



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAestrÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

T E S I S

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTI-OBESIDAD Y
HEPATOPROTECTOR DE LOS EXTRACTOS
FENÓLICOS DE *COSMOS BIPINNATUS* CAV. MEDIDOS
EN RATAS WISTAR OBESAS”

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
Q.F.B. LUCÍA DOMÍNGUEZ RAMOS

DIRECTOR DE TESIS:
DR. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES

MORELIA, MICHOACÁN, JUNIO DE 2023.

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a toda mi familia que son mi fortaleza y riqueza más grande. En especial, a mi mamá que siempre está conmigo y a mi papá que estoy segura siempre me apoya.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceras muestras de agradecimiento:

- A Dios, por la vida y porque jamás me abandonó aún en las situaciones más difíciles del camino.
- A mis padres y hermanos, que con su amor y valores me enseñaron a cumplir sueños y metas.
- Al Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, por su apoyo y disposición a lo largo de la realización de este proyecto.
- A los Doctores: Rafael Salgado Garciglia, Martha Estrella García Pérez, Ma. Guadalupe Garnica Romo y Eréndira Valencia Avilés, por formar parte de mi comité sinodal, así como por todos sus consejos y aportaciones en este proyecto.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio de investigación y desarrollo de alimentos, por su ayuda y compañía brindada.
- A mis amigas Yara, Cindy, Esme y Yaz, que siempre me escuchaban y alentaban por difícil que fuera la situación e incluso que me ayudaron en la realización de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Causas principales de mortalidad a nivel mundial	3
2.1.1 Causas principales de mortalidad en México	3
2.1.1.1 Obesidad en México	3
2.2 Relación entre obesidad, inflamación y estrés oxidativo	4
2.3 Alternativas de combate contra la obesidad	6
2.3.1 Uso de extractos de plantas para la estimulación de marcadores antiinflamatorios y anti obesogénicos	6
2.4 <i>Cosmos bipinnatus</i>	7
2.4.1. Usos y aplicaciones	8
2.4.2 Composición química de <i>Cosmos bipinnatus</i>	9
2.4.3 Género <i>Cosmos</i> y sus propiedades antioxidantes	10
2.4.3.1 Métodos antioxidantes	11
2.5 Compuestos fenólicos (CF)	13
2.5.1 Ruta de biosíntesis de los CF	13
2.5.2 Clasificación	14
2.5.2.1 Flavonoides	14
2.5.2.2 No flavonoides	16
2.6 Métodos de extracción	17
2.6.1 Maceración	18
2.6.2 Extracción asistida por ultrasonido	19
3. Justificación	20
4. Hipótesis	21
5. Objetivos	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos	22
6. Estrategia experimental	23
6.1 Obtención y caracterización del extracto	23
6.2 Modelo biológico	24
7. Material y métodos	24
7.1 Reactivos	24
7.2 Equipos	25
7.3 Recolección de la planta	26

