632 nm. La actividad quelante del cobre, por los estándares y extractos, se reportó como % del complejo Cu-antioxidante (AO), a diferentes concentraciones de muestras y estándares.

II.2.5.3 Método de quelación del ión Hierro

La ferroxina es un agente con alta especificidad a los iones ferrosos (Fe^{2+}). El resultado de este complejo es un producto oxidado de coloración magenta que se lee a 562 nm (Decker & Welch, 1990). En presencia de antioxidantes, se forman complejos entre el ión ferroso (Fe^{2+}) y el antioxidante, disminuyendo la intensidad de la coloración.

II.2.5.3.1 Procedimiento

En una placa de 96 pozos, se añadió a cada pozo la concentración de prueba de cada extracto (ajustado a 50 μL), y se le añadieron 250 μL de regulador de Na-acetato 100 mM pH 4.9 y 30 μL de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1:1000). Después de 30 min a temperatura ambiente se añadieron 12.5 μL de ferroxina 40 mM. Las lecturas se realizaron inmediatamente a 562 nm. La actividad quelante del hierro sobre los estándares y los extractos, se reportó como % del complejo Fe-antioxidante (AO), a diferentes concentraciones de muestras y estándares.

II.2.5.4 Método para determinar el poder reductor

Este método se fundamenta en la reducción del anión Ferricianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ a ferrocianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$. Este anión reducido se combina con el catión Fe^{+3} y K^+ originando el ferrocianuro férrico $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, denominado azul de Prusia. Se

reporta como el aumento de la absorbancia a 700 nm, esto es igual a la reducción del complejo ferrocianuro férrico a su forma ferrosa (Chung *et al.*, 2002).

II.2.5.4.1 Procedimiento

En una placa de 96 pozos, se añadió a cada pozo la concentración de prueba de cada extracto (ajustado a 50 μ L), y se le añadieron 50 μ L de regulador de fosfatos 0.2 M pH 6.6 y 50 μ L de FeCNK al 1%. Se incubaron a 50 °C durante 20 min. Por último, se añadieron 50 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y 10 μ L de FeCl₃ al 0.1% y se incubaron a 50 °C durante 10 min. Posteriormente, se leyeron a 700 nm. El poder reductor se reportó como el aumento de la absorbancia que presentaron las muestras después de la última incubación.

II.2.6 Cultivo de las líneas celulares

II.2.6.1 Línea celular Hep G2

Se utilizó la línea celular Hep G2 (de hepatocarcinoma humano procedente de un adolescente caucásico de 15 años), libre de agentes virales hepatotropos, aptas para expresar gran variedad de funciones metabólicas específicas del hígado, como: el metabolismo hepático, la progresión del tumor, la endocrinología, apoptosis, secreción de proteínas y bioquímica de lípidos. Entre esta última función se encuentra el metabolismo del colesterol y de triacilglicéridos. Expresan niveles normales de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y metabolizan los quilomicrones, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Javitt, 1990).

II.2.6.1.1 Procedimiento

Las células se sembraron en botellas de cultivo GIBCO de 50 mL con medio DMEM completo con 10% de SFT, hasta 100% de confluencia. Para la propagación del cultivo, se eliminó el medio de cada botella y la monocapa de células se lavó 2 veces con 2 mL de regulador PBS estéril. Se le adicionó 1 mL de tripsina-EDTA al 0.001% y se dejó actuar sobre la monocapa celular 1 min a 37 °C. Las células se

desprendieron y se pasaron, con una pipeta, a un tubo Falcon de 20 mL que contenía medio DMEM completo. Se centrifugó a 1,000 x g por 5 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y finalmente se sembraron en cajas estériles de 60 x 15 mm con 21 cm² de área de cultivo con 4 mL DMEM con rojo de fenol como indicador de pH y con 10% FBS.

II.2.6.2 Diferenciación de fibroblastos 3T3L1 a adipocitos.

Se utilizó la línea celular de fibroblastos 3T3L1 de embriones de ratones Swiss. Es un modelo para diferenciación a adipocitos con agentes inductores: Metil isobutilxantina (MIX) (estimulante del AMPcíclico), dexametasona (corticoide) e insulina (permite la acumulación acelerada de lípidos) por un tratamiento durante 48 h. Tras este periodo de diferenciación, ya no se requiere la presencia de los inductores para el mantener el fenotipo del adipocito maduro (Moreno-Aliaga & Matsumura, 1999).

II.2.6.1 Procedimiento

Las células se sembraron en botellas de cultivo GIBCO de 50 mL con medio DMEM completo con 10% de SFT, hasta 100% de confluencia. Para la propagación del cultivo, se eliminó el medio de cada botella y la monocapa de células se lavó 2 veces con 2 mL de regulador PBS estéril. Se le adicionó 1 mL de tripsina-EDTA al 0.001% y se dejó actuar sobre la monocapa celular 1 min a 37 °C. Las células se desprendieron y se pasaron, con una pipeta, a un tubo Falcon de 20 mL que contenía medio DMEM completo. Se centrifugó a 1,000 x g por 5 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y finalmente se sembraron en cajas de 12 pozos, cada pozo con 85.4 x 127.6 mm, medio con alta glucosa en DMEM con rojo de fenol como indicador de pH y con 10% FBS. La diferenciación a adipocitos se realizó cuando los cultivos tenían una confluencia del 80%. Se incubaron las células durante 48 h con medio DMEM completo con insulina 80 µM (10 µL/mL de medio), MIX 100 mM y dexametasona 50µM (5 µL/mL de medio) a 37 °C en atmosfera con 5% de CO₂. Después de las 48 h, se realizó el cambio de medio, a DMEM completo con insulina 80 µM (10 µL/mL de medio) y se dejaron incubando otras 48 h más. Por

último, se realizó el cambios de medio cada 48 h con medio DMEM completo sin insulina.

II.2.7 Tratamiento de las líneas celulares con los diferentes extractos de Neem

Para observar alguna diferencia en los tratamientos, los extractos, acuoso y etanólico se ajustaron a la misma concentración. El tipo de disolvente de extracción (agua destilada y etanol al 70%) podría haber proporcionar diferentes compuestos fenólicos, debido a la solubilidad de estos con disolventes de diferente polaridad Las alícuotas de extracto acuoso y etanólico que se administraron a las células HepG2 y a los adipocitos (fibroblastos 3T3L1 diferenciados), fueron de 25, 50 y 100 μ L (con una equivalencia de 7.9, 15.8 y 31.6 μ g de ácido gálico respectivamente, de acuerdo a lo obtenido por el método de Folin-Ciocalteou). Previamente, los extractos se esterilizaron por filtración con filtros Millipore de nitrocelulosa de poro 0.22 μ m en portafiltros Swinnex 13, bajo condiciones de esterilidad.

En el caso de la línea HepG2, se realizó un muestreo de 200 μ L del medio celular al principio del experimento (día 0), cuando se acababan de sembrar las células con una confluencia del 30 %, con el fin de conocer si los compuestos contenidos en los extractos evitarían la adhesión y crecimiento celular. Posteriormente, se tomaron muestras de 200 μ L del sobrenadante cada 24 h, hasta que se observó una confluencia del 100 %, o se despegaron las células o cuando hubo muerte celular. A todas las muestras se les determinó el contenido de colesterol y de triacilglicéridos.

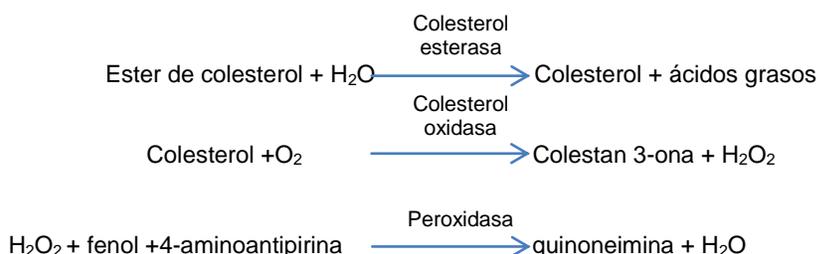
En el caso de los adipocitos (fibroblastos 3T3L1 diferenciados), se realizaron 2 tipos de pruebas. La primera prueba consistió en administrar los extractos cada 24 h, a partir de las 24 h posteriores a la siembra de los fibroblastos (con una confluencia inicial del 30 %) y continuando el tratamiento cada 24 h durante la diferenciación a adipocitos (con una confluencia del 80 %) hasta el día 8 de diferenciación. La segunda prueba consistió en hacer la administración de los extractos desde el día 0 de diferenciación hasta el día 8, cada 24 h. El muestreo se realizó recuperando los adipocitos, por tripsinización, en los días 2, 4, 6 y 8 de diferenciación. Para conocer

el tamaño y la forma de los adipocitos durante todos los días del tratamiento, se fotografiaron las células en el microscopio óptico invertido Carl Zeiss D1 a un aumento de 100x. Las células recuperadas por tripsinización se lisaron por congelación (-20 °C) y descongelación (37 °C), se centrifugaron a 3,500 x g por 15 min para eliminar los restos celulares. Posteriormente, se determinó en el sobrenadante el contenido de colesterol y triacilglicéridos.

II.2.8 Evaluación del efecto hipolipemiante

II.2.8.1 Determinación de colesterol (Método CHOD-PAP)

Este método consiste en determinar el contenido de colesterol por la formación de peróxido de hidrógeno obtenido de la hidrólisis enzimática de esteres de colesterol y la oxidación del colesterol. El peróxido de hidrógeno reacciona con el fenol y 4-aminoantipirina en presencia de peroxidasa formando quinoneimina de color rojo que se lee a 500 nm.



II.2.8.1.1 Procedimiento

Se determinó el colesterol de las muestras con el kit de reactivos enzimáticos marca RANDOX. En un tubo de ensayo se agregaron 700 μL de reactivo enzimático, se añadieron 75 μL del medio de cultivo de las células HepG2 y lo mismo para el sobrenadante del lisado de adipocitos. Se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia con espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm, utilizando como blanco 700 μL de reactivo enzimático, 75 μL de testigo negativo o agua.

II.2.8.1.2 Cálculo de concentración de colesterol

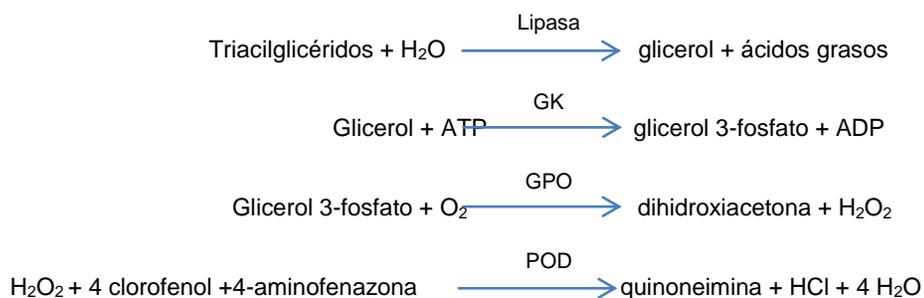
Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de colesterol} = \frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de colesterol calculado}} \times \text{Colesterol calculado (200 mg/dL)}$$

Se reportó la concentración mg de colesterol/dL.

II.2.8.2 Determinación de triacilglicéridos (Método GPO-PAP)

La determinación de los triacilglicéridos se basa en una serie de reacciones producidas por lipasas, glicerol cinasa y glicerol 3-fosfato oxidasa que forman peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona con el 4 clorofenol y la 4-aminoantipirina en presencia de peroxidasa formando quinoneimina de color rojo que se lee a 500 nm.



II.2.8.2.1 Procedimiento

Se determinaron los triacilglicéridos a las muestras con el kit de reactivos enzimáticos marca RANDOX. En un tubo de ensayo se agregaron 700 μL de reactivo enzimático, se añadirán 75 μL del sobrenadante del medio de cultivo de las células HepG2 y del lisado de adipocitos. Se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia con espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm, utilizando como blanco 700 μL de reactivo enzimático y 75 μL de testigo negativo o agua.

II.2.8.2.2 Cálculo de concentración de triacilglicéridos

Se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Concentración de TG} = \frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de triacilglicéridos calculado}} \times \text{Triacilglicéridos calculado (200 mg/dL)}$$

Se reportó la concentración mg de triacilglicéridos/dL

III RESULTADOS

III.1 Análisis químico proximal

El mayor contenido de grasa (52.27%), minerales (5.57 %) , proteínas (11.64%) y fibra (8.57%), se encontró en las hojas de Neem del período de floración en el mes de Abril de 2010, mientras que la mayor cantidad de carbohidratos (32.65%) se encontró en las hojas de Neem del período de fructificación en el mes de Junio de 2010. En los dos tipos de hojas, se encontró que el contenido de grasas fue el mayor componente que fue cercano al 50 % (Figura 14).

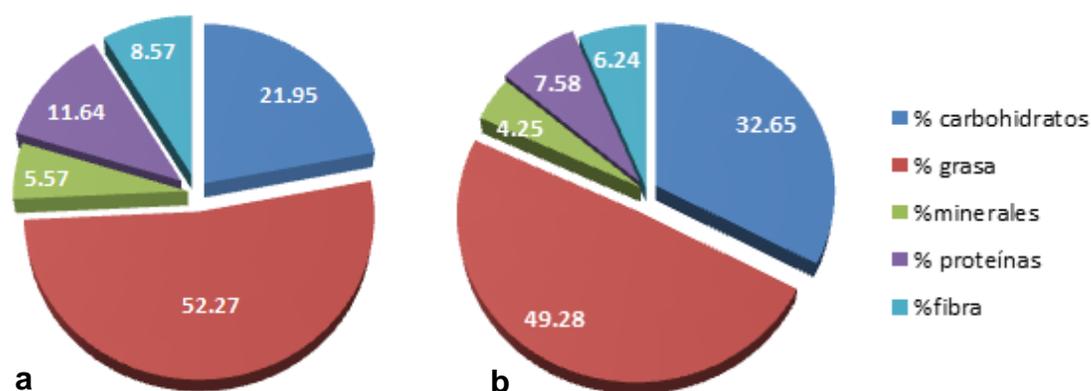


Figura 14. Macromoléculas presentes en hojas del Neem en los períodos de floración y fructificación. a) químico proximal en el período de floración. b) químico proximal en el período de fructificación.

III.2 Compuestos fenólicos totales en hojas del Neem.

El porcentaje de compuestos fenólicos totales en hojas de Neem, en el período de floración, fue de 0.08% y flavonoides de 0.04%, mientras que en las hojas del periodo de fructificación el porcentaje de compuestos fenólicos bajó a 0.04% y el de flavonoides a 0.01% (Figura 15).

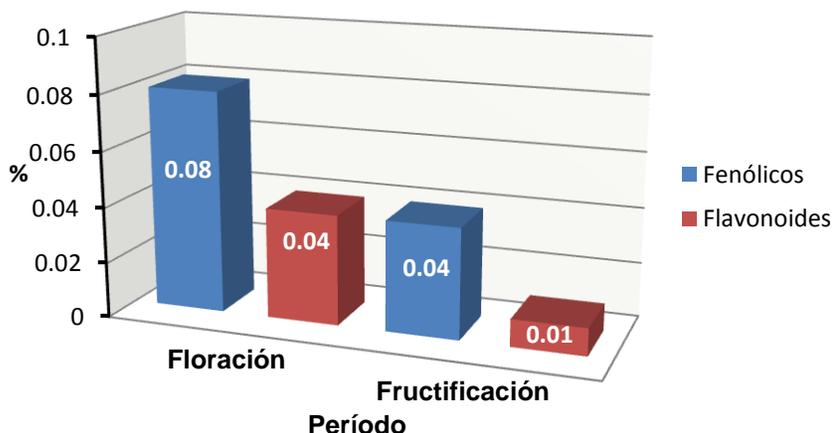


Figura 15. Compuestos fenólicos y flavonoides en hojas del Neem en los períodos de floración y fructificación. Las barras en azul representan el porcentaje de compuestos fenólicos y las barras rojas representan el porcentaje de flavonoides contenidos en las hojas.

A partir de estos resultados, se escogieron las hojas en el período de floración para obtener los extractos acuoso y etanólico, debido a que presentaron el mayor contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides.

III.3 Rendimiento de obtención de extracto etanólico

Se obtuvo en promedio 0.776 g de extracto etanólico a partir de 20 g de hojas, lo que representa el 3.88 %.

$$\frac{0.776\text{g de extracto}}{20\text{ g de hojas}} = \frac{0.0388\text{ g de extracto}}{\text{g de hojas}} = 3.88\%$$

El extracto etanólico obtenido de hojas de Neem de Yautepec, Morelos, en período de floración corresponde al 77 %, con respecto al reportado por Chattopadhyay (2004), en árboles de Calcuta en la India, que fue de 0.0502g de extracto/g de hojas.

III.4.1 Identificación de carbohidratos

III.4.1.1 Identificación de carbohidratos de los extractos de hojas del Neem obtenidos con los diferentes disolventes

En el cromatograma de las muestras de extractos obtenidos con los diferentes disolventes, cuando se revelaron con p-anisaldehído-ácido sulfúrico, se observó la presencia de carbohidratos de diferente polaridad como manchas de color azul. En el extracto con hexano (carril 1), se observaron 15 manchas relacionadas a carbohidratos, siendo esta la fracción con mayor cantidad de carbohidratos. En el caso de los extractos con cloroformo, etanol, metanol y agua (carriles 2, 5, 6 y 7), se obtuvieron escasas manchas relacionadas con carbohidratos. En los extractos con acetona y etanol (carriles 4 y 6), se observó la presencia de saponinas del tipo esteroideal en manchas de color café en el punto de aplicación. En el carril 4, correspondiente al extracto con acetona, se apreció una mancha verde-amarillo ($R_f=0.21$), que corresponde a la fenilhidrazona. Por otra parte, en el extracto con hexano, cloroformo y acetato de etilo (carriles 1, 2 y 3), se evidenciaron 5 manchas correspondientes a carbohidratos con igual R_f (0.06, 0.31, 0.36, 0.6, 0.67, 0.87 respectivamente) (Figura 17).