7.4	Identificación de la planta	26
7.5	Secado, triturado y tamizado	27
7.6	Determinación de humedad	27
7.7	Extracciones	28
7.7.1	Maceración	29
7.7.2	Ultrasonido	29
7.8	Porcentaje de rendimiento	30
7.9	Determinación de polifenoles totales	30
7.10	Determinación de flavonoides totales	32
7.11	Caracterización del extracto mediante HPLC	33
7.12	Métodos para determinar capacidad antioxidante	34
7.12.1	Radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).....	34
7.12.2	Radical ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- ácido sulfónico-2NH ₄).....	35
7.12.3	Peróxido de hidrógeno.....	37
7.13	Animales de experimentación	38
7.13.1	Inducción de obesidad	39
7.13.2	Evaluación del efecto antiinflamatorio y antiobesogenico del extracto fenólico de <i>Cosmos bipinnatus</i> Cav. administrado por vía oral a Ratas Wistar.....	40
7.13.3	Sacrificio y obtención de muestras biológicas	40
7.13.4	Determinación de perfil lipídico y hepático de los sueros de las ratas Wistar	41
8.	Resultados y discusión.....	41
8.1	Determinación de humedad.....	41
8.2	Porcentaje de rendimiento	41
8.3	Contenido de polifenoles totales	43
8.4	Contenido de flavonoides totales	44
8.5	Caracterización química del extracto	45
8.6	Capacidad antioxidante	47
8.6.1	Radical DPPH.....	47
8.6.2	Radical ABTS.....	48
8.6.3	Peróxido de hidrógeno.....	48
8.7	Determinación de obesidad	49
8.8	Determinación de glucosa	50
8.9	Perfil lipídico.....	51
8.10	Perfil hepático	52
8.11	Peso de órganos.....	53
9.	Conclusiones.....	55
10.	Referencias.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre la expansión del tejido adiposo y el estado proinflamatorio. (Barroso, 2019)	5
Figura 2. <i>Cosmos bipinnatus</i> Cav.	7
Figura 3. Estructura de DPPH antes y después de la reacción con un antioxidante.	12
Figura 4. Biosíntesis de los compuestos fenólicos.....	14
Figura 5. Estructura general de los flavonoides.....	15
Figura 6. Estructura química de la quercetina.	15
Figura 7. Estructura química de algunos ácidos fenólicos.....	17
Figura 8. Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido. (Salazar y col. 2010).....	19
Figura 9. Estrategia experimental para la obtención y caracterización del extracto.....	23
Figura 10. Estrategia experimental usada con el modelo biológico.	24
Figura 11. Sitio de recolección de <i>Cosmos bipinnatus</i>	26
Figura 12. Ejemplar <i>Cosmos bipinnatus</i> Cav en el EBUM.	27
Figura 13. Transformación que sufrió <i>Cosmos bipinnatus</i> . a) Secado, b) Triturado c) Tamizado.	27
Figura 14. Estufa con muestras para determinación de humedad.....	28
Figura 15. Maceración en termobañó a 25 °C.	29
Figura 16. Extracción de <i>Cosmos bipinnatus</i> asistida con ultrasonido.....	30
Figura 17. Extractos llevados a sequedad para determinación de porcentaje de rendimiento.....	30
Figura 18. Reacción colorimétrica de ácido gálico a diferentes concentraciones.	31
Figura 19. Reacción colorimétrica de quercetina a diferentes concentraciones.	33
Figura 20. Cromatograma de los estándares de referencia.	34
Figura 21. Inhibición del radical DPPH.....	35
Figura 22. Inhibición del radical ABTS.....	37
Figura 23. Inhibición del peróxido de hidrógeno.....	37
Figura 24. Grupo A en tiempo de adaptación.	38
Figura 25. Disposición de las ratas en jaulas individuales.....	39
Figura 26. Información nutricional de la manteca de cerdo empleada en la dieta (Tomada de The FatSeceret Platform API).....	40
Figura 28. Comparación del porcentaje de rendimiento.....	42

Figura 29. Contenido de fenoles totales.....	44
Figura 30. Contenido de Flavonoides totales.....	45
Figura 31. Cromatograma del ácido 4-hidroxibenzoico a 255nm	46
Figura 32. Cromatograma de los ácidos clorogénico y cafeico a 322nm.	46
Figura 33. Cromatograma de la quercetina a 370 nm.....	47
Figura 34. Capacidad de inhibición al radical DPPH.	47
Figura 35. Capacidad de inhibición al radical ABTS.	48
Figura 36. % scavenging del H ₂ O ₂	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Cosmos bipinnatus</i>	8
Tabla 2. Especies del género <i>Cosmos</i> (familia Asteracea) con propiedades antioxidantes.....	10
Tabla 3. Diferentes condiciones de extracción para <i>Cosmos bipinnatus</i>	28
Tabla 4. Curva de calibración de ácido gálico.....	31
Tabla 5. Preparación de la muestra para medir polifenoles totales.....	32
Tabla 6. Curva de calibración de quercetina.....	32
Tabla 7. Gradiente de elución utilizado en HPLC.....	33
Tabla 8. Tratamiento de la muestra para DPPH.....	35
Tabla 9. Curva de calibración de Trolox.....	36
Tabla 10. Tratamiento de la muestra para ABTS.....	36
Tabla 11. Información nutrimental de los nutricubos de purina.....	39
Tabla 12. Rendimiento de diferentes extractos de <i>Cosmos bipinnatus</i> cav.....	42
Tabla 13. Contenido de polifenoles totales para los diferentes extractos de <i>Cosmos bipinnatus</i> ..	43
Tabla 14. Contenido de flavonoides con diferentes condiciones de extracción.....	44
Tabla 15. Composición fenólica de dos extractos etanólicos de <i>Cosmos bipinnatus</i> Cav.....	45
Tabla 16. Capacidad antioxidante de extractos obtenidos por diferente método.....	49
Tabla 17. Índice de Lee para determinación de obesidad.....	50
Tabla 18. Determinación de glucosa en los cuatro grupos de ratas con diferentes tratamientos...	51
Tabla 19. Determinación de perfil lipídico en suero e hígado en ratas Wistar al final de 4 semanas de tratamiento.....	52
Tabla 20. Valores de perfil hepático realizado después de 4 semanas de tratamiento de ratas Wistar.....	53
Tabla 21. Peso de algunos órganos de ratas Wistar después de 4 semanas de tratamiento.....	54

RESUMEN

En 2016, en el mundo más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tuvieron sobrepeso y en México cerca del 72.5% de la población adulta tiene sobrepeso u obesidad. La obesidad es un estado crónico de inflamación, la cual puede ser desencadenada por un estrés oxidativo que está definido como el desbalance de radicales libres y sustancias antioxidantes en el organismo a favor de los primeros. Existen estudios que sugieren que *Cosmos bipinnatus* tiene una actividad antioxidante significativa y un efecto protector contra el daño oxidativo del ADN. En este trabajo se determinó el método de extracción con mayor eficiencia para esta especie, probando maceración y ultrasonido a dos temperaturas (25 y 60 °C) con diferentes concentraciones de solvente (EtOH 70% y EtOH 50%), así como también la cuantificación de fenoles totales (FT), flavonoides totales y la capacidad antioxidante del extracto de *Cosmos bipinnatus* aplicando los métodos espectrofotométricos (ABTS, DPPH y peróxido de hidrógeno). Para probar la actividad antioxidante y el efecto causado en algunos biomarcadores, se indujo obesidad en ratas Wistar, para posteriormente administrar el extracto y evaluar su efecto. Se sacrificaron las ratas y se tomaron muestra de suero para realizar una determinación de perfil lipídico y hepático, así como se pesaron algunos órganos y la grasa visceral para observar las diferencias entre los grupos tratados con el extracto y los tratados con agua y quercetina. La concentración de 200 mg/kg de extracto de *Cosmos bipinnatus* Cav. disminuyó la ganancia de peso y el alimento consumido por las ratas, así como también logró reducir los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos. No se observaron efectos tóxicos adversos detectables en el perfil hepático realizado al finalizar el tratamiento.

Palabras clave: *Cosmos bipinnatus*, capacidad antioxidante, ultrasonido, dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