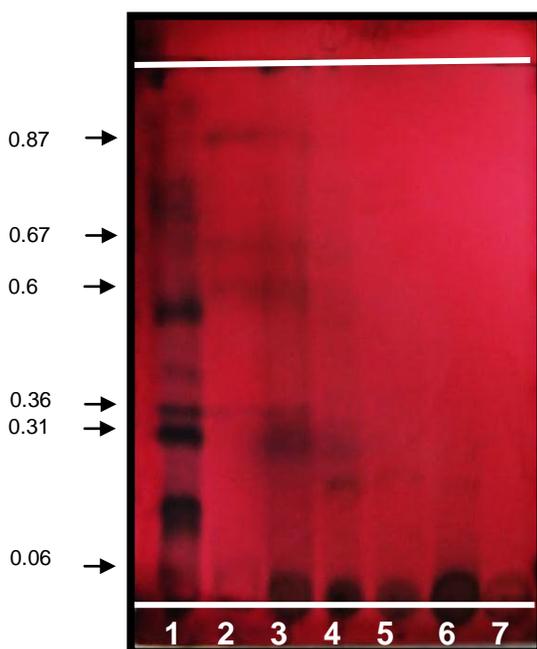


Figura 16. Cromatograma en placa fina de los extractos de hojas de Neem en el período de floración obtenidos con los diferentes disolventes revelados con p-anisaldehído-ácido sulfúrico, para identificar carbohidratos. (1: Hexano, 2: Cloroformo, 3: Acetato de etilo, 4: Acetona, 5: Metanol, 6: Etanol, 7: Agua destilada)

III.4.1.2 Identificación de carbohidratos de los extractos acuosos y etanólico de hojas de Neem

En el cromatograma de las muestras de los extractos acuosos y etanólico de las hojas de Neem en el período de floración, cuando se revelaron con p-anisaldehído-ácido sulfúrico, se observó la presencia de los carbohidratos solubles en etanol al 70% y en agua con extracción de 24, 48 y 72 h. En el extracto etanólico (carril 1), se observaron 12 manchas correspondientes a carbohidratos, siendo este extracto el que mayor cantidad de carbohidratos contenía. En los carriles correspondientes al extracto etanólico y extractos acuosos de 24 y 48 h de extracción (carriles 1, 2 y 3 respectivamente), se observaron 2 manchas correspondientes a carbohidratos con el mismo desplazamiento ($R_f=0.31$, 0.35). Esto indica la presencia de los mismos compuestos en los diferentes extractos y en diferentes tiempos de extracción, con polaridad parecida. Sin embargo, se puede observar la presencia ($R_f=0.04$, 0.09 , 0.39) y ausencia ($R_f=0.24$, 0.38 , 0.58), de carbohidratos con diferentes R_f en los diferentes períodos de extracción en los carriles 2, 3 y 4 correspondientes al extracto acuoso de 24, 48 y 72 h de extracción respectivamente. Por último, en todos los extractos, acuosos y etanólico, se encontraron manchas de color café en el punto de aplicación, correspondientes a saponinas (Figura 18).

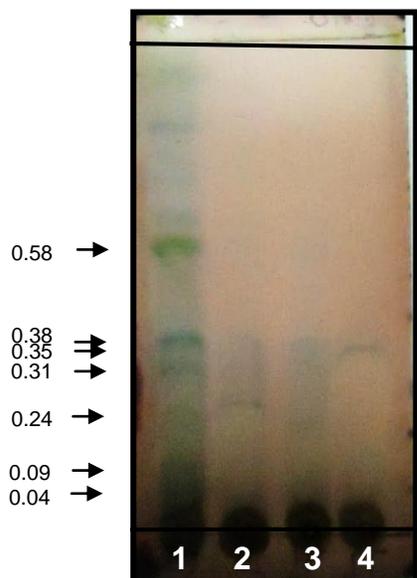


Figura 17. Cromatograma en placa fina de extractos acuosos y etanólico de las hojas del Neem en el período de floración tratada con p-anisaldehído-ácido sulfúrico para identificar carbohidratos. (1: Extracto etanólico, 2: Extracto acuoso 24 h de extracción, 3: Extracto acuoso 48 h de extracción, 4: Extracto acuoso 72 h de extracción)

III.4.2 Identificación de compuestos fenólicos totales

III.4.2.1 Identificación de compuestos fenólicos totales en los extractos obtenidos por hojas del Neem por 7 diferentes disolventes

En el cromatograma en placa fina de las fracciones de hojas del Neem en el período de floración obtenidas con 7 diferentes disolventes con el revelador de p-anisaldehído-ácido acético glacial se observó la presencia de compuestos fenólicos de diferente polaridad como manchas color azul. En el carril 1, correspondiente a la fracción de hexano, se encontraron alrededor de 13 compuestos fenólicos, siendo de esta fracción, la mayor cantidad de compuestos fenólicos obtenidos. De estos 13 compuestos fenólicos, 7 de ellos ($R_f=0.14, 0.25, 0.34, 0.63, 0.71, 0.72, 0.82$) se observaron en los demás carriles correspondientes a las 6 fracciones restantes pero con diferente intensidad de color. En todos los carriles, se detectó la presencia de esteroides en todos los extractos como manchas de color verde ($R_f=0.03, 0.25, 0.4, 0.47$) (Figura 18). En el punto de aplicación de la fracción acuosa (carril 7), se observa un mancha en color rojo, correspondiente a terpenos (Figura 19).

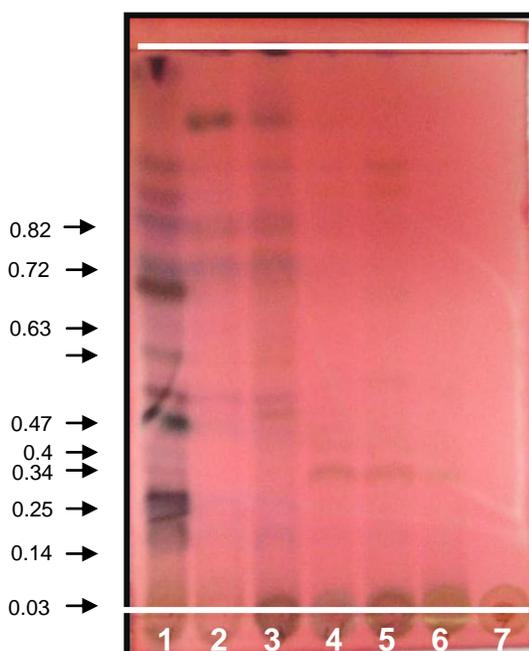


Figura 18. Cromatograma en placa fina de extractos de hojas del Neem en el período de floración obtenidos con 7 diferentes disolventes tratada con p-anisaldehído-ácido acético glacial para identificar compuestos fenólicos. (1: Hexano, 2: Cloroformo, 3: Acetato de etilo, 4: Acetona, 5: Metanol, 6: Etanol, 7: Agua destilada)

III.4.2.2 Identificación de compuestos fenólicos totales de los extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem

En el cromatograma en placa fina de los extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem en el período de floración, con el revelador de p-anisaldehído-ácido acético se observó la presencia de los compuestos fenólicos con afinidad a etanol al 70% y agua con extracción de 24, 48 y 72 h. En el carril correspondiente al extracto etanólico (carril 1) se visualizaron alrededor de 13 manchas correspondientes a fenólicos, 4 manchas pertenecientes a esteroides y 4 de posibles carbohidratos respectivamente. En el extracto acuoso de 24 h de extracción (carril 2) y el extracto etanólico se observó una mancha verde relacionada a esteroides ($R_f=0.47$) y 2 manchas azules de compuestos fenólicos ($R_f=0.29, 0.4$). La muestra con menor presencia de manchas correspondientes a fenólicos fue la perteneciente al extracto acuoso de 72 h de extracción (carril 4) (Figura 20).

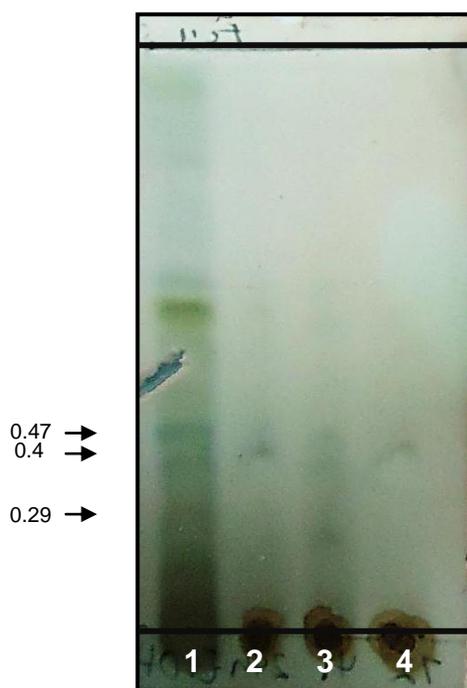


Figura 19. Cromatograma en placa fina de extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem en el período de floración tratada con p-anisaldehído-ácido acético glacial para identificar compuestos fenólicos. (1: Extracto etanólico, 2: Extracto acuoso 24 h de extracción, 3: Extracto acuoso 48 h de extracción, 4: Extracto acuoso 72 h de extracción)

III.4.3 Identificación de flavonoides

III.4.3.1 Identificación de flavonoides en los extractos obtenidos por hojas del Neem por 7 diferentes disolventes

En el negativo del cromatograma en placa fina de las fracciones de hojas del Neem en el período de floración obtenidas con 7 diferentes disolventes con el revelador de AlCl_3 bajo la emisión de luz UV a 365 nm se observó la presencia de flavonoides agliconados (sin carbohidratos como manchas amarillas y flavonoides glicosilados como manchas rojas de diferente polaridad. En la fracción de hexano (carril 1) se observó la presencia de 8 flavonoides agliconados, siendo en esta fracción donde ese encontró la mayor cantidad de este tipo de flavonoides. En los carriles 2 y 3 correspondientes a la fracción de cloroformo, acetato de etilo y etanol se encontró el mismo flavonoide agliconado ($R_f=0.67$). En el carril correspondiente a la fracción acuosa (Carril 7) se observa en el punto de aplicación una mancha correspondiente a un flavonoide agliconado. En todos los carriles se observa la presencia de flavonoides glucosilados y sólo en el carril 2 correspondiente a la fracción de cloroformo se observa una mancha perteneciente a un ácido fenólico ($R_f=0.76$) (Figura 21).

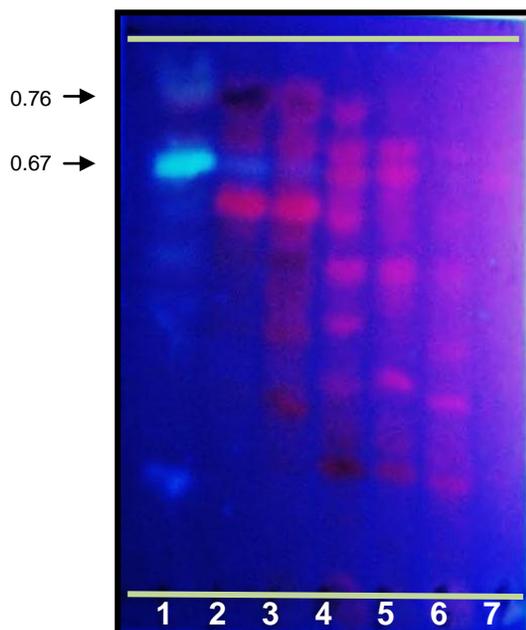


Figura 20. Cromatograma en placa fina de extractos de hojas del Neem en el período de floración obtenidos con 7 diferentes disolventes tratada con revelador de AlCl_3 para identificar flavonoides a 365nm. (1: Hexano, 2: Cloroformo, 3: Acetato de etilo, 4: Acetona, 5: Metanol, 6: Etanol, 7: Agua destilada)

III.4.3.2 Identificación de flavonoides del extracto acuoso y etanólico

En el negativo del cromatograma en placa fina de los extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem en el período de floración, con el revelador de $AlCl_3$ bajo la emisión de luz UV a 365 nm se observó la presencia de flavonoides agliconados (sin carbohidratos como manchas amarillas y flavonoides glicosilados como manchas rojas afinidad a etanol al 70% y agua con extracción de 24, 48 y 72 h. En el carril correspondiente al extracto etanólico (Carril 1) se obtuvieron alrededor de 10 flavonoides, 5 del tipo agliconados ($R_f=0.34, 0.4, 0.44, 0.49, 0.51$) y 5 del tipo glucosilado ($R_f=0.57, 0.64, 0.81, 0.9, 0.96$). Respecto los extractos acuosos (Carril 2, 3 y 4) presentaron 5 manchas de flavonoides agliconados con variaciones de R_f e intensidad y en el punto de aplicación, los 3 tipos de extracto acuoso se observaron flavonoides agliconados, lo que indicaría que los flavonoides agliconados no tienen polaridad. Los factores de retención del extracto acuoso de 24 h de extracción ($R_f=0.06, 0.29, 0.46, 0.64, 0.94$), el de 48 h de extracción ($R_f=0.07, 0.37, 0.47, 0.57, 0.96$) y el de 72 h de extracción ($R_f=0.1, 0.34, 0.47, 0.97$) variaron (Figura 22).

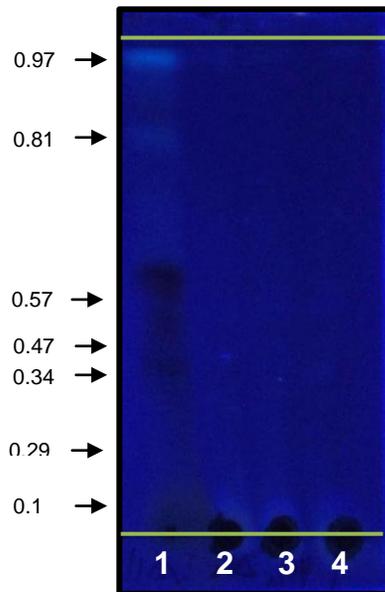


Figura 21. Cromatograma en placa fina de extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem en el período de floración tratada con revelador de $AlCl_3$ para identificar flavonoides a 365 nm. (1: Extracto etanólico, 2: Extracto acuoso 24 h de extracción, 3: Extracto acuoso 48 h de extracción, 4: Extracto acuoso 72 h de extracción)

III.4 Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides en extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem

Se preparó un extracto acuoso (infusión), que contuviera de hojas una concentración de compuestos fenólicos (0.081 μg equivalentes de ácido gálico) y flavonoides (0.042 μg equivalentes de catequina) iguales al extracto etanólico. Al extracto acuoso obtenido se le determinó el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides a las 4, 24, 48 y 72 h de haberse preparado el extracto para conocer si existía algún cambio en la cantidad de componentes que se encontraban en este con respecto al tiempo. De forma inicial se encontró que el extracto acuoso de 24 h presentaba la mayor concentración de compuestos fenólicos (0.12 μg equivalentes de ácido gálico/mg de hojas contenidas en el extracto) y de flavonoides (0.0348 μg equivalentes de catequina/mg de hojas contenidas en el extracto). A las 72 h de extracción se detectaron compuestos fenólicos (0.063 μg equivalentes de ácido gálico/mg de hojas contenidas en el extracto), pero no fue así en el caso de los flavonoides (Figura 23).

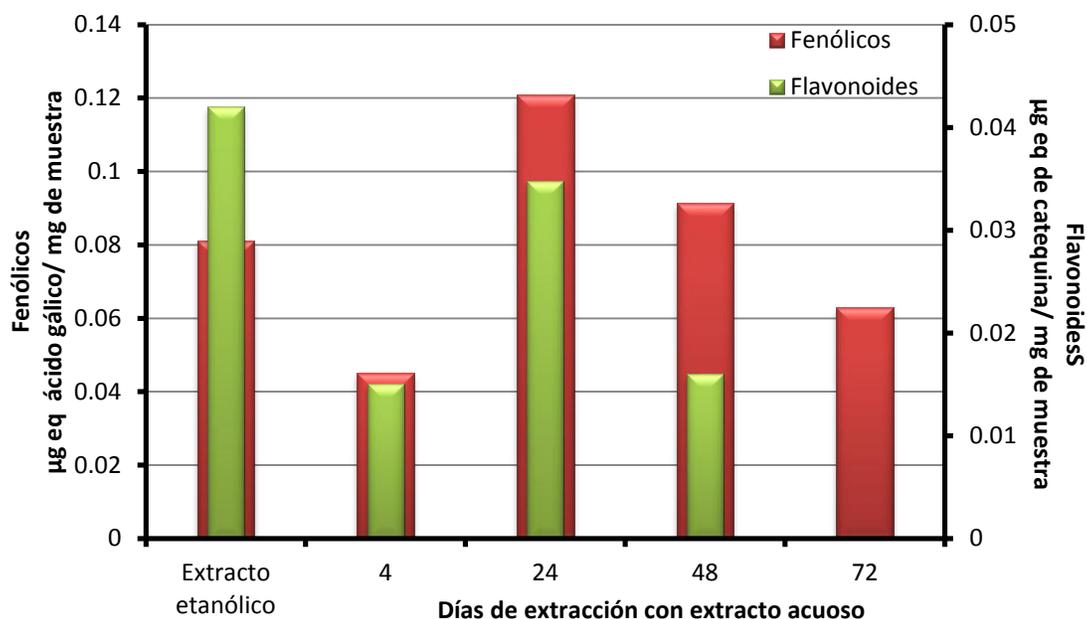


Figura 22. Compuestos fenólicos y flavonoides en extractos acuoso y etanólico de hojas del Neem en el período de floración

III.5 Actividad antioxidante

III.5.1 Actividad sobre el radical DPPH

En las pruebas de actividad del radical DPPH, todos los estándares y extractos hojas del Neem a diferentes concentraciones durante 30 min, presentaron actividad antirradical. Sin embargo, los estándares de catequina y ácido gálico demostraron tener la mayor actividad antioxidante bajo las 4 concentraciones de prueba (80-100%). El extracto etanólico presentó la menor actividad antirradical en todas las concentraciones de prueba (< 20%). Los extractos acuosos de 24 y 48 h se comportaron de manera similar a los estándares de vainillina y ácido cumárico, presentando la mayor actividad antirradical a los 250 μM equivalentes de ácido gálico y la menor a los 100 y 500 μM equivalente de ácido gálico (Figura 24).

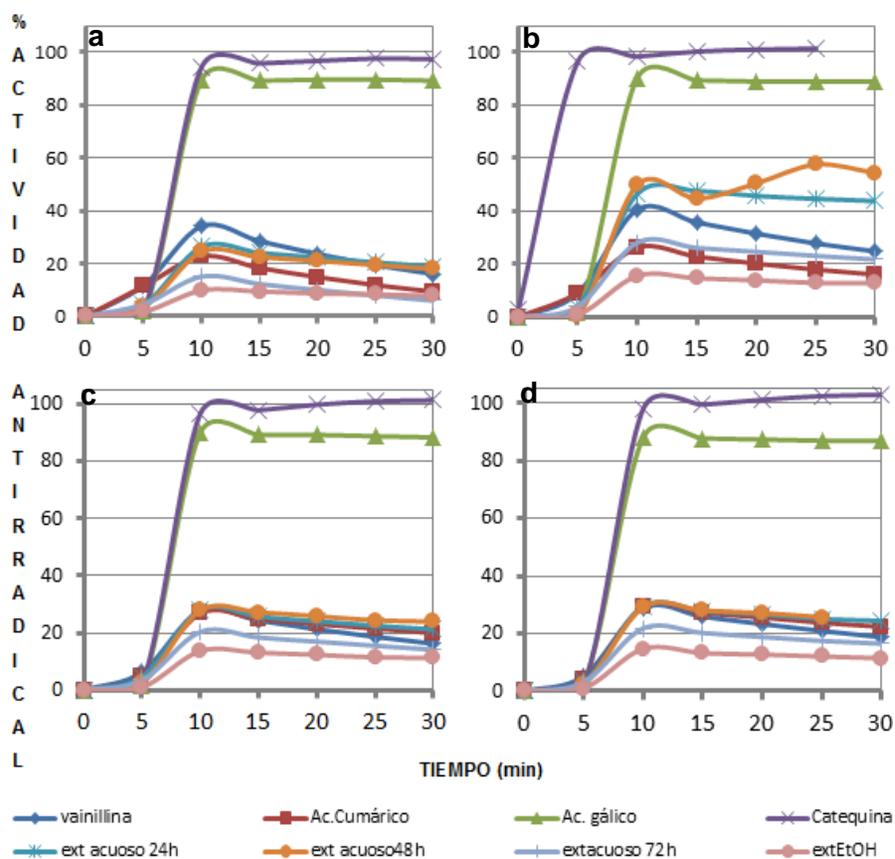


Figura 23. Actividad antirradical de extractos acuosos y etanólicos de hojas del Neem en el período de floración durante 30 min a diferentes concentraciones equivalentes de ácido gálico. Las concentraciones de prueba fueron de a) 500 μM , b) 250 μM , c) 125 μM y d) 100 μM .