In 2016, more than 1.9 billion adults aged 18 or over in the world were overweight and in Mexico about 72.5% of the adult population is overweight or obese. Obesity is a chronic state of inflammation, which can be triggered by oxidative stress, which is defined as the imbalance of free radicals and antioxidant substances in the body in favor of the former. Recent investigations suggest that *Cosmos bipinnatus* has significant antioxidant activity and a protective effect against oxidative DNA damage. In this work, the most efficient extraction method for this species was determined, considering conventional maceration and ultrasound-assisted extraction at two temperatures (25 and 60 °C) with two different solvents (70% EtOH and 50% EtOH). Furthermore, the quantification of total phenols (FT), total flavonoids and the antioxidant capacity of the *Cosmos bipinnatus* extract applying the spectrophotometric methods (ABTS, DPPH and hydrogen peroxide) was performed. To test the antioxidant activity and the antiobesogenic effect, obesity was induced in Wistar rats, to examine the impact of the extract in this process. The day of sacrifice, the lipid and liver profile of the serum samples were determined. The weight of organs and visceral fat were examined to observe the differences between the groups treated with the extract and those treated with water and quercetin as a positive control. The concentration of 200 mg/kg of extract of *Cosmos bipinnatus* Cav. decreased weight gain and food consumed by rats, being also able to reduce glucose, cholesterol, and triglyceride levels. No detectable adverse toxic effects were observed in the liver profile at the end of treatment.

Keywords: *Cosmos bipinnatus*, antioxidant capacity, ultrasound, hyperlipid diet.

1. Introducción

El exceso de peso corporal constituye el sexto factor principal de riesgo de defunción en el mundo. Cada año fallecen alrededor 3.4 millones de personas adultas a consecuencia del sobrepeso o la obesidad. Además, el 44 % de la carga de diabetes, el 23 % de la carga de cardiopatías isquémicas y entre el 7% y el 41 % de la carga de algunos cánceres son atribuibles al sobrepeso y la obesidad (Dávila y col., 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Un IMC elevado es un importante factor de riesgo de enfermedades no transmisibles, como: las cardiovasculares, que fueron la principal causa de muertes en 2012; la diabetes, los trastornos del aparato locomotor y algunos cánceres (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon). El riesgo de contraer estas enfermedades no transmisibles crece con el aumento del IMC (OMS, 2016).

Existen muchos factores que originan obesidad como lo es la susceptibilidad genética, los estilos de vida y las características del entorno; de manera indirecta influyen otros factores, como la globalización, la cultura, la condición económica, la educación, la urbanización y el entorno político y social. En este fenómeno, tiene un papel predominante tanto el comportamiento individual, como el entorno familiar, comunitario y el ambiente social. La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las gastadas. En el mundo, prevalece un aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos que son ricos en grasa, sal y azúcares, pero reducido en vitaminas, minerales y otros micronutrientes, así como la disminución en la actividad física, como resultado de la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, de los nuevos modos de desplazamiento y de una creciente urbanización.

A lo largo del tiempo se ha buscado prevenir y solucionar esta problemática; la actividad física, la modificación de la dieta, los fármacos y la cirugía son las recomendaciones y estrategias comunes para disminuir la incidencia de obesidad. Aunque en EUA se aprobaron medicamentos para el tratamiento de la obesidad como el orlistat® y la lorcaserina®, los efectos secundarios y la baja tasa de éxito de los medicamentos para la obesidad han hecho que la industria farmacéutica y de consumo busque soluciones alternativas a partir de compuestos naturales (Tung y col., 2017).

La OMS define una planta medicinal como cualquier especie vegetal silvestre o cultivada que contiene sustancias capaces de ser empleadas para propósitos curativos y cuyos principios activos pueden servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Una amplia diversidad de plantas es en gran medida apreciadas por su potencial terapéutico atribuido a los componentes fitoquímicos bioactivos. Por esta razón los componentes bioactivos han cobrado relevancia en los últimos años, debido a los beneficios que generan a la salud humana, algunos previniendo enfermedades crónico-degenerativas, así como aliviando los síntomas que estas producen (Drago y col., 2006). Las especies vegetales pueden contener compuestos bioactivos, como: compuestos fenólicos, azufrados, fitoesteroles, terpenos, carotenoides e isoflavonas. En el mundo existen entre 310,000 y 422,000 especies de plantas, de las cuales 20,000 poseen propiedades de interés para investigar y descubrir compuestos que permitan elaborar nuevos fármacos; pese a esto, menos del 10% de las plantas han sido evaluadas en la búsqueda de actividad biológica (Juarez y col., 2009).