III.5.2 Actividad quelante de Cobre

En las pruebas de actividad quelante de cobre, los estándares y todos los extractos de hojas del Neem a diferentes concentraciones equivalentes de ácido gálico, presentaron actividad quelante de Cobre. Siendo el ácido gálico y el extracto acuoso de 72 h los que mantuvieron constante su capacidad de formar complejos con el Cu a partir de 125 μM (87 y 71 % respectivamente). Mientras que el estándar de vainillina (65%), el extracto etanólico (52%) y los extractos acuosos de 24 y 48 h (70-72%) alcanzaron su máxima actividad a los 250 μM y posteriormente, estos disminuyeron su actividad a los 500 μM . Sólo el estándar de ácido cumárico, continuó aumentando su actividad conforme aumentaba su concentración (Figura 25).

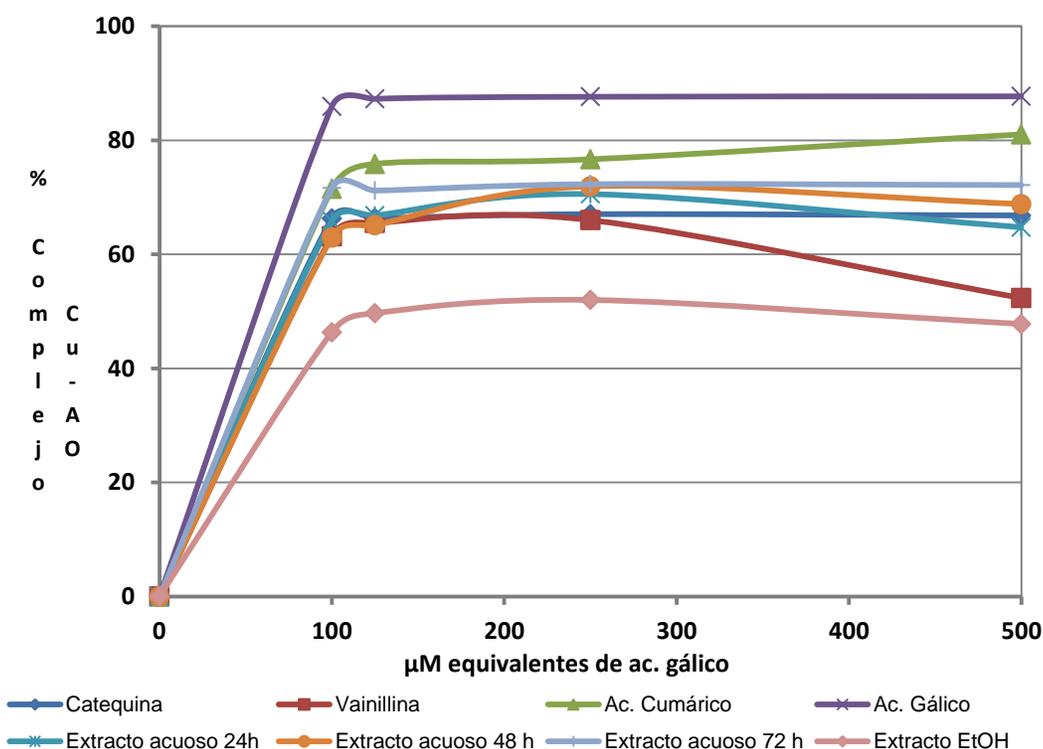


Figura 24. Capacidad secuestrante de Cu de los extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem en el período de floración a diferentes concentraciones.

III.5.3 Actividad quelante de Hierro

En las pruebas de actividad quelante de hierro, los estándares y extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem a diferentes concentraciones equivalentes de ácido gálico, mostraron actividad para formar complejos con Fe conforme aumentaba su concentración. Los extractos acuosos alcanzaron su máxima actividad a los 500 μM , formando entre 10 y 20 % de complejos con el Fe, mientras que el extracto etanólico a esa misma concentración alcanzó la formación de complejos por arriba del 30%. El estándar de ácido cumárico presentó la mejor actividad para formar complejos con el Fe, ya que formó casi un 50% de estos en la concentración de 500 μM , mientras que los estándares de ácido gálico y catequina tuvieron una actividad similar a partir de la concentración de 125 μM (entre 20-30%)(Figura 26).

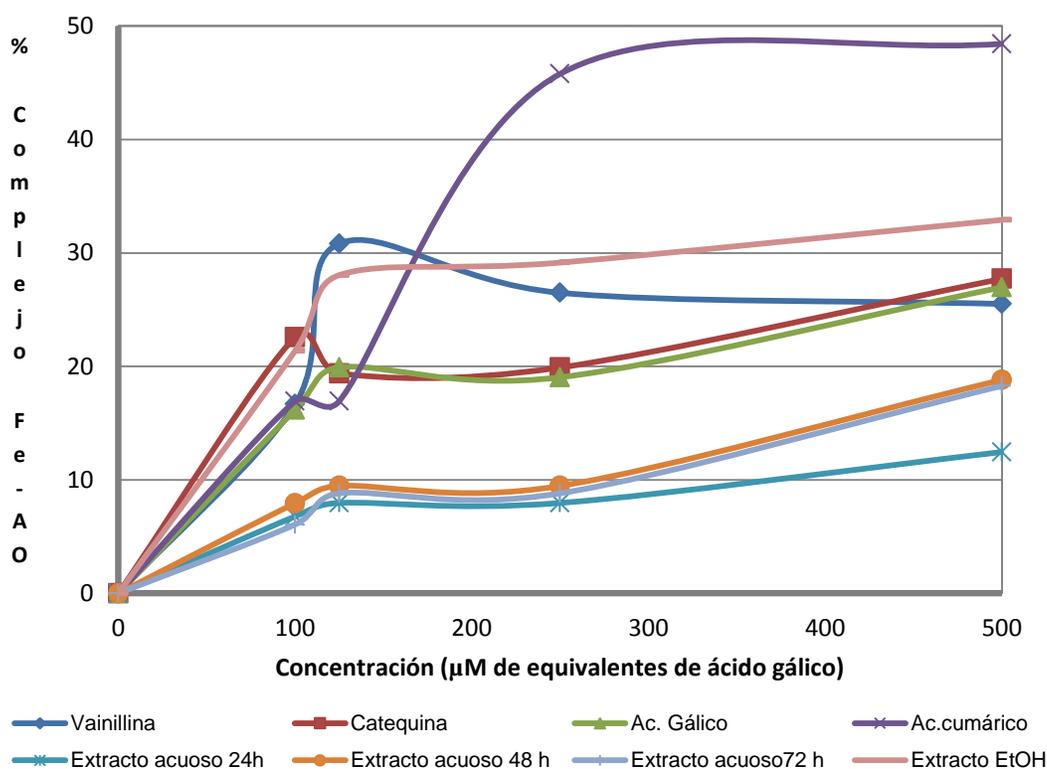


Figura 25. Capacidad quelante del Fe en presencia de extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem en el período de floración a diferentes concentraciones.

III.5.4 Poder Reductor

En las pruebas de poder reductor de los estándares y extractos acuosos y etanólico de hojas del Neem a diferentes concentraciones equivalentes de ácido gálico, todos estos presentaron capacidad para reducir el complejo ferrocianuro férrico a su forma ferrosa. Sin embargo, el extracto acuoso de 24 h de extracción, fue el que generó la mayor absorbancia a 700 nm en todas las concentraciones de prueba. Mientras que el extracto etanólico mantuvo la menor actividad en todas las concentraciones de prueba, con excepción de la concentración de 500 μM , en la cual, se igualó su actividad con el estándar de ácido cumárico y los extractos acuosos de 48 y 72 h de extracción (Figura 27).

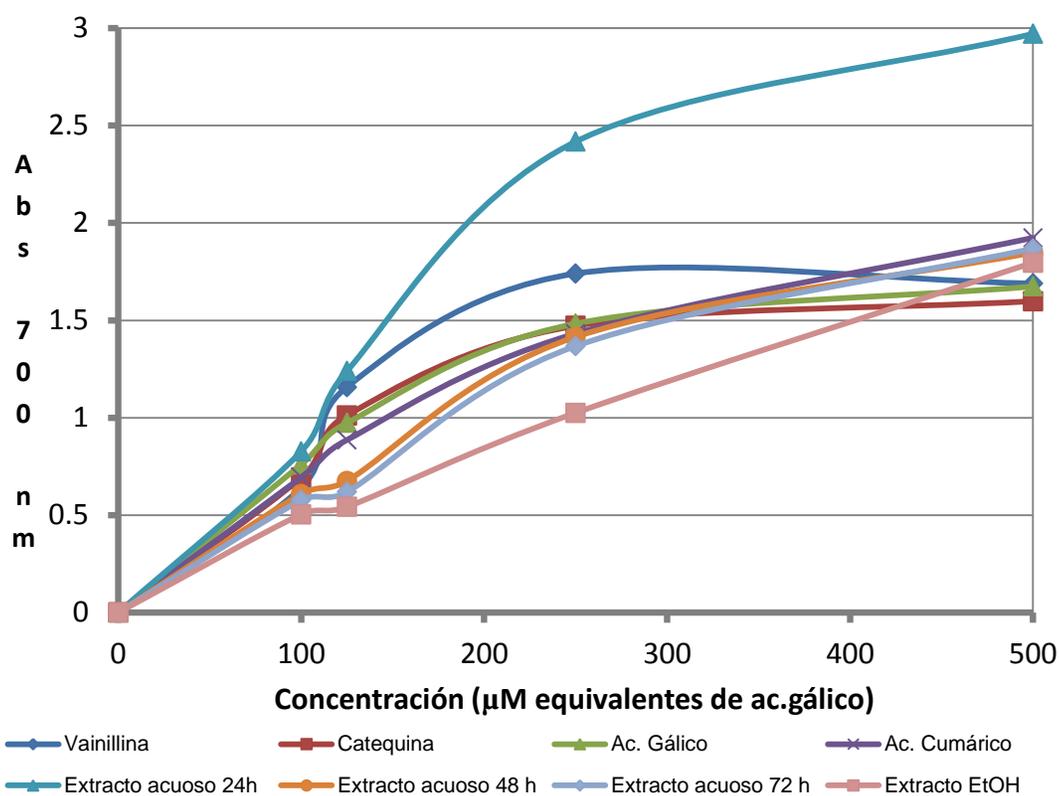


Figura 26. Poder Reductor en presencia de los extractos acuosos y etanólico de hojas de Neem en el período de floración con diferentes concentraciones.

III.6 Efecto de los extractos sobre la línea celular HepG2

III.6.1 Tratamiento con extracto acuoso

III.6.1.1 Colesterol secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo

Para los tratamientos realizados a las células HepG2 cada 24 h con el extracto acuoso de 24 horas de extracción con diferentes dosis, se consideró el porcentaje de colesterol del testigo sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100%. Además se reportó la confluencia celular y se observó que durante los 6 días de tratamiento, esta no se vio afectada, demostrándose que no existió citotoxicidad bajo ninguna de las dosis de prueba. Las concentraciones de colesterol secretado por las células tratadas con 15.8 y 31.6 μg de equivalentes de ácido gálico fueron mayores que el testigo en el día 2 (120-148 % de colesterol) y el día 6 (140-170%). Las menores concentraciones de colesterol secretado se observaron en las muestras tratadas con 7.9 μg de equivalentes de ácido gálico, aunque en el día 6 se observó un aumento hasta el 120% de colesterol (Figura 28).

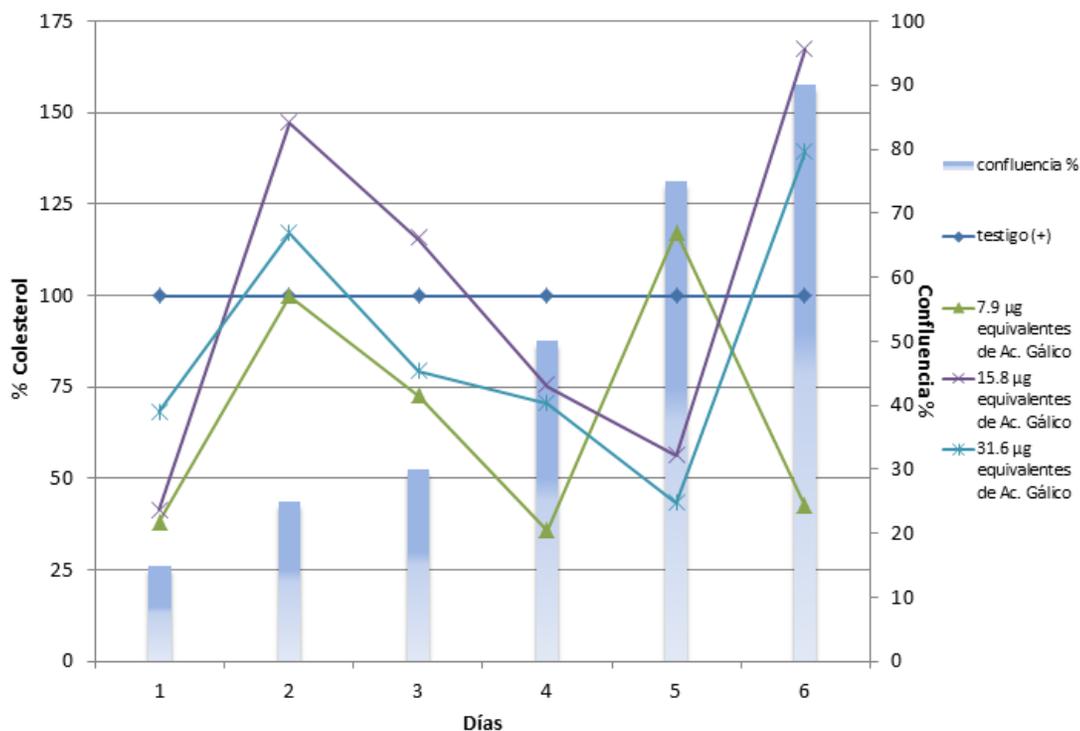


Figura 27. Colesterol secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo durante el tratamiento con extracto acuoso de 24 h de extracción de hojas de Neem en floración. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de las células Hep G2 con extracto acuoso, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de colesterol secretado al medio y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia.

III.6.1.2 Triacilglicéridos secretados por las células HepG2 en el medio de cultivo

Para los tratamientos realizados a las células HepG2 con el extracto acuoso de 24 horas de extracción con diferentes dosis, se consideró el porcentaje de triacilglicéridos del testigo sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100%. El día 1 de tratamiento, la cantidad de triacilglicéridos secretados por las células tratadas con todas las concentraciones probadas, fue del 40 % con respecto al testigo. Sin embargo, a partir del segundo día de tratamiento, el efecto hipolipémico fue disminuyendo hasta obtenerse un efecto inverso en el tercer día de tratamiento. Después de este día, se aprecia la disminución de triacilglicéridos hasta el día 5 en el que se registró la menor concentración de triacilglicéridos (<60%) secretados por las células tratadas con 15.8 μg equivalentes de ácido gálico. Sin embargo, solo las células tratadas con 7.9 μg equivalentes de ácido gálico, fueron las que menor secreción de triacilglicéridos registraron después del día 6, ya que los demás tratamientos aumentaron su secreción (Figura 29).

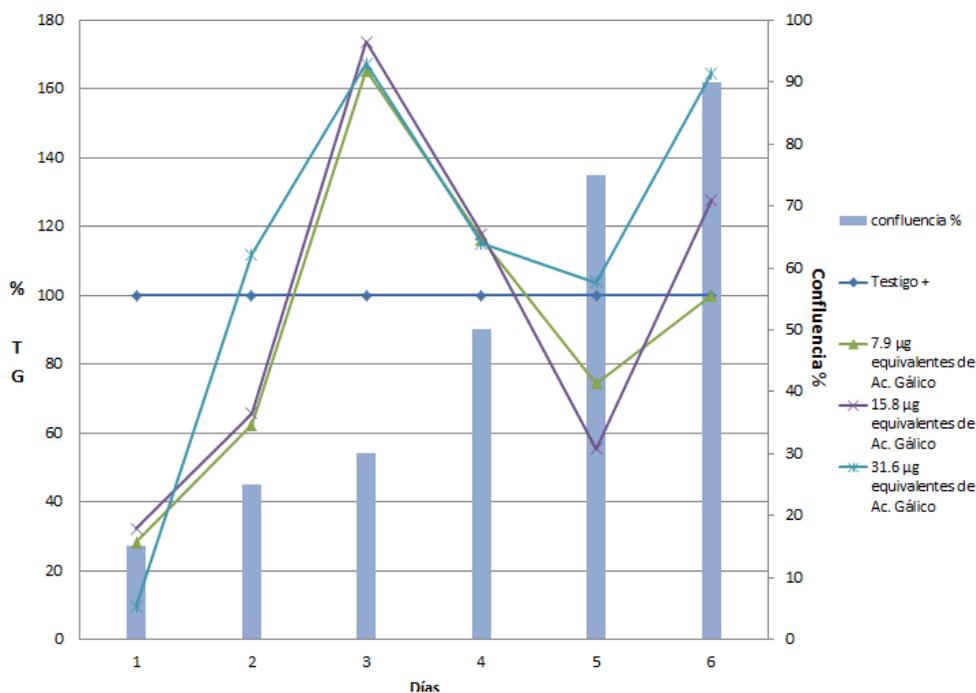


Figura 28. Triacilglicéridos secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo durante el tratamiento con extracto acuoso de 24 h de extracción de hojas de Neem en floración. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de las células Hep G2 con extracto acuoso, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de triacilglicéridos secretados al medio y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia.

III.6.2 Tratamiento con extracto etanólico

III.6.2.1 Colesterol secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo

Para los tratamientos realizados cada 24 h a las células HepG2 con el extracto etanólico con diferentes dosis, se consideró el porcentaje de colesterol del testigo sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100%. Se reportó la confluencia celular y se observó que durante los 7 días de tratamiento, esta no se vio afectada, demostrándose que no existió citotoxicidad bajo ninguna de las dosis de prueba. Todas las concentraciones de prueba mostraron el máximo porcentaje de colesterol secretado al medio en el día 4, posteriormente este decayó, siendo las concentraciones de 15.8 y 31.6 μg equivalentes de ácido gálico las que igualaron su porcentaje de colesterol secretado al medio con el testigo (100%), mientras que las células tratadas con el extracto a 0.69% de compuestos fenólicos secretaron menor porcentaje de colesterol al medio (75%) (Figura 30).