Una gran cantidad de especies vegetales contienen compuestos fenólicos a los cuales se les atribuyen muchas propiedades como son las antioxidantes, antiinflamatorias, antígenotóxicas, antimicrobianas, entre otras. Existen artículos científicos que sustentan el contenido de algunos compuestos fenólicos en especies del género *Cosmos* (familia Asteraceae) y por lo tanto también se comprueban algunas de las propiedades que el contenido de estos compuestos les confiere. En el presente trabajo se probó la actividad antiinflamatoria y antiobesogénica del extracto fenólico de *Cosmos bipinnatus* determinando el efecto causado en marcadores propios de la inflamación y obesidad en ratas Wistar obesas.

2. Antecedentes

2.1 Causas principales de mortalidad a nivel mundial

Las causas principales de defunción en el mundo, con arreglo al número total de vidas perdidas, se atribuyen a tres grandes cuestiones: las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades respiratorias y las afecciones neonatales.

La principal causa de muerte en el mundo es la cardiopatía isquémica, responsable del 16% del total de muertes en el mundo. Desde el año 2000, el mayor aumento de muertes corresponde a esta enfermedad, que ha pasado de más de 2 millones de defunciones en 2000 a 8,9 millones en 2019 (OMS, 2020). La cardiopatía isquémica es una enfermedad que se puede prevenir de forma significativa si se conocen y controlan sus factores de riesgo cardiovascular. Los principales factores que la producen son: Edad avanzada, aumento de las cifras de colesterol total, sobre todo del LDL, tabaquismo, disminución de los valores de colesterol HDL, hipertensión arterial, obesidad, sedentarismo.

2.1.1 Causas principales de mortalidad en México

En México existen diversas enfermedades que se encuentran entre las principales causas de muerte, por lo que es importante conocer los factores de riesgo para tratar de enmendar lo que estamos realizando mal o lo que perjudica a nuestra salud. Entre enero y junio de 2021, en México se contabilizaron de forma preliminar un total de 579,596 defunciones registradas; 110,312 más que las registradas en el mismo periodo del año inmediato anterior. Durante el periodo enero-junio de 2021, las defunciones por la COVID-19 fueron la primera causa de muerte a nivel nacional con 145,159 casos. Le siguieron las enfermedades del corazón con 113,899 y de la diabetes mellitus con 74,418 casos. La OMS destaca que hay una relación profunda entre las afectaciones al medio ambiente con la prevalencia de las enfermedades, en que los sistemas de fabricación de alimentos y bebidas muy transformados y poco saludables están impulsando una ola de obesidad, aumentando el cáncer y las enfermedades cardíacas.

2.1.1.1 Obesidad en México

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020, nos ofrece una radiografía clara y precisa de las circunstancias de sobrepeso y obesidad que viene padeciendo la población mexicana en los diversos

grupos de edad, aquí algunos de los datos para tenerlos en cuenta:

- La población en edad de 0 a 5 años presenta una prevalencia de sobrepeso u obesidad de 8.4%.
- En el caso de la población de 6 a 11 años, el problema adquiere una mayor preocupación por el incremento de las cifras.
- Con respecto a la población de 12 a 19 años, el sobrepeso está presente en 26.8% de este grupo, al mismo tiempo que la obesidad se registró en 17%.
- El mayor problema lo encontramos en la población adulta, aquella que es mayor de 20 años. Los datos de la encuesta indican, que, a nivel nacional, 74.1 de los adultos tenían sobrepeso u obesidad, registrándose una mayor prevalencia de obesidad en el grupo de edad de entre 30 a 59 años. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2022).