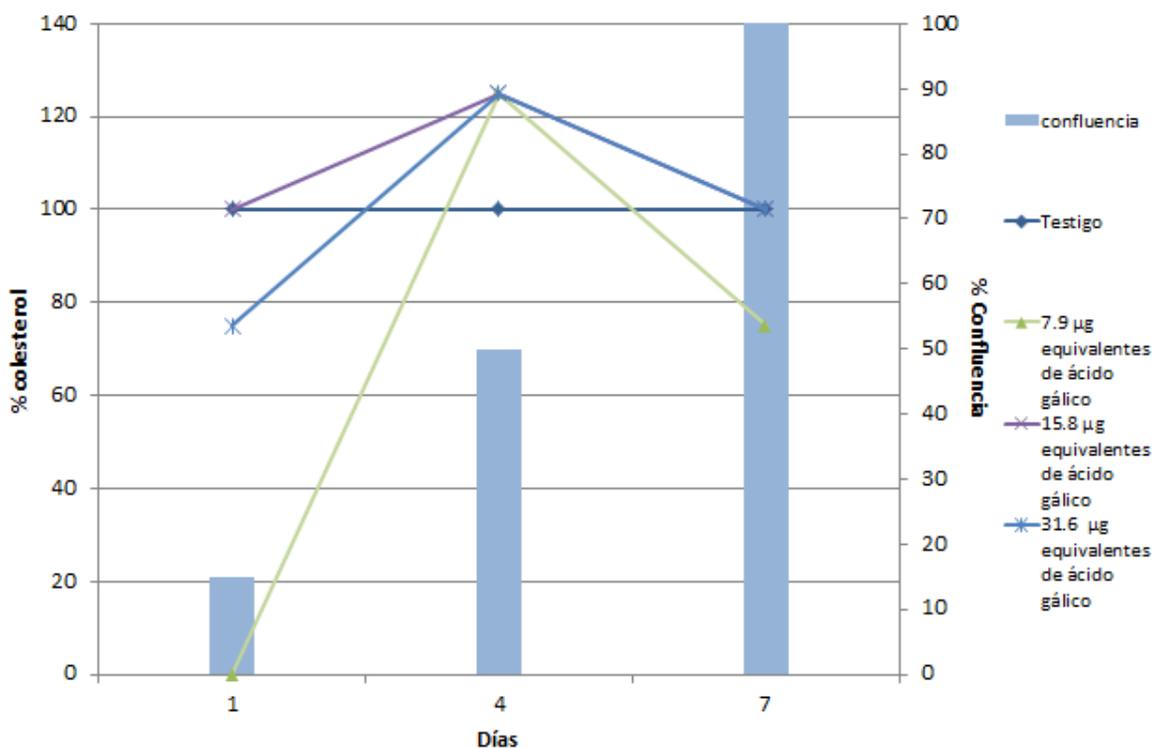


Figura 29. Colesterol secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo durante el tratamiento con extracto etanólico de hojas de Neem en el período de floración. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de las células Hep G2 con extracto etanólico, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de colesterol secretado al medio y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia.

III.6.2.2 Triacilglicéridos secretados por las células HepG2 en el medio de cultivo

Para los tratamientos realizados cada 24 h a las células HepG2 con el extracto etanólico con diferentes dosis, se consideró el porcentaje de triacilglicéridos del testigo sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100%. El porcentaje de triacilglicéridos secretado por las células tratadas con el 0.69% de compuestos fenólicos fue el mismo que el secretado por las células que no recibieron tratamiento durante los 7 días de tratamiento. Las células tratadas con los extractos a 1.37% y 6.87% de compuestos fenólicos secretaron el mayor porcentaje de triacilglicéridos (275%) el día 1 de tratamiento y posteriormente disminuyó el porcentaje de triacilglicéridos al 100% igualándose con el testigo hasta el día 7 (Figura 31).

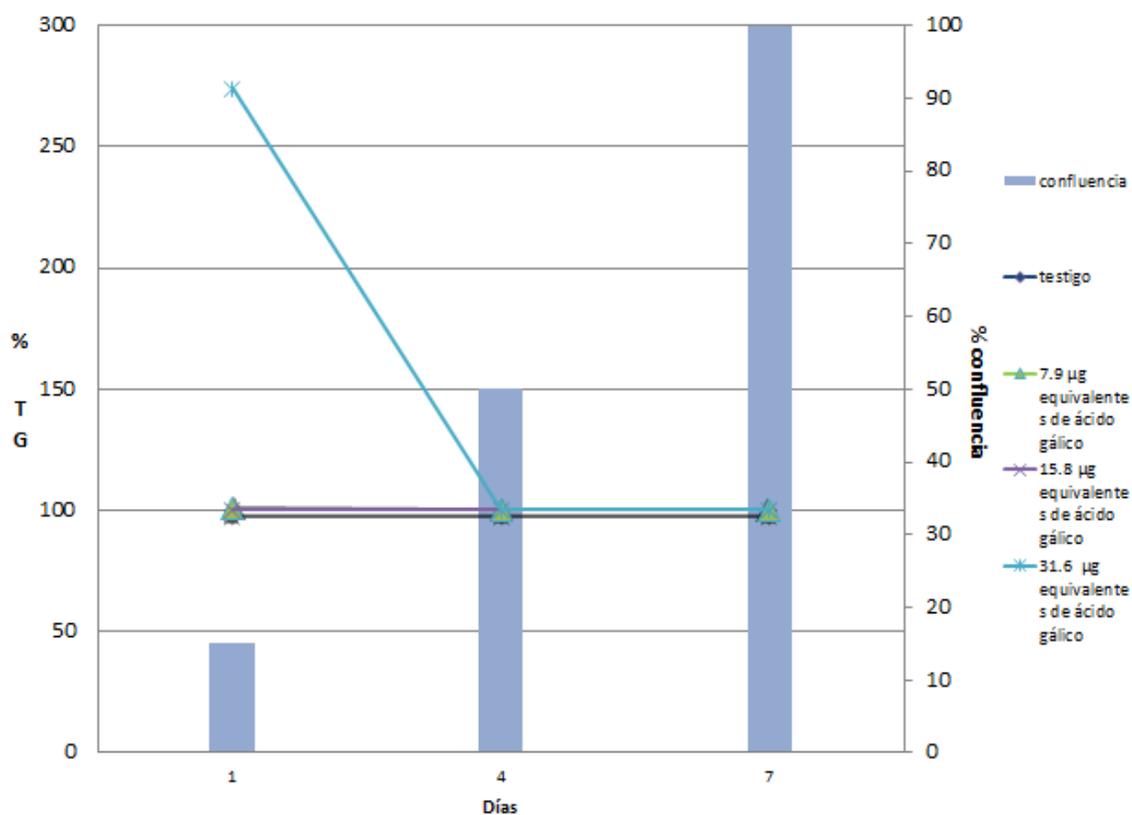


Figura 30. Triacilglicéridos secretado por las células HepG2 en el medio de cultivo durante el tratamiento con extracto etanólico de hojas de Neem en el período de floración. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de las células Hep G2 con extracto etanólico, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de triacilglicéridos secretados al medio y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia.

III.7 Efecto de los extractos sobre la línea celular 3T3L1 durante la diferenciación celular

III.7.1 Tratamiento con extracto acuoso

III.7.1.1 Colesterol contenido en los adipocitos 3T3L1

Para los tratamientos realizados cada 24 h durante la diferenciación de las células 3T3L1, con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos contenidos en el extracto acuoso con 24 h de extracción, se consideró el porcentaje de colesterol contenido en el testigo celular en diferenciación sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100%. Se reportó en la gráfica el porcentaje de confluencia de adipocitos del testigo sin tratamiento durante los días de muestreo. En el día 2 de muestreo se observó un aumento en el contenido del colesterol en las células tratadas con las diferentes dosis de extractos acuosos de 24 de extracción, así como una alta confluencia y morfología de adipocitos (Cuadro 5). Posteriormente en el día 4 de muestreo, el contenido de colesterol en las células tratadas diariamente con los extractos acuosos que contenían 31.6 y 15.8 μg equivalentes de ácido gálico disminuyó entre 150 y 60%, así como su confluencia, mientras que las células tratadas con 7.9 μg equivalentes de ácido gálico mantuvieron su contenido de colesterol aunque con una confluencia disminuida alrededor de un 10 %. Las células tratadas con los extractos acuosos con todos los extractos ya no fueron recuperadas entre los días 5 y 7 de experimentación debido a su nula presencia en el cultivo celular (datos no se muestran (Figura 32)).

Fenólicos μg de eq de ácido gálico	Día de tratamiento				
	0	2	4	6	8
31.6				SIN CÉLULAS A PARTIR DEL DÍA 6	
15.8				SIN CÉLULAS A PARTIR DEL DÍA 6	
7.9					SIN CÉLULAS A PARTIR DEL DÍA 7
Testigo					

Cuadro 6. Morfología celular a 100x durante la diferenciación de los fibroblastos 3T3L1 a adipocitos tratados con extracto acuoso cada 24 h. La última fila del cuadro corresponde al testigo de fibroblastos 3T3L1 diferenciados a adipocitos con insulina, DMSO y MIX.

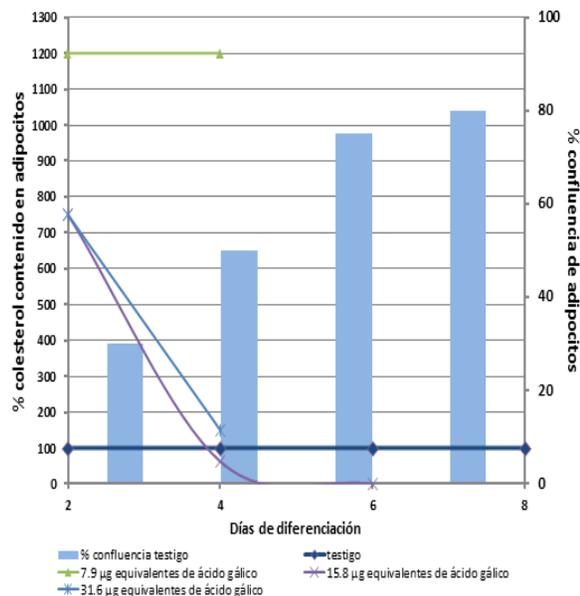


Figura 31. Colesterol en los adipocitos 3T3L1 tratados diariamente con extracto acuoso de hojas de Neem en el período de floración con 24 h de extracción durante la diferenciación. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de los adipocitos 3T3L1 con extracto acuoso, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de colesterol contenido en los adipocitos y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia de los adipocitos testigo.

III.7.1.2 Triacilglicéridos contenidos en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular

Al igual que en el caso del colesterol, se consideró el porcentaje de triacilglicéridos contenidos en el testigo celular en diferenciación sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100%. El día 2 de diferenciación todas las células tratadas registraron menor contenido de triacilglicéridos con respecto al testigo celular (30 %), sin embargo en el día 4 de diferenciación las células tratadas con 7.9 µg equivalentes de ácido gálico incrementaron su concentración de triacilglicéridos hasta en 900 % y después de este día no se lograron detectar células en el cultivo (Cuadro 6). En el caso de las células tratadas con 15.8 µg equivalentes de ácido gálico en el día 4 de tratamiento aumentó su concentración alrededor de un 50 % y posteriormente disminuyó la concentración de triacilglicéridos hasta que en el día 7 de diferenciación no se detectaron células en el cultivo. En el caso de las células tratadas con 7.9 µg equivalentes de ácido gálico aumentó la concentración de triacilglicéridos hasta 112 % y después de este día disminuyó su confluencia hasta no detectarse célula alguna en el día 5 de tratamiento (Figura 33).

Fenólicos µg de eq de ácido gálico	Día de tratamiento				
	0	2	4	6	8
31.6				SIN CÉLULAS A PARTIR DEL DÍA 6	
15.8				SIN CÉLULAS A PARTIR DEL DÍA 6	
7.9					SIN CÉLULAS A PARTIR DEL DÍA 7
Testigo					

Cuadro 6. Morfología celular a 100x durante la diferenciación de los fibroblastos 3T3L1 a adipocitos tratados con extracto acuoso cada 24 h. La última fila del cuadro corresponde al testigo de fibroblastos 3T3L1 diferenciados a adipocitos con insulina, DMSO y MIX.

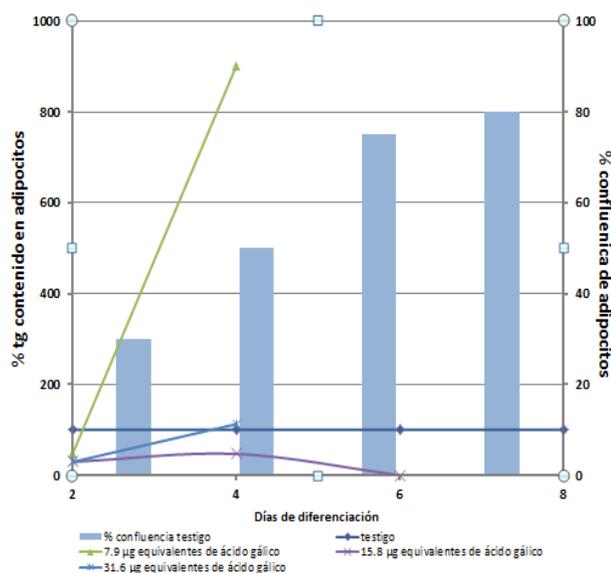


Figura 32. Triacilglicéridos en los adipocitos 3T3L1 tratados diariamente con extracto acuoso de hojas de Neem en el período de floración con 24 h de extracción durante la diferenciación. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de los adipocitos 3T3L1 con extracto acuoso, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de triacilglicéridos contenidos en los adipocitos y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia de los adipocitos testigo

III.7.2 Tratamiento con extracto etanólico

III.7.2.1 Colesterol contenido en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular

Para los tratamientos realizados cada 24 h durante la diferenciación de las células 3T3L1, con diferentes dosis equivalentes de ácido gálico contenidos en el extracto etanólico, se consideró el porcentaje de colesterol contenido en el testigo celular sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100%. En la gráfica también se reporta el porcentaje de confluencia de adipocitos del testigo celular en diferenciación sin tratamiento durante los días de muestreo. La concentración de colesterol en las células tratadas con 7.9 μg equivalentes de ácido gálico en el día 2 de tratamiento se incrementó hasta 4800 % y posteriormente en el día 4, disminuyó el contenido de triacilglicéridos hasta casi ser indetectable, mientras que la confluencia celular no pudo ser apreciada a partir del día 5. Las células tratadas con 15.8 μg equivalentes de ácido gálico registraron bajo contenido de colesterol de casi 0%, en los primeros días de la diferenciación, siendo hasta el día 6 de diferenciación cuando se registró un aumento en el contenido de colesterol hasta alcanzar concentraciones mayores a 2250 % en el día 6 y posteriormente desaparecer en el día 6. En el caso de las células tratadas con 31.6 μg equivalentes de ácido gálico, en el día 2 de tratamiento las concentraciones de colesterol eran de 250 % y con una confluencia del 80 % de adipocitos. Sin embargo en el día 4 de diferenciación no se detectó colesterol y fueron escasas las células encontradas en el cultivo (Cuadro 7) (Figura 34).

Fenólicos μg de equivalentes de ácido gálico	Día de tratamiento				
	0	2	4	6	8
31.6				SIN CÉLULAS A PARTIR DEL DÍA 5	
15.8					SIN CÉLULAS APARTIR DEL DÍA 7
7.9				SIN CÉLULAS APARTIR DEL DÍA 5	
Testigo					

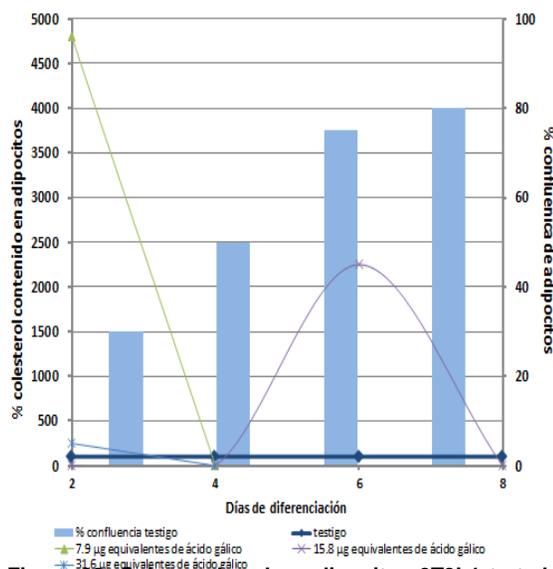


Figura 33. Colesterol en los adipocitos 3T3L1 tratados diariamente con el extracto etanólico de hojas de Neem en el período de floración durante la diferenciación. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de los adipocitos 3T3L1 con extracto etanólico, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de colesterol contenido en los adipocitos y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia de los adipocitos testigo.

100x durante la
3T3L1 a adipocitos
la 24 h. La última fila
de fibroblastos 3T3L1
DMSO y MIX.

III.7.2.2 Triacilglicéridos contenidos en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular

Al igual que en el caso del colesterol, se consideró el porcentaje de triacilglicéridos del testigo en diferenciación sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100%. Las células tratadas con 0.69% de compuestos fenólicos en los días 2 y 4 de muestreo, registraron entre el 187 y 0 % de triacilglicéridos y entre el 50-10% de confluencia de adipocitos, dando como resultado que en el día 5 de tratamiento no se observaron células en el cultivo celular. Las células tratadas con 7.9 y 31.6 μg equivalentes de ácido gálico registraron en el día 2 de tratamiento cerca de un 187 y 10 % de triacilglicéridos respectivamente y en el día 4 de tratamiento las células con tratamiento de extractos acuosos disminuyeron su contenido de triacilglicéridos por lo que casi no fue detectable y siendo después del día 5 de tratamiento el que no se observó la presencia de células en el cultivo celular. (Datos no se muestran) (Figura 35).

Fenólicos μg de equivalentes de ácido gálico	Día de tratamiento				
	0	2	4	6	8
31.6				SIN CÉLULAS A PARTIR DEL DÍA 5	
15.8					SIN CÉLULAS APARTIR DEL DÍA 7
7.9				SIN CÉLULAS APARTIR DEL DÍA 5	
Testigo					

Cuadro 7. Morfología celular a 100x durante la diferenciación de los fibroblastos 3T3L1 a adipocitos tratados con extractos etanólicos cada 24 h. La última fila del cuadro corresponde al testigo de fibroblastos 3T3L1 diferenciados a adipocitos con insulina, DMSO y MIX.

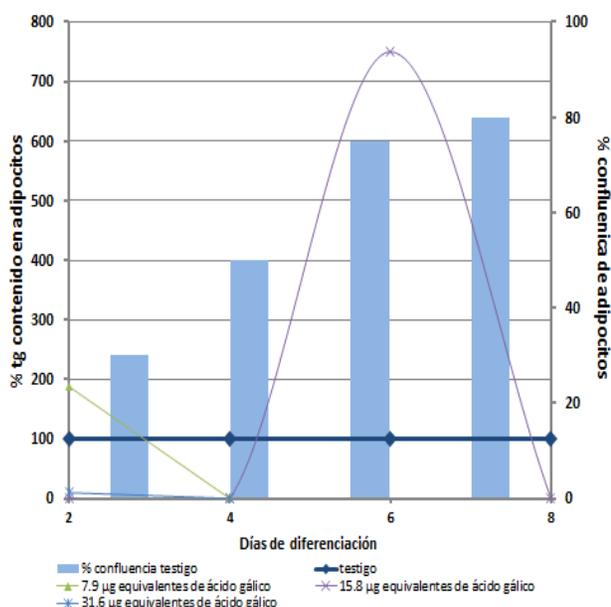
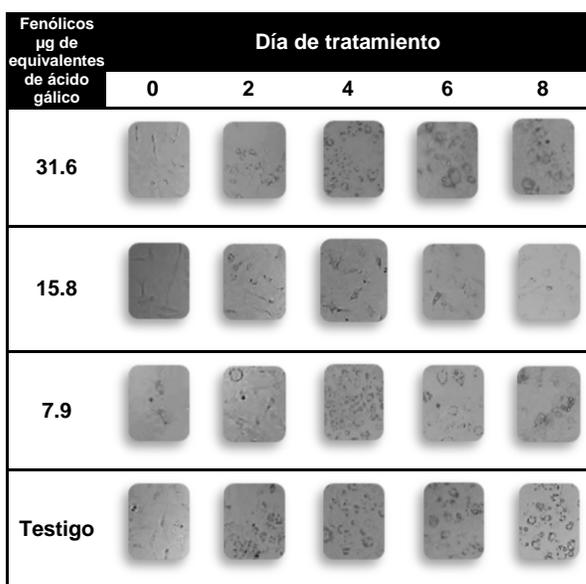


Figura 34. Triacilglicéridos en los adipocitos 3T3L1 tratados diariamente con el extracto etanólico de hojas de Neem en el período de floración durante la diferenciación. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de los adipocitos 3T3L1 con extracto etanólico, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de triacilglicéridos contenido en los adipocitos y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia de los adipocitos testigo.

III.7.3 Tratamiento con extracto acuoso a la línea celular 3T3L1 antes y durante la diferenciación a adipocitos

III.7.3.1 Colesterol contenido en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular

Se realizaron tratamientos con el extracto etanólicos sobre la línea celular 3T3L1 cada 24 h a partir de 4 días anteriores a la diferenciación celular y se continuaron los tratamientos durante los 8 días de diferenciación. Se consideró el porcentaje de colesterol contenido en el testigo celular sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100%. Se reportó en la gráfica el porcentaje de confluencia de adipocitos del testigo celular en diferenciación sin tratamiento durante los días de muestreo. En las células tratadas con la dosis de 31.6 μg equivalentes de ácido gálico no se encontró colesterol hasta el día 4 de diferenciación (55.6 %) en el que se encontraba en una confluencia del 50 % y posteriormente disminuyó hasta estabilizarse el contenido de colesterol al 100 % con respecto al testigo celular en los días 6 y 8 de diferenciación y con una confluencia de adipocitos del 30% (cuadro 4). En las células tratadas con 7.9 y 15.8 μg equivalentes de ácido gálico no se detectó la presencia de colesterol hasta el día 6 donde se encontraron concentraciones de colesterol del 562 y 93 % y confluencias de adipocitos entre el 30 y 20 % (cuadro) respectivamente. Sin embargo, el contenido de colesterol no fue detectado en el muestreo del día 8 en las células tratadas con 15.8 y 31.6 μg equivalentes de ácido gálico, mientras que en las células tratadas con 7.9 μg equivalentes de ácido gálico aumentaron las concentraciones de colesterol hasta llegar a un 900 %, con confluencias del 30 y 20 % respectivamente (Figura 36).



Cuadro 8. Morfología celular a 100x durante la diferenciación de los fibroblastos 3T3L1 a adipocitos tratados con extracto acuoso cada 24 h antes y durante la diferenciación. La última fila del cuadro corresponde al testigo de fibroblastos 3T3L1 diferenciados a adipocitos con insulina, DMSO y MIX.

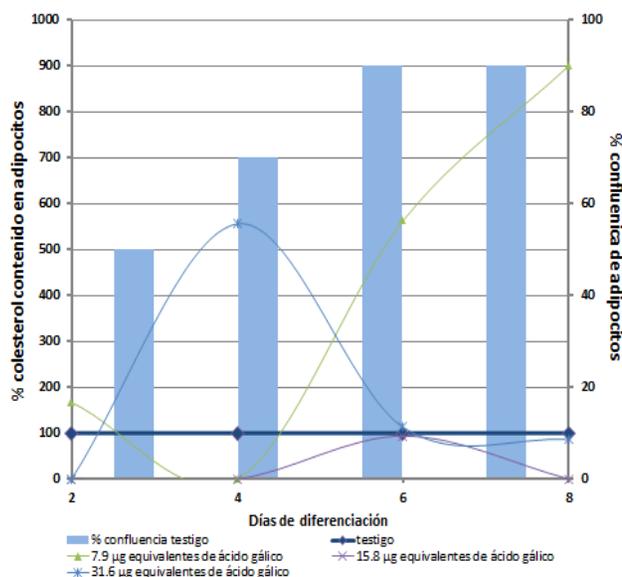
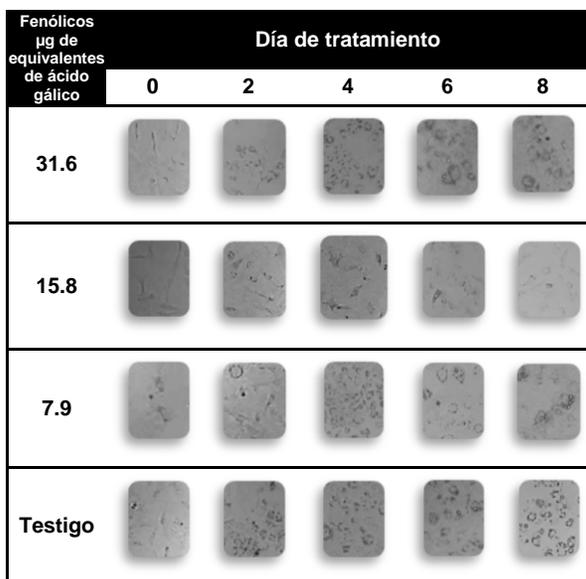


Figura 35. Colesterol en los adipocitos 3T3L1 pretratados y tratados diariamente con extracto acuoso con 24h de extracción de hojas de Neem en el período de floración durante la diferenciación. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de los adipocitos 3T3L1 con extracto acuoso, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de colesterol contenido en los adipocitos y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia de los adipocitos testigo.

III.7.3.2 Triacilglicéridos contenidos en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular

Al igual que en el caso del colesterol, se consideró el porcentaje de triacilglicéridos contenidos en el testigo celular sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100% y también se reportó en la gráfica el porcentaje de confluencia de adipocitos del testigo celular en diferenciación sin tratamiento durante los días de muestreo. Las células tratadas con 7.9 μg equivalentes de ácido gálico mantuvo altos contenidos de triacilglicéridos durante los 8 días de diferenciación entre 257 y 1200 %. En el caso de las células tratadas con 15.8 μg equivalentes de ácido gálico mantuvieron bajas concentraciones de colesterol entre los 8 días diferenciación entre 0-85%, mientras que las células tratadas con 31.6 μg equivalentes de ácido gálico tuvieron concentraciones de colesterol de 51 y 134 % de colesterol entre los días 2 y 6 de diferenciación, pero aumentó su contenido de colesterol hasta 152 % en el día 8 de diferenciación (Figura 37).



Cuadro 8. Morfología celular a 100x durante la diferenciación de los fibroblastos 3T3L1 a adipocitos tratados con extracto acuoso cada 24 h antes y durante la diferenciación. La última fila del cuadro corresponde al testigo de fibroblastos 3T3L1 diferenciados a adipocitos con insulina, DMSO y MIX.

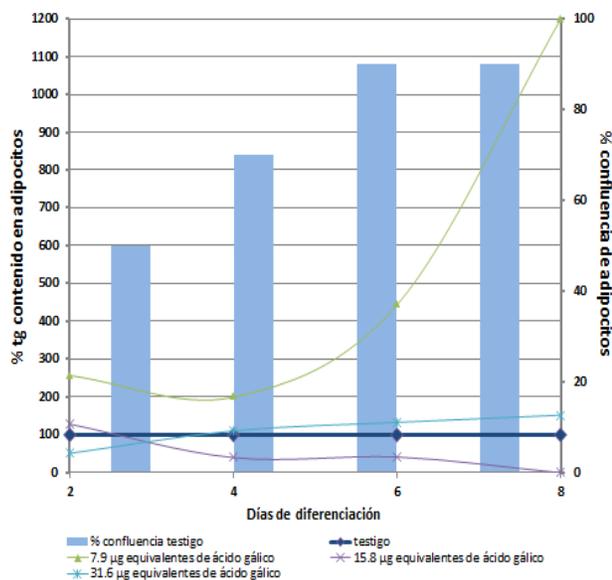


Figura 36. Triacilglicéridos en los adipocitos 3T3L1 tratados diariamente con extracto acuoso con 24 h de extracción de hojas de Neem en el período de floración antes y durante la diferenciación. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de los adipocitos 3T3L1 con extracto acuoso, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de triacilglicéridos contenidos en los adipocitos y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia de los adipocitos testigo.

III.7.4 Tratamiento con extracto etanólico a la línea celular 3T3L1 antes y durante la diferenciación a adipocitos

III.7.4.1 Colesterol contenido en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular

Se realizaron tratamientos con el extracto etanólico sobre la línea celular 3T3L1 cada 24 h a partir de 4 días anteriores a la diferenciación celular y se continuaron los tratamientos durante 8 días de diferenciación. Se consideró el porcentaje de colesterol contenido en el testigo celular sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100%. Se reportó en la gráfica el porcentaje de confluencia de adipocitos del testigo celular en diferenciación sin tratamiento durante los días de muestreo. Las células tratadas con 31.6 μg equivalentes de ácido gálico en el día 2 de diferenciación contenían la misma concentraciones de colesterol que el testigo celular, sin embargo, entre los días 4 al 8 de diferenciación aumentaron las concentraciones de colesterol entre 400 y 800 % y la confluencia celular disminuyó entre 50 y 10 % de adipocitos respectivamente (Cuadro 9). En el caso de las células tratadas con 15.8 μg equivalentes de ácido gálico aumentaron sus concentraciones de colesterol hasta 375 % en el día 6 de diferenciación y se mantuvo aumentando hasta alcanzar 800% de colesterol en el día 8 de diferenciación, mientras que su confluencia celular llegó hasta un 10% de adipocitos en el día 8 de diferenciación. Las concentraciones de colesterol presentes en las células tratadas con 7.9 μg equivalentes de ácido gálico en le día 2 de la diferenciación tenía altos niveles de colesterol (667 %) pero apartir del día 4 se logró apreciar la disminución del contenido de colesterol hasta encontrarse en 44.4 % de este en el día 8 y con una confluencia de adipocitos del 90 % (Figura 38).

Fenólicos μg de equivalentes de ácido gálico	Día de tratamiento				
	0	2	4	6	8
31.6					
15.8					
7.9					
Testigo					

Cuadro 9. Morfología celular a 100x durante la diferenciación de los fibroblastos 3T3L1 a adipocitos tratados con extracto etanólico cada 24 h antes y durante la diferenciación. La última fila del cuadro corresponde al testigo de fibroblastos 3T3L1 diferenciados a adipocitos con insulina, DMSO y MIX.

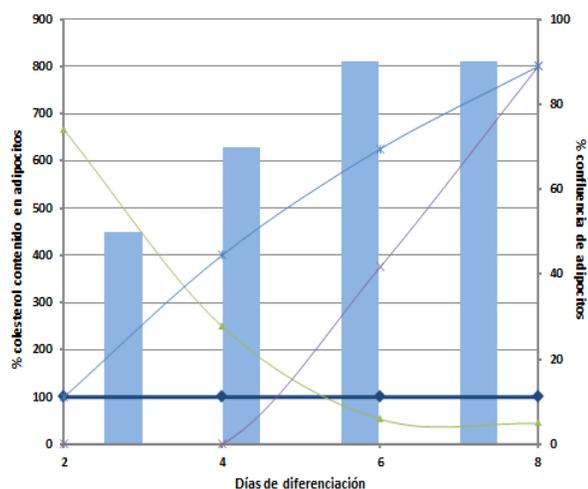
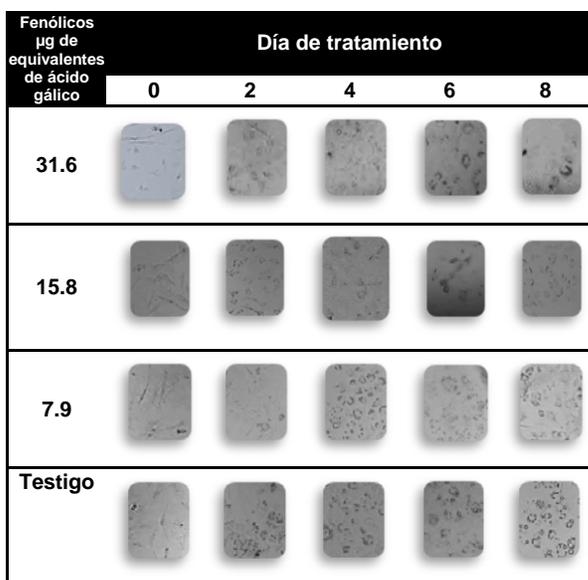


Figura 38. Colesterol en los adipocitos 3T3L1 tratados diariamente con extracto etanólico de hojas de Neem en el periodo de floración antes y durante la diferenciación. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de los adipocitos 3T3L1 con extracto etanólico, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de colesterol contenido en los adipocitos y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia de los adipocitos testigo.

III.7.4.2 Triacilglicéridos contenidos en los adipocitos 3T3L1 durante la diferenciación celular

Al igual que en el caso del colesterol, se consideró el porcentaje de triacilglicéridos contenidos en el testigo celular sin tratamiento de cada día de muestreo como el 100% y también se reportó en la gráfica el porcentaje de confluencia de adipocitos del testigo celular en diferenciación sin tratamiento durante los días de muestreo. Las células tratadas con 7.9 μg equivalentes de ácido gálico en los días 2 y 4 de diferenciación registraron entre 700 y 333 % de triacilglicéridos y posteriormente disminuyeron su concentración de triacilglicéridos a 59 y 74 % en los días 6 y 8 días de diferenciación respectivamente. Mientras que las células tratadas con 15.8 μg equivalentes de ácido gálico aumentaron su contenido de triacilglicéridos entre 416 y 1333 % entre los días 6 y 8 de diferenciación celular. Por último, las células tratadas con 31.6 μg equivalentes de ácido gálico en los días 2 y 4 de diferenciación tuvieron una concentración de triacilglicéridos entre el 128 y 80 %, finalmente en los días 6 al 8 de diferenciación aumentaron la concentración de triacilglicéridos entre 277 y 533 % (Figura 39).



Cuadro 9. Morfología celular a 100x durante la diferenciación de los fibroblastos 3T3L1 a adipocitos tratados con extracto etanólico cada 24 h antes y durante la diferenciación. La última fila del cuadro corresponde al testigo de fibroblastos 3T3L1 diferenciados a adipocitos con insulina, DMSO y MIX.

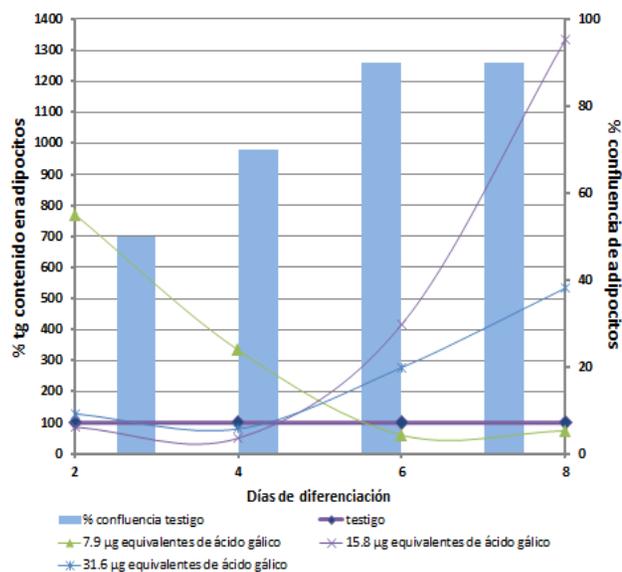


Figura 39. Triacilglicéridos en los adipocitos 3T3L1 pretratados y tratados diariamente con extracto etanólico de hojas de Neem en el período de floración durante la diferenciación. En el eje horizontal se muestran los días de muestreo y tratamiento de los adipocitos 3T3L1 con extracto etanólico, en eje vertical izquierdo se muestra el porcentaje de triacilglicéridos contenidos en los adipocitos y en el eje vertical derecho se muestra el porcentaje de confluencia de los adipocitos testigo.

IV.DISCUSIÓN

En la actualidad como resultado de extensas campañas publicitarias difundidas por los medios masivos de comunicación, existe una marcada tendencia por parte de mayoritaria al consumo de extractos herbales para aliviar o tratar algún padecimiento. Sin embargo, se desconoce si estos tienen efectos son benéficos o perjudiciales; las dosis en que se deben consumir y el tiempo de su consumo.

El Neem es un árbol proveniente de la India, introducido a México desde hace algunos años. Su aprovechamiento involucra desde propiedades como insecticida hasta como un tratamiento contra el cáncer. Con base en los antecedentes descritos en la literatura se consideró importante conocer si existe efectividad de extractos provenientes de hojas del árbol de Neem, en cuanto a su acción hipolipemiente, debido a que su consumo aumenta conforme se propaga la idea de esta acción, cuando se desconoce que puede llegar a provocar la muerte o daños a la salud por compuestos tóxicos que esta especie puede contener si como se ha mencionado anteriormente se puede usar como un insecticida (Singh *et al.*, 1987; Ibrahim *et al.*, 1992; Kanungo 1996).

Los resultados obtenidos en el análisis químico proximal, se encontró que las hojas de árbol Neem en estado de floración eran ricas en lípidos y proteínas, mientras que el mayor contenido de carbohidratos se encontró en las hojas en el período de floración. Existen publicaciones disponibles relacionadas con la composición química de hojas de árboles de Neem en estado de fructificación en Giza, Egipto (Wafaa *et al.*, 2007), en las cuales se menciona que los carbohidratos representan el mayor constituyente de las hojas en un 41.7% las proteínas el 17.4% y los lípidos el 15.9%. Estas proporciones coinciden con las obtenidas en este trabajo y se puede atribuir a que el Neem es un árbol productor de frutos con semillas ricas en aceite, por esta razón su aceite es aprovechado en la India como combustible para lámparas y en Argentina se están realizando estudios para su aprovechamiento en la producción de biodiesel. Estas propiedades orientan el trabajo de investigación hacia un uso integral de este recurso.

En el análisis químico proximal se buscaba conocer la composición química de las hojas del Neem a través de sus macromoléculas, sin embargo este tipo de análisis tienden a no ser cualitativos, por lo que todos estos métodos físicos y químicos no sólo arrastran a los compuestos específicos que se reportan, sino también metabolitos secundarios con polaridad o afinidad a los disolventes empleados. En algunos casos, estos pueden ser degradados por el cambio en el ambiente en el que se encuentran como es el cambio de pH o digestión enzimática lo que provoca una variación en los resultados como es el caso de la búsqueda de proteína cruda en el que se realizan digestiones de las muestras y medidas indirectas de proteína a través de titulación, cuando se sabe que no sólo las proteínas contienen nitrógeno y especialmente en material como son las hojas que son ricas en nitrógeno por la composición de la clorofila. En el caso del análisis del contenido de materia grasa, se utilizan como disolventes de extracción; hexano o éter de petróleo, los cuales no sólo tienen afinidad por ceras, fosfolípidos, ácidos grasos, etc., sino que también puede realizar la extracción de vitaminas y pigmentos. Por esta razón era necesario, realizar el análisis de los metabolitos secundarios de interés para comprobar por diferentes tipos de disolventes de extracción la afinidad que tienen por estos y cuantos podría haber por caracterización en cromatografía en placa fina. En donde se observó que la mayoría de los compuestos de interés (compuestos fenólicos totales y flavonoides) podían ser fácilmente en su mayoría extraídos con hexano, sin embargo; la alta afinidad con lípidos y otras grasas dificultaría la purificación y disminuiría el rendimiento de compuestos fenólicos que se pudieran extraer.