2.2 Relación entre obesidad, inflamación y estrés oxidativo

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial y se puede definir como un aumento en la acumulación de grasa corporal. El tejido adiposo no es solo un órgano de almacenamiento de triglicéridos, sino que los estudios han demostrado el papel del tejido adiposo blanco como productor de ciertas sustancias bioactivas llamadas adipocinas. Entre las adipocinas encontramos algunas con funciones inflamatorias, como la Interleucina-6 (IL-6); otras adipocinas tienen funciones de regulación de la ingesta de alimentos, por lo que ejercen un efecto directo sobre el control del peso. Es el caso de la leptina, que actúa sobre el sistema límbico estimulando la captación de dopamina, creando una sensación de saciedad. Sin embargo, estas adipocinas inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando un proceso conocido como estrés oxidativo (OS). Porque el tejido adiposo es el órgano que secreta adipocinas y estas a su vez generan ROS, el tejido adiposo es considerado un factor independiente para la generación de OS sistémicos. Existen varios mecanismos por los cuales la obesidad produce OS. El primero de ellos es la oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos, que pueden producir ROS en reacciones de oxidación, mientras que otro mecanismo es el consumo excesivo de oxígeno, que genera radicales libres en la cadena respiratoria mitocondrial que se encuentra acoplado a la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. Las dietas ricas en lípidos también son capaces de generar ROS porque pueden alterar el metabolismo del oxígeno. Tras el aumento del tejido adiposo, se encontró que la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) disminuyó significativamente (Fernández y col., 2011).

Se ha informado que la obesidad puede inducir EO sistémico y, a su vez, el EO se asocia con una producción irregular de adipocinas, lo que contribuye al desarrollo del síndrome metabólico. La

sensibilidad de la técnica de en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otros biomarcadores de daño oxidativo es mayor en personas con obesidad y se correlaciona directamente con el IMC y el porcentaje de grasa corporal, la oxidación de LDL y los niveles de triglicéridos; en cambio, los marcadores de defensa antioxidante son más bajos según la cantidad de grasa corporal y la obesidad central. La hipoxia, la lipólisis, el mayor grado de estrés oxidante, el incremento de mediadores de inflamación, junto a la alteración en el perfil secretor de adipocinas en el tejido adiposo, tendrán como posible consecuencia, la aparición de enfermedades crónico-degenerativas.

También, en el tejido adiposo visceral (TAV) se observa liberación de mediadores proinflamatorios (TNF- α , IL-6, PAI-1, resistina y visfatina), así como disminución en la secreción de citocinas con acción antiinflamatoria (adiponectina, IL-10, IL-4 e IL-13). La combinación de todos estos fenómenos observados en el TAV de personas con obesidad (Figura 1), ayuda a que se establezca el estado de inflamación crónico de baja intensidad característico de esta población. A este estado inflamatorio, se le ha atribuido una concomitante pérdida de la sensibilidad a la insulina inicialmente local. Sin embargo, recientemente se ha observado que otros tejidos, aparte del tejido adiposo, participan en este proceso, ayudando a la pérdida de la sensibilidad a la insulina sistémica; tal es el caso del hígado, el páncreas y el músculo esquelético (Sun y col., 2011).