En el análisis de metabolitos secundarios de interés (fenólicos totales y flavonoides) también se observó que la mayor proporción de los compuestos fenólicos totales y flavonoides se encontraron en el período de floración. Estos resultados son similares a lo reportado por diversos autores para otros árboles en periodo de floración, que presentan mayores concentraciones de compuestos fenólicos en flores y hojas; esto se debe a que en esta etapa fisiológica de la planta se sintetizan por la ruta metabólica del ácido shikímico para que se presente la producción de aromas que

atraerán a los insectos para facilitar la polinización y así lograr producir frutos en los que este tipo de metabolitos también están presentes (Ryan *et al.*, 2003). La cantidad de compuestos fenólicos disminuye en las hojas en el período de fructificación, debido a que la mayor cantidad de estos compuestos se acumulan y transforman durante el crecimiento y maduración de los frutos, esto se refleja en los cambios de coloración en la piel de los frutos (Ryan *et al.*, 2003). Sin embargo, los datos obtenidos de compuestos fenólicos son menores si se comparan con los reportados de hojas de Neem de Venezuela estudiadas en 2005 donde se reporta 4.21% de compuestos fenólicos totales (García *et al.*, 2006). Tomando como base estos resultados, se seleccionaron las hojas en el período de floración y a partir de ellas realizar las extracciones con diferentes disolventes y tiempos de extracción que se utilizarían para las pruebas de efecto antioxidante e hipolipemiente.

Los extractos acuosos de hojas de Neem en período de floración para este trabajo, se seleccionaron porque es la manera como como generalmente las personas consumen los remedios herbolarios, ya sea de hojas u otras partes de plantas y árboles, como son; la corteza, frutos o flores. En el caso, del extracto etanólico, se escogió porque existía un reporte en la India (Chattopadyay 2004) donde se menciona el uso de este extracto para probar su efecto en ratas hipocolesterolémicas, las cuales mostraron respuesta favorables en la disminución de lípidos en sangre.

El extracto etanólico mostró menor cantidad concentración de compuestos fenólicos con respecto al obtenido en la India por el grupo de Chattopadhyay en 2004. El comportamiento anterior puede deberse a diversos factores ambientales que influyeron en la disminución de la síntesis de este tipo de metabolitos, condiciones que pueden ser desde ambientales como el tipo de suelo, disponibilidad de agua, cantidad de luz, enfermedades, plagas o clima, hasta aquellos pertenecientes a la especie, como es la edad de este.

En especies vegetales, los compuestos fenólicos en general, no se encuentran en su mayoría como compuestos simples, sino glicosilados, los que son precursores de

pigmentos oligoméricos y posteriormente pigmentos poliméricos (prociandinas dímeros, trímeros y oligómeros) que le confieren alta actividad antioxidante a las plantas (Yilmaz & Toledo, 2004), además 2004, Chattopadyay, hace referencia de haber identificado flavonoides de naturaleza glucosilada que podrían ser los responsables de la actividad hipolipemiente en el plasma sanguíneo de las ratas tratadas con extracto etanólico de hojas de Neem. Debido a esto, en la caracterización por cromatografía en placa fina se realizó el revelado para identificar carbohidratos, fenólicos y flavonoides.

En los cromatogramas en placa fina con reveladores de p-anisaldehído-ácido sulfúrico, se encontró la presencia de fenilhidrazonas lo que nos indica la presencia compuestos de oxidación secundaria (aldehídos, cetonas y ácidos) provenientes de los hidroxiperóxidos lipídicos formados en un estadio inicial de la oxidación lipídica (Galanos *et al.*, 1965; White, 1995). Esto no se observó en las 7 fracciones obtenidas con diferentes disolventes, sin embargo en el extracto etanólico liofilizado obtenido de un macerado de 24 h, presentó una mancha de fenilhidrazona lo que indica la oxidación de los lípidos que pudo haber acarreado el disolvente durante la extracción. En las 7 fracciones obtenidas con diferentes disolventes, se encontraron la mayoría de los carbohidratos en fracción de hexano y esto es por la polaridad del disolvente que le permite la mayor capacidad para arrastrar desde lipídicos sencillos y aquellos que se encuentran unidos a carbohidratos (glicolípidos). Las trazas de carbohidratos que no pudieron ser extraídas con el hexano, se fueron recuperando con los demás disolventes como el cloroformo, etanol, metanol y agua. Esto puede visualizarse ya que el revelador de p-anisaldehído-ácido sulfúrico permite la detección de carbohidratos en cantidades mínimas como 50 ng (Herrera *et al.*, 2003). En el caso de los extractos acuosos de 24, 48 y 72 h de extracción, y el extracto etanólico obtenido de acuerdo al método de Chattopadyay en 2004, se encontraron al menos 4 compuestos con valores de R_f que coincidieron con la fracción de hexano y etanol (R_f=0.03, 0.07, 0.72, 0.77). Entre el extracto etanólico y los extractos acuosos de 24 y 48 h de extracción, se encontró la presencia de 2 carbohidratos con los mismos R_f (2.2, 2.5), esto puede evidenciar que estos carbohidratos son solubles

en los 2 disolventes, además se observa que a las 72 h de extracción, el carbohidrato con Rf de 2.2 se degradaba ya no está presente en el extracto, y no se observa la presencia de una nueva mancha con diferente Rf.

Bajo el revelador de p-anisaldehído- ácido acético se observó la presencia de saponinas (glucósidos esteroideos, constituidos por un elemento soluble en lípidos (esteroide o triterpenoide) y un elemento soluble en agua (carbohidrato)) en la placa con las 7 fracciones de disolventes y en los extractos etanólicos y acuosos del Neem, las saponinas naturalmente se encuentran en las hojas como defensas químicas ante agentes patógenos (Díaz-Puentes, 2009). Cuando se consumen las saponinas, estas pueden causar daños a las células, esto se debe a lesiones causadas por una agregación de las micelas entre las saponinas y el colesterol en el plano de la membrana, posiblemente con las moléculas de saponina dispuestas en un anillo con sus restos hidrofóbicos junto con el colesterol en todo el perímetro exterior (Bangham & Horne, 1962; Seeman *et al.*, 1973). Otros informes muestran que las interacciones entre las saponinas y las membranas biológicas tienden a ser más compleja. Brain *et al.* (1990) mostró que la inserción de la aglicona en la bicapa lipídica es independiente de la presencia del colesterol y que las saponinas pueden inducir a un cambio en la permeabilidad de membrana liposomal sin colesterol cuando las saponinas están glicosiladas en C₃ y C₂₈ de la aglicona oleanólica (Hu *et al.*, 1996). Sin embargo, también se le confieren beneficios a la salud, debido a que pueden tener efecto hipocolesterolemizante, porque forman grandes micelas mixtas formadas con ácidos biliares aumentando la excreción de este cuando se consumen alimentos ricos en saponinas como es la soya alfalfa y garbanzo (Oakenfull, 1986; Oakenfull & Sidhu, 1990) a su vez aceleran el metabolismo del colesterol en el hígado haciendo que los niveles séricos de este, disminuyan.

También con el revelador de p-anisaldehído-ácido acético glacial sobre la placa con las fracciones de 7 disolventes se visualizó la presencia de fenólicos en 6 se estos, con excepción del extracto acuoso. También se encontraron en los extractos etanólico y acuosos con diferentes horas de extracción. Se encontró la presencia de

esteroles terpenos en todos los extractos, indicadores de la presencia de constituyentes principales de las plantas, como; la clorofila, giberelina y ácido abscísico. Así mismo, la presencia de esteroides podría indicarnos la presencia de estructuras con funciones iguales a la del colesterol en los humanos, ya que son esenciales en la formación de las membranas vegetales y son precursores de las hormonas vegetales. Se encontró que aunque si existía la presencia de fenólicos en los extractos de diferentes tiempo de extracción, también se observa que estos pueden desaparecer con respecto al tiempo y esto permitiría visualizar por qué puede cambiar su actividad antioxidante e hipolipemiante si se consumen después de cierto tiempo de elaboración.

Con el revelador de $AlCl_3$, se logró observar la presencia de flavonoides agliconados como manchas amarillas bajo luz UV a 365 nm. En el caso de la placa con las fracciones de 7 diferentes disolventes se observó que el mayor arrastre de estos lo realizó el hexano y posteriormente las trazas que quedaban fueron arrastradas por el cloroformo y acetato de etilo. De acuerdo al revelador de p-anisaldehído-ácido sulfúrico y $AlCl_3$, la mayoría de las fracciones que presentaron carbohidratos(hexano, cloroformo, acetato de etilo, acetona y etanol), esto podría corresponder a antocianinas de naturaleza no polar que se encuentran localizados en los cloroplastos, ya que los disolventes hidrofóbicos logran eliminar las membranas y permitir el flujo hacia el medio (Marcano & Hasegawa, 2002). Las fracciones de metanol y agua no demostraron la presencia de carbohidratos por lo que se podrían considerar como flavonoides, que poseen un gran número de grupos hidroxilos, que son considerados polares (Gracia, 2007), localizados en las vacuolas y que por lo tanto, son hidrofílicos que no pueden ser extraídos por disolventes no polares (Marcano & Hasegawa, 2002). En el caso de la placa con el extracto de etanol al 70% y los extractos acuosos se observa también la presencia de flavonoides agliconados aunque con diferente polaridad. En el caso de los extractos acuosos con diferentes tiempos de extracción, dependiendo del tiempo de extracción se observa la variaciones en los Rf de estos y por lo tanto se entiende cambiaba su polaridad, demostrando que esto se puede deber a una pérdida o ganancia de grupos hidroxilo

por oxidación o sustitución el anillo pirano central durante la extracción, además se encontró que a las 72 h de extracción puede haber una pérdida de algunos compuestos al encontrarse solo 4 manchas correspondientes a flavonoides cuando a las 24 y 48 h aún se detectaban 5.

Para verificar si existía algún cambio en el contenido de fenólicos y flavonoides entre los extractos acuosos con diferentes tiempos de extracción y el etanólico, se realizó la cuantificación de estos por el método de Folin-Ciocalteou para fenólicos y el de $AlCl_3$ para flavonoides de acuerdo a lo reportado por Zhishen y se encontró que no nada más había cambios en la estructura de los fenólicos y flavonoides sino que también en la cantidad de estos durante el tiempo de extracción y tipo de disolvente. Se encontró que aunque había más compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto etanólico la proporción de estos era menor que la del extracto acuoso a las 24 h de extracción. Después de esta serie de caracterizaciones se procedió a hacer las pruebas de los extractos para actividad antioxidante por actividad antirradical por el método de DPPH, la actividad de quelación de los extractos de Cu y Fe, así como el poder reductor de los extractos. Se comparó la actividad antioxidante de los extractos y de estándares de fenólicos conocidos.

La reacción del DPPH consiste en que el radical de este, recibe protones (H^+) del antioxidante para estabilizar al DPPH. En el caso de la actividad antirradical con DPPH, se encontró a la catequina y al ácido gálico como aquellos que tuvieron la mayor actividad (80-100%). Esto se puede deber a que la catequina y el ácido gálico poseen más protones que pueden cederse al radical DPPH, en comparación con la vainillina y el ácido p-cumárico (Figura 39).

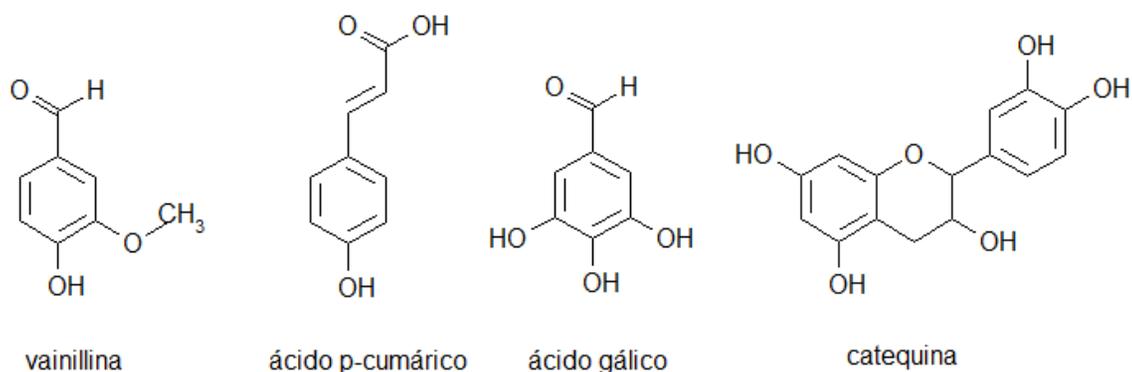


Figura 37. Estructura de los estándares probados para actividad antioxidante

En el caso de los extractos, se encontró que el extracto etanólico obtuvo la menor actividad antirradical en todas las concentraciones de prueba (<20 %) en comparación que los extractos acuosos que tuvieron actividad antirradical (17-30%), además la actividad varió de acuerdo al tiempo de extracción de estos. Se sabe que infusiones como las de hojas de té verde, son susceptibles a cambiar su composición con respecto al tiempo, debido a que compuestos como las catequinas son oxidadas por enzimas celulares de las hojas o de microorganismos que se encuentren en el medio. Estas enzimas, como la polifenol oxidasa y peroxidasa reaccionan con los compuestos fenólicos, convirtiéndolos en compuestos altamente reactivos, como son las quinonas (Caballero *et al.*, 2003). Con esto se puede entender porque razón el extracto a las 72 h de extracción presentó la menor actividad antirradical, ya que la mayoría de los compuestos con actividad antioxidante que hubieran estado presentes a las 24 y 48 h se encuentran oxidados a este tiempo y por lo tanto, tiene menor capacidad de proporcionar protones al DPPH. Se observa también que la actividad antioxidante del extracto etanólico fue muy baja en comparación con los extractos acuosos y los estándares. Esto se puede deber a una posible baja eficiencia de extracción de compuestos fenólicos que pudieran tener actividad antioxidante, esto concuerda con reportes de extractos de corteza de Neem, donde se realizaron pruebas de actividad con DPPH y se encontró que había una baja eficiencia de compuestos fenólicos con actividad antioxidante del extracto etanólico (Sultana *et al.*, 2007).

En el caso de la quelación de cobre y hierro, estos son comparados por separado, esto se debe a que los valores que generalmente se obtienen de esta prueba por hierro resultan ser muy bajos en comparación al cobre (Apak *et al.*, 2004). Debido a que el cobre tiene un potencial redox más bajo que el hierro y su reacción resulta ser más selectiva. Se sabe que los azúcares reductores y el ácido cítrico comúnmente causan interferencias por oxidación en la prueba de quelación de hierro, mientras que esto no sucede en la prueba de quelación de cobre.

El bajo potencial redox de la prueba de quelación de cobre, algunas veces aumenta el ciclo redox, por lo que esta técnica es mucho más sensible y nos puede mostrar el potencial prooxidante que los antioxidantes pueden tener (Prior *et al.*, 2005). Con base en esto, podemos decir que el estándar vainillina presentó actividad prooxidante a partir de 250 μM equivalentes de ácido gálico, ese mismo comportamiento lo presentaron los extractos acuosos de 24 y 48 h, así como el extracto etanólico. Mientras que el extracto acuoso de 72 h presentó actividad antioxidante hasta los 500 μM equivalente de ácidos gálico. En las placas cromatográficas se observó la pérdida de carbohidratos en el extracto acuoso a las 72 h, aunque si la presencia de flavonoides. Se sabe que la mejor actividad antioxidante de los flavonoides aumenta cuando se encuentran como agliconas; debido a que la hidrólisis de los carbohidratos convierte el enlace O-carbohidrato en una sustitución $-\text{OH}$ (Apak *et al.*, 2006), permitiendo al flavonoide la donación de átomos de hidrógeno a los radicales libres que requieren estabilidad.

Entre los flavonoides, destacan por su importancia los flavonoles agliconados, que se encuentran en productos como cebollas y miel (quercetina), fresa (kaempferina) y uvas (miricetina). Estos son conocidos por su capacidad de actuar como antioxidantes, capturar radicales de O_2 , superóxidos y radicales hidroxilos, crear complejos con los iones metálicos e inhibir la oxidación de la vitamina C en algunos alimentos. Las agliconas de dichos flavonoles parecen ser más activas que sus glicósidos (Yan-Hwa *et al.*, 2000).

Con base en esto, podemos decir que el estándar vainillina presentó actividad prooxidante a partir de 250 μM equivalentes de ácido gálico, ese mismo comportamiento lo presentaron los extractos acuosos de 24 y 48 h, así como el extracto etanólico. Mientras que el extracto acuoso de 72 h presentó actividad antioxidante hasta los 500 μM equivalente de Quercetina. En las placas cromatografías se observó la pérdida de carbohidratos en el extracto acuoso a las 72 h, aunque si la presencia de flavonoides. Se sabe que la mejor actividad antioxidante de los flavonoides aumenta cuando se encuentran como agliconas; debido a que la hidrólisis de los carbohidratos convierte el enlace O-carbohidrato en una sustitución –OH (Apak *et al.*, 2006), esto significa que aunque se encuentren en baja concentración los flavonoides por oxidación a quinonas, estas trazas de flavonoides, tienen disponibles otro grupo OH disponible.

La quelación de iones Fe^{2+} se estimó por el método de Decker & Welch de 1990 en el que la ferroxina cuantitativamente forma complejos con Fe^{2+} . En presencia de agentes quelantes, la formación de este complejo se interrumpe y por lo tanto impide la formación del color rojo impartido por el complejo. La medición de este cambio de color, por lo tanto, permite la estimación de la actividad quelante de los compuestos existentes (Khatun, 2011). En este caso, se busca ver la capacidad del antioxidante retardando la oxidación catalizada por un metal para la conversión del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a un radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). En los extractos acuosos existió una tendencia similar (7-18 %) de formación de complejos Fe-antioxidante, sin importar el tiempo de extracción, sin embargo; el extracto etanólico obtuvo mayor formación de complejos (22-32%), por arriba de los estándares de ácido gálico y catequina. En el caso de los extractos acuosos puede deberse como se mencionó anteriormente, porque los compuestos fenólicos antioxidantes contenidos en estos extractos se encuentran en oxidación constante. La actividad del extracto etanólico fue mayor porque los fenólicos presentes en este no tienen la habilidad de ceder protones a radicales, pero si pueden formar complejos quelantes; existen reportes de flavonoles y fenoles con estas propiedades (Caneva *et al.*, 2000). Estos compuestos deberían

identificarse o cuantificarse en los extractos para ser corroborada su existencia y efecto.

La presencia de agentes reductores (antioxidantes) en los extractos de hierbas provoca la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Por tanto, el Fe^{2+} se puede controlar mediante la medición de la formación de Azul Prusia (Chung *et al.*, 2002). El poder reductor aumenta con el aumento de la concentración del extracto. Los datos revelan que todas las muestras aumentaron su capacidad de reducir cuando la concentración de los extractos se incrementó, con excepción del estándar de vainillina. El extracto acuoso de 24 h de extracción se obtuvo la mejor actividad reductora con respecto a los demás extractos acuosos y esto puede deberse a que los compuestos con actividad se encuentran poco oxidados en comparación con los extractos de 48 y 72 h de extracción. Aunque el extracto etanólico presentó actividad reductora, no fue la mejor entre estos, pero se vuelve a verificar como sucedió en el caso de la prueba de quelación de cobre, que es posible que los compuestos con esta propiedad se encuentran en menor cantidad o no se encuentran. La posibilidad de reducir Fe^{3+} se puede atribuir a la donación de hidrógeno a partir de compuestos fenólicos (Shimoda *et al.*, 1992), que también está relacionado con la presencia del agente reductor. Pero también se sabe que el número y la posición del grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos rigen su actividad antioxidante (Rice- Evans *et al.*, 1995).

En las pruebas realizadas a la línea celular HepG2, se probaron extractos acuosos de hojas de Neem en el período de floración con 24 h en extracción, ya que bajo estas condiciones se encontró la mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto. Además se igualaron las cantidades de fenólicos en el extracto acuoso y etanólico y se verificó el comportamiento sobre el cultivo celular a diferentes dosis.

No se encontró toxicidad en el cultivo celular con las concentraciones probadas de extracto etanólico y acuoso. Esto se observó en el microscopio, sin evidencias de desprendimiento celular y manteniendo a las células en crecimiento a la par de un

testigo celular que consistía en un cultivo de células HepG2 sin ningún tipo de tratamiento.

Se encontró que el extracto acuoso en la menor concentración de fenólicos (0.69%) disminuía la liberación de colesterol, mientras que las concentraciones mayores (1.37 y 3.47%) aumentaban esta. En el caso de la liberación de triacilglicéridos a diferentes concentraciones de extracto acuoso mostraron tener la misma tendencia, aumentando el día 3 de tratamiento (160-170%) y el día 6 (100-160 %) y disminuyendo en el día 5 (60-100%). Mientras que en las células tratadas con el extracto etanólico no se observó diferencia en liberación de triacilglicéridos durante los 7 días de tratamiento con las dosis de 0.69 y 1.37 % de compuestos fenólicos, mientras que la dosis de 6.87 % de fenólicos indujo una liberación mayor de 2 veces con respecto al testigo en el día 1, pero posteriormente esta disminuyó hasta emparejarse con el testigo. Por último, en el caso de la liberación de colesterol al medio por las células tratadas con el extracto etanólico, en las concentraciones 6.87% y 1.37 % de fenólicos desde el día 1 de tratamiento la liberación de colesterol aumentó hasta alcanzar 125 % de colesterol en el día 4 y después disminuir hasta el 100 % en el día 7, mientras que las células tratadas con 0.69% de compuestos fenólicos aumentó la liberación de colesterol hasta el 125 % y disminuyó a menos del 80 % en el día 7.

Para explicar este comportamiento, se puede comentar que en investigaciones realizadas por Glaber en 2002, reportó que la quercetina tiene efectos inhibidores sobre la síntesis del colesterol en HepG2. Esto se verificó con HepG2 y MCF-7 (línea celular de cáncer de mama) y 4 flavonoides (kaempferol, quercetina, narigenina y apigenina) por Kee-Tae *et al.* 2008, encontrando que, aunque si disminuían la síntesis de colesterol bajo dosis de 35 μ M de los flavonoides sobre las líneas celulares; estas variaban de acuerdo al flavonoides y línea celular, concluyendo que puede existir una variación en la síntesis de colesterol por efecto de flavonoides y esta dependía del tamaño y peso molecular de los grupos, posición y el tamaño de las cadenas en la estructura del flavonoide y del tipo de línea celular tratada. Este

trabajo, se realizó con extracto acuoso y etanólico y como pudimos observar en las cromatografías en placa fina, cada extracto contaba con cantidades diferentes de compuestos, de acuerdo a la polaridad del disolvente de extracción, en este caso, agua y etanol al 70 % por lo que se entiende por qué el diverso comportamiento en la liberación de lípidos en las líneas celulares HepG2.

Los fármacos que inhiben la síntesis del colesterol, como; la lovastatina y simvastina actúan inhibiendo a la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) reductasa, el cual cataliza la conversión de HMG-CoA a ácido mevalónico durante la síntesis del colesterol. En esta vía la HMG-CoA reductasa se regula por fosforilación /desfosforilación (Stein *et al.*, 1999). Por efecto de los flavonoides, de manera natural se sugieren dos vías; una que inicia cuando los flavonoides aumentan la fosforilación del HMG-CoA reductasa indirectamente y así se disminuye la producción de colesterol endógeno (Stein *et al.*, 1999). La segunda, los flavonoides probablemente ejercen su influencia sobre el metabolismo de esteroides uniéndose al receptor esteroideo citoplasmático debido a la hidrofobicidad de su porción aglicona, este complejo es probablemente el que interactúa con elementos reguladores esteroideos.

Además se hace notar que en el 2001 se reportó que el efecto sobre células HepG2 por diferentes concentraciones de naringenina y hesperina (Kee-Tae, 2001) promovían el aumento y disminución de la liberación de los triacilglicéridos y colesterol dependiendo de la concentración de flavonoides utilizada, debido a la reducción de las actividades de ACAT1 y ACAT2, ya que en conjunto reducen la disponibilidad de los lípidos, en particular de los ésteres de colesterol hepático, para el ensamblaje de lipoproteínas que contienen apoB, que es la apoproteína primaria de la LDL, responsable de acarrear el colesterol a los tejidos. Esto se comprobó incubando las células HepG2 con inhibidores de la ACAT; DuP128 (Jamil *et al.*, 1995) o Sandoz 58-035 (Ooyen *et al.*, 1997) y se registró el aumento de la síntesis de triacilglicéridos. Por lo tanto, es posible que la síntesis de triacilglicéridos aumentara como consecuencia de la inhibición de la esterificación del colesterol en los extractos

que se usaron para este trabajo. Para poder verificar esto, será necesario en siguientes estudios corroborar la variación en la formación de apo B y la actividad de ACAT 1 y ACAT 2 bajo la exposición de los extractos del Neem.

Al igual que en las pruebas realizadas a la línea celular HepG2, se probaron extractos acuosos de hojas de Neem en el período de floración con 24 h en extracción y se igualaron las concentraciones de fenólicos en el extracto acuoso y etanólico para probar su efecto sobre la línea celular 3T3L1 con diferentes dosis. Un primer experimento consistió en probar los extracto sobre la línea celular durante el período de diferenciación y un segundo experimento consistió en conocer el efecto de los extractos durante el crecimiento de las células 3T3L1 como fibroblastos y posteriormente el efecto que este tratamiento podría tener sobre estos fibroblastos durante la diferenciación.

En el caso de las células 3T3L1 tratadas con los extractos etanólicos y acuosos de Neem a diferentes dosis durante la diferenciación se pudo apreciar una aceleración en el crecimiento y acumulación acelerada de lípidos, sin embargo al observar la morfología de estos en las fotos de microscopía a 100x (Anexo VI.3) se puede ver que no lograron generar expansión mitótica clonal, paso esencial para completarla diferenciación terminal en adipocitos maduros que tienen como característica morfológica inclusiones lipídicas grandes y la forma completamente redonda del adipocito (Richon *et al.* 1997; Shao & Lazar 1997). Estas características se pueden apreciar generalmente a partir del día 6 de diferenciación, sin embargo bajo la mayoría de los tratamientos utilizados la diferenciación se aceleró y se observaron estas características entre los días 2 y 4 de diferenciación por lo que en los días 5 o 6 se encontraban los adipocitos se encontraban hipertróficos o simplemente ya no se visualizaban células en el cultivo lo que significaba su muerte. Sólo las células tratadas con el extracto etanólico con 1.37 % de compuestos fenólicos y las tratadas con el extracto acuoso con 0.69 % de fenólicos presentaron este tipo de morfología pero después de este día no se observaron células pegadas a la caja de cultivo lo

que significaba como se mencionó anteriormente que las células habían perecido (Gil-Loyzaga, 1997).

En el caso de las células 3T3L1 tratados con los extractos etanólicos y acuosos cuando se encontraban en crecimiento como fibroblastos y durante la diferenciación celular se observó que no hubo toxicidad en estas cuando se encontraban como fibroblastos y tampoco cuando se encontraban en la diferenciación ya que la confluencia no se vio afectada hasta que la diferenciación se encontraba entre los días 4 y 8 de diferenciación, ya que en algunos casos la confluencia de adipocitos era mayor en el testigo, sin embargo entre los días 6 y 8 esta disminuía por lo que se observaron disminuciones en las concentraciones de lípidos y de adipocitos en los últimos días de la diferenciación.

Además morfológicamente se observó que solo los tratamientos con extracto etanólico con 3.43 % de compuestos fenólicos y el extracto acuoso con 3.43 y 0.69 % de compuestos fenólicos lograron tener forma adipocitos maduros pero con muy baja confluencia, en comparación al testigo que tuvo aproximadamente un 90 % de confluencia de adipocitos maduros, esto puede explicar porque aunque en los primeros días de diferenciación en algunos casos se observó alta acumulación en las concentraciones de colesterol y triacilglicéridos, posteriormente estas disminuyeron o aumentaron según fuese el caso, debido a las pocas células que se encontraban y que podían acumular lípidos.

En el caso de experimentos sobre la línea celular 3T3L1 con compuestos fenólicos, estos se han estudiado de manera individual y se sabe que en especial los flavonoides actúan en el ciclo celular de los adipocitos. Cuando se encuentran como preadipocitos, inducen a la apoptosis por disminución del potencial de la membrana mitocondrial o inhibe la proliferación de preadipocitos a través de la inhibición de la mitosis (Kao *et al.*, 2000; Hsu & Yen, 2006). Durante la maduración de los preadipocitos, que sucede entre los días 1 y 3 de diferenciación pueden actuar en la inhibición de la expansión clonal mitótica o por inducción a la apoptosis después de

la expansión mitótica (Harmon & Harp, 2001; Yang *et al.*, 2006). Mientras se encuentran en adipogenesis entre los días 4 y 6 de diferenciación, inhiben a los reguladores transcripcionales de la adipogenesis que son requeridos para la síntesis de proteínas funcionales en los adipocitos para la movilización de grasa, la unión de proteínas a elementos reguladores de la expresión del esteroide y la inhibición de la cinasa dependiente de monofosfato de adenina (AMP) (Wu *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 2005). Cuando los adipocitos ya se encuentran maduros pueden estimular la lipólisis o apoptosis, sin embargo aún se encuentra en estudio el mecanismo por el cual esto sucede pero se sabe que en algunos casos puede deberse a que estimulan la liberación intracelular de ERO's activando rápidamente a la cinasa dependiente de AMP (Chen *et al.*, 1998; Tsuboyama *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2005). Sin embargo, en este trabajo se trabajó con extractos provenientes de etanol y agua, que permitieron atraer gran cantidad de compuestos de diversas características químicas por lo que el efecto sinérgico que estos puedan tener se vio reflejado en la acumulación de lípidos y confluencia celular. Por lo que se recomienda que en próximos estudios se observe el efecto de los extractos por expresión de los genes asociados a los factores de transcripción de la adipogenesis, la expresión del gen Sirt 1 asociado también a la adipogenesis, a la expresión de la cinasa activada por AMP, en la expresión de la proteína desacoplante UCP2 implicada en la limitación de ERO's para poder identificar que está sucediendo durante esta etapa del ciclo de vida de los adipocitos que es donde se ven la mayoría de los cambios de estas células durante la diferenciación.

V. CONCLUSIONES

La composición química proximal de las hojas del Neem varía en los períodos de floración y fructificación del árbol.

Los compuestos fenólicos y flavonoides de las ojas de Neem varían en función del período fisiológico, siendo mayor la concentración de compuestos fenólicos en el período de floración.

Los compuestos fenólicos en el extracto acuoso de hojas de Neem en el período de floración varían en su composición con respecto al tiempo de extracción

Los extractos acuoso y etanólico de las hojas del Neem en el período de floración presentaron actividad antioxidante, esta actividad varió con el tiempo de extracción

El extracto acuoso de 24 h de extracción y el extracto etanólico de las hojas del Neem a diferentes concentraciones tuvieron efecto hipolipemiante e hipolipidémico sobre la síntesis de lípidos de las líneas celulares HepG2 y 3T3L1.

El extracto acuoso de 24 h de extracción y el extracto etanólico de las hojas del Neem a diferentes concentraciones no tuvieron efecto citotóxico durante la proliferación de células HepG2, fibroblastos y preadipocitos 3T3L1.

VII. REFERENCIAS

- Aguilar, A. 1999 Plantas medicinales del sur de México. Guías prácticas México Desconocido.
- Aherne SA y O'Brien N.M., 2002 Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18:75-81.
- Akterin, S. 2008 From cholesterol to oxidative stress in Alzheimer s disease: A wide perspective on a multifactorial disease Tesis Doctoral. Karolinska Institut et Stockholm
- Aladakatti, R. H., 2001 Nazeer Ahmed, R., Ahmed, M. and Ghosewami, M. G., *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 12:69–76.
- AOAC. 2005. Official methods of analysis of the association of official agricultural chemists. 18th. Ed. William Horwitz
- Apak, R.; Güçlü, K. G.; Özyürek, M.; Karademir, S. E. 2004 Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.*, 52:7970-7981.
- Apak, R., Güçlü K., Özyürek M., Çelik S. E. 2006 Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay *Microchimica Acta* Volume 160(4):413-419
- Armitage, F.B., P.A. Joustra y B. Salem. 1980. Recursos Genéticos de Especies Arbóreas en las Zonas Áridas y Semiáridas. ONU - FAO / IBPGR. Roma, Italia.
- Aurand, L.W., Woods, A.E., Wells, M.R. 1987 Food Composition and Analysis. An AVIBook, New York.
- Awasthy, K. S., 2001 *Cytobios*, 106:151–164.
- Bangham AD & Horne RW (1962) Action of saponins on biological cell membranes. *Nature* 196:952–953.
- Berlett BS & Stadtman ER. 1997 Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 272(33):20313-6.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I. Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U. 2002 Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*) *Current Science* 82(11):1336-1345
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. 1990 Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 186:343-355.
- Brain K, Hadgraft J & Al-Shatalebi M (1990) Membrane modification in activity of plant molluscicides. *Planta Medica* 56:663.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol* 22:25-30.
- Brown MS, Goldstein JL. 1980 The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. *J Biol Chem* Vol. 255(19): 9344– 52
- Butler, Larry G. 1992 Antinutritional effects of condensed and hydrolyzable tannins. *Plant Polyphenols*, Plenum Press, New York. pp 693.
- Caballero, B., Trugo, C. L., & Finglas, P. M. 2003 TEA. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition: Second Edition*. 9: 5737 - 5755.
- Caneva g., Nuari, M.P., Salvadori, O. 2000 La biología en la restauración NEREA
- Chang TY, Chang CCY, Cheng D. 1997 Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Annu Rev Biochem*. 66:613–38
- Chattopadhyay R.R., Chattopadhyay R.N., Nandy A.K., Podder G., Maitra S.K. 1986 Antiserotonin activity of a fraction of fresh leaves of *Azadirachta indica* (Beng. Neem) *Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine* 34: 9-12.
- Chattopadhyay R.R., Chattopadhyay R.N., Nandy A.K., Podder G., Maitra S.K. 1987a Antiinflammatory activity of a fraction of fresh leaves of *Azadirachta indica* (Beng. Neem) *Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine* 35:6-8.
- Chattopadhyay R.R., Chattopadhyay R.N., Nandy A.K., Podder G. and Maitra S.K. 1987b preliminary report on antihyperglycemic effect of a fraction of fresh leaves of *Azadirachta indica* (Beng. Neem). *Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine* 35 , 29 – 35
- Chattopadhyay R.R., Sarkar S.K., Ganguly S., Banerjee R.N., Basu T.K. and Mukherjee A .1992 Hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract oagainst partacetamol induced hepatic damage in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 30 ,738-740
- Chattopadhyay R. 1993 Effect of *Azadirachta indica* leaf extract on oestrous cycle of rats. *Environment and Ecology*, 11(4):958 – 960
- Chattopadhyay R.R. 1995 Hypolipidemic activity of *Azadirachta indica* leaf extract in rats. *Proceedings of Indian National Science Academy B* 61, (4) 281-284

-
- Chattopadhyay R.R. 1997 Effect of hydroalcoholic leaf extract of *Azadirachta indica* on cardiovascular system. *General Pharmacology* (Elsevier), 28(3), 449–451
 - Chattopadhyay R.R., 1999 Possible mechanism of antihyperglycemic effect of *Azadirachta indica* leaf extract : Part V. *Journal of Ethnopharmacol* Elsevier 67, 373-376
 - Chattopadhyay RB 2004. Effect of *Azadirachta indica* leaf extract on serum lipid profile changes in normal and Streptozotocin-induced diabetic rats. *Afr.J. Biomed. Res.*, 8: 101-104.
 - Chatterjee, A. and Pakrashi, S. 1994 *The Treatise on Indian Medicinal Plants* 3:76.
 - Chen YR, Wang W, Kong AN, Tan TH. 1998 Molecular mechanisms of c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis induced by anticarcinogenic isothiocyanates. *J Biol Chem* 273:1769–75.
 - Chopra, R. N., Nayer, S. L. and Chopra, I. C. 1956 *Glossary of Indian Medicinal Plants*, CSIR, New Delhi.
 - Chung YC, Chang CT, Chao WW, Lin CF, Chau ST 2002. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NKI. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2454-2458.
 - Cody V, Middleton E, Harborne JB. 1998 *Plant flavonoids in biology and medicine. Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships*. Alan R Liss, New York
 - Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD 1994 Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutria* 14:99–129
 - Crevost, Ch. and Pételot, A. 1929 Catalogue des produits de l'Indochine (suite). *Plantes Méd. Bull. Econ. Indochine*, 32:277–367 296–299
 - Chung T, Moon S, Chang Y, Ko J, Lee Y, Cho G, Kim S, Kim J, Kim C 2004. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *The FASEB J.* 18: 1670-1681.
 - Craig J.W. 1999 Health-promoting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr* 70:491S–9S
 - Daniel, M. 2006 *Medicinal plants; chemistry and properties*. Science Publishers, Inc.
 - Decker EA, Welch B 1990 Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.* 38: 674-677.
 - Despande, V. Y., Mendulkar, K. N. and Sadre, N. L., 1980 *J. Postgrad.ed. (Bombay)*, 26:167–170.
 - Dhar, R.; Dawar, H.; Garg, S.; Basir, S. F.; Talwar, G. P. 1996 Effect of Volatiles from Neem and Other Natural Products on Gonotrophic Cycle and Oviposition of *Anopheles stephensi* and *An. culicifacies* (Diptera: Culicidae) 33(2):195-201
 - Díaz Puentes, L.N. 2009 Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2):32-55
 - Donovan, J.L., Manach, C., Faulks, R.M., Kroon, P.A. 2006. Chapter 8. Absorption and metabolism of Dietary Plant Secondary Metabolites. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing
 - Dubois M, Giles K, Hamilton JK, Rebes PA, Smith F. 1956 Colorimetric method for determination of sugars and relates substances. *Anal Chem*; 28:350-356
 - Dunkel, F. V., A. Serugendo, W. M. Breene, and S. Sriharan. 1995. Influence of insecticidal plant materials used during storage on sensory attributes and instrumental hardness of dry edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Foods for Human Nutr.* 48: 1-16.
 - Dvorkin, M. A.; Cardinali, D. P.; Lermoli, R. 2010. *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*. Best & Taylor. Edición 14
 - Elson CE, Underbakke GL, Hanson P, Shrago E, Wainberg RH, Qureshi AA. 1989 Impact of lemongrass oil, an essential oil, on serum cholesterol. *Lipids*; 24:677–9
 - Ferreres, F., Pereira, D. M., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Sottomayor, M. 2008. New phenolic compounds and antioxidant potential of *Catharanthus roseus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:9967–9974.
 - Folin, O. & Ciocalteu, J. 1927. *J. Biol. Chem.* 73:627.
 - Gadoth, N.; Göbel, H. H., 2011, *Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice Humana Press*
 - Glaber, G.; Graefe, E.U.; Struck, F.; Veit, M.; Gebhardt, R. 2002 Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology* 9(1):33-40.
 - García, D.E.; Medina, M.G.; Domínguez, C.; Baldizán, A.; Humbría, J.; Cova, L. 2006 Evaluación química de especies no leguminosas con potencial forrajero en el estado Trujillo, Venezuela. *Zoot. Trop.* 24(4): 401-415.
-

-
- García-Nieto, Leonor P. 2000 Las plantas medicinales y aromáticas Una alternativa de futuro para el desarrollo rural. Boletín Económico de Información Comercial Española N° 2652 Secretaria de Estado de Comercio Ministerios de Industria, Turismo y Comercio Gobierno de España.
 - Gil-Loyzaga Pablo 1997 Cultivo de Células y Tejidos Animales. Teoría y Prácticas. *Centro de Cultivos Celulares (C.A.I.-U.C.M.)*
 - Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J y Swies J 1987: On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol*, 36:317-322.
 - Gent J, Braakam I. 2004 Low-density lipoprotein receptor structure and folding. *Cell Mol Life Sci* 61:2461– 70.
 - Girish, K., Shankara Bhat, S. 2008 Neem- A Green Treasure *Electronic Journal of Biology*, 2008, 4(3):102-111
 - Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. 1983 Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* 98:241–60.
 - Gracia Nava Manuel Alejandro. 2007 Noveno Verano de la Ciencia de la Región Centro Memorias del Programa Verano de la Ciencia. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.
 - Harmon A, Harp J. 2001 Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol*; 280:C807–13.
 - Herrera C., Bolaños, N. Lutz G. 2003 Carbohidratos identificación de azúcares por cromatografía en placa Química de los alimentos, Manual de laboratorio Universidad de Costa Rica pp4
 - Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O., Kondo K 2001, Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Internal Medicine I, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan. J Nutr Sci Vitaminol*, 47:357-362.
 - Hsu CL, Huang SL, Yen GC. 2006 Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 54:4191–7.
 - Hu M, Konoki K & Tachibana K 1996. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. *Biochimica et Biophysica Acta – Lipid Metabolism* 1299:252–258.
 - Hung, Y.; Hong, M.; Huang, S. 2006. Cholesterol loading augments oxidative stress in macrophages *FEBS Letters* 580(3):849-861
 - Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Baik HW, Ha, J., Park, O.J.. 2005 Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 694–9.
 - Ibrahim, I. A., Khalid, S. A., Omer, S. A. and Adam, S. E., 1992 *J.Ethnopharmacol.*, 35, 267–273.
 - Imai K, Nakachi K. 1995 Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *BMJ*; 310:693–6
 - Ishikawa T, Suzukawa M, Ito T, Yoshida H, Ayaori M, Nishiwaki M, Yonemura A, Hara Y, Nakamura H. 1997 Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am J Clin Nutr*; 66:261–6
 - Jacobson, M., 1995, in *The Neem Tree: Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes* (ed. Schmutterer, H.), pp. 484–495.
 - Jamil, H., J. K. Dickson, Jr., C. Chu, M. W. Lago, J. K. Rinehart, S. A. Biller, R. E. Gregg, and J. R. Wetterau. 1995. Microsomal triglyceride transfer protein: specificity of lipid binding and transport. *J. Biol. Chem.* 270: 6549–6554.
 - Javitt N. B. 1990 Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *The FASEB Journal* 4: 161-168.
 - Kahn BB 1996 Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* 45:1644–1654
 - Kanungo, D., 1996, in *Neem* (eds Randhawa and Parmar, B. S.), 2nd edn, 77–110.
 - Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. 2000 Modulation of obesity by a green tea catechin. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1232–4.
 - Kasutri, M., Ahmed, R. N., Pathan, K. M., Shaikh, P. D. and Manivannan, B., 1997 *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 41, 234–240.
 - Kee-Tae Kim, Sang-Goo Cho, Ye-Sun Han, Seung-Yeol Nah, Hyun-Dong Paik, Eun-Ju Yeo, Sun-Hee Moon Inhibitory Effects of Naringenin, Kaempferol, and Apigenin on Cholesterol Biosynthesis in HepG2 and MCF-7 Cells *Food Science and Biotechnology* 2008 ; 17(6): 1361-1364
 - Kellner-Weibel G, McHendry-Rinde B, Page Haynes M, Aldelman S. 2001 Evidence that newly synthesized esterified cholesterol is deposited in existing cytoplasmic lipid inclusions. *J Lipid Res.* 42:768– 77.
 - Khatun, S., Chatterjee N. C., Cakilcioglu, U. 2011 Antioxidant activity of the medicinal plant *Coleus forskohlii* Brij. *African Journal of Biotechnology*, 10 (13): 2530-2535
-

-
- Kirtikar, K. R. and Basu, B. D. 1931 Indian Medicinal Plants, Lalitha Mohan Basu, Allahabad, 2nd edición, p. 536
 - Kleijnen J, Knipschild P, ter Riet GT. 1989 Garlic, onions and cardiovascular risk factors. A review of the evidence from human experiments with emphasis on commercially available preparations. *Br J Clin Pharmacol*; 28:535–44.
 - Kono S, Shinchi K, Ikeda N, Yanai F, Imanishi K. 1992 Green tea consumption and serum lipid profiles: a cross-sectional study in northern Kyushu, Japan. *Prev Med*; 21:526–31.
 - Pearson D; 1993 Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos; Acirbia, S.A. Zaragoza (España)
 - Kono S, Shinchi K, Wakabayashi K, Honjo S, Todoroki I, Sakurai Y, Imanishi K, Nishikawa H, Ogawa S, Katsurada M. 1996 Relation of green tea consumption to serum lipids and lipoproteins in Japanese men. *J Epidemiol*; 6:128–33.
 - Koul, O., Isman, M. B. and Ketkar, C. M., 1990 *Can. Journal of Botanical* 68,1–11
 - Krieger M. 1998 The best of cholesterol, the worst of cholesterol: a tale of two receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95:4077– 80.
 - Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Hoult JR. 1989 Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolic quercetin, gossypol and myricetin. Effect on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation, and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol* 38:2859-286.
 - Leos, M.J., R.P. Salazar S. 2002 The insecticide Neem tree *Azadirachta indica* A. Juss in México. Universidad Autónoma de Nuevo León. Agronomy Faculty. Tech. Brochure 3. Marín, N.L. México
 - Li, Z.; Wu, J.; DeLeo, C. J. 2006 RNA damage and surveillance under oxidative stress *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 58(10):581–588
 - Lindström J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M, Aunola S, Eriksson JG, Hemiö K, Hämäläinen H, Härkönen P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Mannelin M, Paturi M, Sundvall J, Valle TT, Uusitupa M, Tuomilehto J; Finnish Diabetes Prevention Study Group. 2006 Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet*; 368:1673-1679.
 - Lozoya, X. 1994 Two decades of Mexican ethnobotany and research on plant derived drugs. *Ethnobotany and the search for New Drugs*. Ciba Foundation symposium 185. Wiley, New York.
 - Marcano D., Hasegawa M. 2002 Fitoquímica orgánica Aislamiento e identificación. *Compuestos aromáticos*. Fitoquímica Organica. Universidad de Venezuela
 - Martínez-Flores S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón, MJ: 2002 Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*. 12:135-142.
 - Martínez- Valverde, I. Periago, M.J., Ros, G. 2000 Significado nutricional de los Compuestos fenólicos de la dieta. *50(1):5-18*.
 - Mayes, P. 1997 Capítulo 16 Lípidos de importancia fisiológica. *Bioquímica de Harper*. Murray, R.K., Granner, D.K., Rodwell, V.W. Manual Moderno. Edición 16.
 - Mitra, C. R. 1963 Neem Indian Central Oil seeds Committee, Patel M. S. Hyderabad, 69–94.
 - Moreno, M.I. 1996 The Neem tree *Azadirachta indica* A. Juss in the Southern Sonora, México. Tech. Rpt. Yaqui Valley Experimental Field-INIFAP. Ciudad Obregón, Sonora, México.
 - MORENO ALIAGA & MATSUMURA. 1999 Endrin inhibits adipocyte differentiation by selectively altering expression pattern of CCAAT/enhancer binding protein-a in 3T3-L1 cells. *Mol Pharmacol*; 56: 91-101.
 - Muzquiz M., Rey C., Cuadrado C. 1992 Effect of germination on the oligosaccharide content of lupin species. *J. Chrom.*, 607: 349-352
 - Nielsen, S.S. 2003. *Food Analysis*. Birkhäuser Volumen 1
 - Nollet, L. M. L 1996 *Handbook of Food Analysis*; M. Dekker, Nueva York
 - Oakenfull DG 1986 Aggregation of bile acids and saponins in aqueous solution. *Australian Journal of Chemistry* 39:1671–1683
 - Oakenfull DG & Sidhu GS 1990 Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolemia. *European Journal of Clinical Nutrition* 44, 79–88.
 - Ooyen, C., A. Zecca, T. Zanelli, and A. L. Catapano. 1997. Decreased intracellular degradation and increased secretion of apoB-100 in HepG2 cells after inhibition of cholesteryl ester synthesis *Atherosclerosis*. 130: 143–152.
 - Palmer, M. 2008 *Metabolism Lecture Notes*. Department of Chemistry. University of Waterloo, Canada. 3rd edition.
 - Pallardo, L. 2010 *Endocrinología clínica* Ediciones Díaz de Santos 2da Edición.
 - Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53(8):3101–3113.
 - Report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *Arch Intern Med*. 148:36-69.
-

-
- Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley and J.B. Pridham, 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.*, 22: 375-383.
 - Richon V.M., Lyle RE., McGehee R.E. 1997 Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3L1 adipocyte differentiation *J.Biol Chem* 272:10117-10124
 - Ros, E. 2006 Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática *Rev Esp Cardiol.* 6(Supl G):52-62.
 - Ryan, D., Prenzler, P.D., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K., 2003. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2532–2538
 - Saskia ABE, van Accker y Bast AALT, 1998 Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. En: *Flavonoids in health and Disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York, 9:221-251
 - Schultz J.,J.;Harris, A. K.; Rychly, D. J ; Ergul, A. 2005 Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol.* 4: 5.
 - Seeman P, Cheng D & Iles GH (1973) Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *Journal of Cell Biology* 56: 519–527.
 - Shao D., Lazar M.A. 1997 Peroxisome proliferator activated receptor γ CCAAT7enhancer-binding protein α , and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation *J.Biol Chem* 272:21473-21478
 - Sharma RD, Raghuram TC. 1990 Hypoglycaemic effect of fenugreek seeds in non-insulin dependent diabetic subjects. *Nutr Res*; 10:731–9.
 - Sharma RD, Raghuram TC, Rao VD. 1991 Hypolipidaemic effect of fenugreek seeds. A clinical study. *Phytotherapy Res*; 5:145–7.
 - Siddiqui, S. 1942 *Currency. Science.* 11: 278–279.
 - Singh, S. D., Junnarkar, A. Y., Reddi, G. S. and Singh, K. V., *Fitoterapia*, 1987, 58, 235–238.
 - Soccio RE, Breslow JL. 2004 Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1150– 60
 - Sultana, B.; Anwar, F., Przybylski Roman 2007 Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. *Trees Food Chemistry*, 104(3):1106-1114
 - Thakur, R. S., Singh, S. B. and Goswami, A. 1981 *Curr. Res. Med.Aromat. Plants*, 3:135–140
 - Tabas I, Krieger M. 1990 Lipoprotein receptors and cellular cholesterol metabolism in health and disease. In: Chien KR, editor. *Molecular basis of heart disease*. New York, USA W.B. Saunders Co.; p. 428– 57.
 - Tabas I. 1997 Free cholesterol induced cytotoxicity. A possible contributing factor to macrophage foam cell necrosis in advanced atherosclerotic lesions. *Trends Cardiovasc Med* 7:256 – 63.
 - Tabas I. 2002 Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 11:905– 11.
 - Terao J, Yamaguchi S, Shirai M, Miyoshi M, Moon JH, Oshima S, Inakuma T, Tsushida T, Kato Y., 2001 Protection by quercetin and quercetin 3-O-beta-D-glucuronide of peroxynitrite-induced antioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein. *Free Radic Res*, 35:925-931.
 - Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama H, Kasai M, Ikemoto S, Ezaki O. 2000 Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49:1534–42.
 - Turrens, J.F. 2003 Mitochondrial formation of reactive oxygen species *J Physiol*, 552(2):335–344
 - Ursini F, Maiorino M, Morazzoni P, Roveri A, Pifferi G. 1994 A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Rad Biol Med*, 16:547-553
 - Wafaa A. Helmy, Howaida I. Abd-Alla, Hassan Amer and El-Safty, M.M. 2007. Chemical Composition and 'In vitro' Antiviral Activity of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) Leaves and Fruits Against Newcastle Disease Virus and infectious Bursal Disease Virus . *Aus. J. of Basic and Applied Sci.*, 1(4): 801-812.
 - Wagner H &Bladt S. 2001 *Plant Drug Analysis. A thin Layer Chromatography Atlas.* 2nd Edition Springer
 - Warshafsky S, Kramer RS, Sivak SL. 1993 Effect of garlic on total serum cholesterol: a meta-analysis. *Ann Intern Med*; 119:599–605.
 - Welsch, U.,Sobotta, J. 2009 *Histología Ed. Médica Panamericana*
 - Wilcox M., Chamberlain J. 2004 Chapter 6: Neem (*Azadirachta indica*) *Tradicional Medicinal Plants and Malaria* 4 th edition
-

-
- Wiseman H. & Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 1996 313(1): 17–29.
 - Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. 1996 Induction of peroxisome proliferator activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol*;16:4128–36.
 - Yan-Hwa C, Hsia-Fen H, Chao-Lin C (2000) Flavonoids content of several vegetables and their antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.* 80: 561-566
 - Yang JY, Della-Fera MA, Hartzell DL, Nelson-Dooley C, Hausman DB, Baile CA. 2006 Esculetin induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Obes Res*;14:1691–9.
 - Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64:555–559.

URL´s

1. http://www.educared.org/wikiEducared/Imagen:Membrana_con_elementos.jpg.html
2. <http://colsto.blogia.com/2007/041601-3-...-una-estructura-unica-....el-mosaico-fluido.php>
3. <http://todoplantas.blogspot.com/2010/02/arbol-de-neem-o-nim.html>
4. <http://malaria.ws/neem-azadirachta-indica/>
5. <http://flickrhivemind.net/Tags/neem/Interesting>

ANEXOS

Anexo 1. Descripción de la especie

Forma biológica

Árbol desde 15 hasta 20 m de altura (Figura 9a) (Rodríguez & Rodríguez, 1994).

Fenología

Hojas: perennifolia, solamente pierde sus hojas en condiciones muy extremas (Rodríguez & Rodríguez, 1994).

Flores: florece de abril a mayo, aunque varía según la sequía del sitio (Figura 9b) (Chavarría & Reyes, 1978).

Frutos: fructifica desde mayo y se prolonga hasta agosto (Figura 9c) (Chavarría & Reyes, 1978).

Distribución en México.

Asociación vegetal

En México esta especie es cultivada. En su lugar de origen se le encuentra en el bosque tropical caducifolio y bosque tropical subcaducifolio; también se le puede encontrar en zonas áridas (Chavarría & Reyes, 1978).

Requerimientos Ambientales

Altitud (msnm)

Media: en México se han adaptado a 660 (Rodríguez & Rodríguez, 1994). **Mínima:** 50 (Chavarría & Reyes, 1978, Von Carlowitz *et al.*, 1991)

Máxima: 1,500 (Chavarría & Reyes, 1978, Von Carlowitz *et al.*, 1991).

Suelo

Clasificación (FAO) Luvisol (Von Carlowitz *et al.*, 1991).

Características físicas

Profundidad: de profundos) a poco profundo (Rodríguez & Rodríguez, 1994).

Textura: arcillosa, limosa, franco-arcillo–arenoso (Chavarría & Reyes, 1978).

Pedregosidad: pedregosos (Méndez, 1993).

Drenaje: bien drenados (Rodríguez & Rodríguez, 1994).

Humedad aparente:

Gravas: alto contenido de grava (Méndez, 1993).

Características químicas

pH: 5 - 6.2 (Chavarría & Reyes, 1978, 5); en México 5 - 5.5 (Rodríguez & Rodríguez, 1994).

Fertilidad: baja (Rodríguez & Rodríguez, 1994). Esta especie no es muy exigente en lo referente al tipo de suelo, con excepción a los suelos anegados y con arenas secas profundas. El sistema radicular es capaz de extraer nutrientes y humedad en suelos muy lavados (Chavarría & Reyes, 1978). Es tolerante a la salinidad (Rodríguez & Rodríguez, 1994).

Temperatura (°C)

Media: 22 a 29 (Von Carlowitz *et al.*, 1991); en México 18 a 22 (Rodríguez & Rodríguez, 1994).

Mínima: 9 a 24 (Von Carlowitz *et al.*, 1991);

Máxima: 26 a 36 (Von Carlowitz *et al.*, 1991); 40 (Chavarría y Reyes, 1978).

Precipitación (mm)

Media: 1,600 a 2,000 en México (Rodríguez & Rodríguez, 1994).

Mínima: 450 (Chavarría & Reyes, 1978).

Máxima: 1,500 (Chavarría & Reyes, 1978).

Puede soportar déficit hídrico hasta 8 meses (Armitage *et al.*, 1980), es susceptible a las heladas pero sólo en etapas juveniles (Rodríguez & Rodríguez, 1994).

Anexo 2 Reveladores de cromatografía en placa fina

2.1 Revelador de carbohidratos

Se disuelve 1 mL de p-anisaldehído y 1 mL de ácido sulfúrico 97% en 18 mL de etanol absoluto. La placa después de ser asperjada por el revelador se incuba a 110°C para revelar las manchas.

2.2 Revelador de fenólicos

Se disuelve 0.5 mL de p-anisaldehído y 1 mL de ácido sulfúrico 97% en 50 mL de ácido acético glacial. La placa después de ser asperjada por el revelador se incuba a 110°C para revelar las manchas.

2.3 Revelador de flavonoides

Se prepara una solución de 1% de AlCl_3 en etanol 70%, para visualizar las manchas de flavonoides se requiere una lámpara UV a 360 nm.