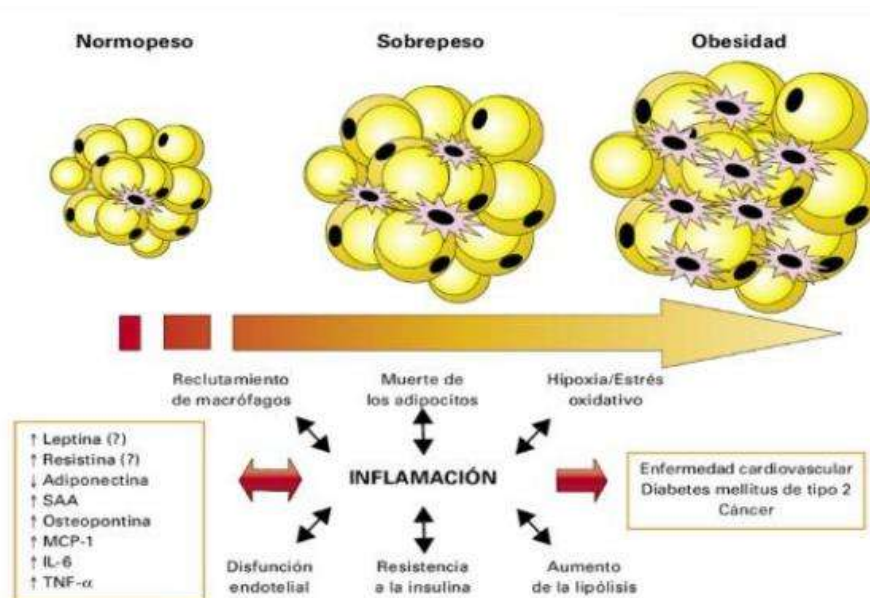


Figura 1. Relación entre la expansión del tejido adiposo y el estado proinflamatorio. (Barroso, 2019)

Los modelos animales han sido importantes para contribuir a las investigaciones de diversas enfermedades complejas, entre ellas la obesidad. Son muy efectivas y ampliamente utilizados en la investigación de la obesidad, ya que aumentan de peso fácilmente y alcanzan la obesidad en tan solo

unas semanas de alimentación con una dieta alta en grasas. La mayor ventaja de utilizar modelos biológicos es que permiten un control estricto de todos los factores, lo que es muy importante en el estudio de seguridad y eficacia (Rahman y col., 2017).

2.3 Alternativas de combate contra la obesidad

Controlar la obesidad es difícil, conseguir una pérdida de peso y aún más sostenerla en el tiempo es algo muy complicado. Cuando los cambios en el estilo de vida no logran alcanzar el objetivo, se añaden medicamentos, sin embargo, la mayoría de estos medicamentos no han sido aprobados para su uso a largo plazo, suelen provocar la pérdida de un 10% del peso y dejan de producir efecto. Además, la interrupción de estos medicamentos lleva a recuperar el peso en la mayoría de los pacientes, por ello imprescindible es un cambio en el estilo de vida. La forma de disminuir la prevalencia de la obesidad es mediante la prevención, esto requiere la colaboración entre diferentes ámbitos como promover el ejercicio, una buena educación alimentaria, mejorar la calidad de los productos vendidos en colegios y universidades, políticas en servicios de salud, la recopilación y el estudio de datos relacionados con la patología. La prevención de la obesidad debe abarcarse desde un punto de vista global y a largo plazo (Kang y col. 2018).

2.3.1 Uso de extractos de plantas para la estimulación de marcadores antiinflamatorios y antiobesogénicos

Diferentes materias primas vegetales presentan una cantidad importante de compuestos antioxidantes de origen natural. El consumo de estas materias primas, sus extractos, jugos o ingredientes derivados se presentan como una alternativa saludable para aumentar el consumo de antioxidantes naturales y ejercer su efecto sobre el estrés oxidativo.

En los extractos de diferentes especies vegetales se encuentra una gran cantidad de compuestos a los cuales se les atribuyen diferentes propiedades. Un grupo de compuestos el cual ha sido muy estudiado en los últimos tiempos han sido los polifenoles, estos destacan por sus enormes capacidades antioxidantes y antiinflamatorias. Son metabolitos secundarios en las plantas, que se producen como defensa frente a diferentes tipos de estrés. El conocimiento y las implicaciones de estos compuestos en la salud humana se han documentado ampliamente y se han atribuido a diversos efectos positivos para la salud. Específicamente, las primeras evidencias sobre los efectos beneficiosos de los polifenoles sobre la obesidad se publicaron en 1999. Este estudio reportó, que el consumo de un extracto rico en catequinas aumenta el gasto energético de 24 horas, y la oxidación de grasas en 10 voluntarios sanos. A partir de ese momento, el interés aumentó

significativamente y se han realizado innumerables investigaciones. Por ejemplo, las procianidinas de la uva se han relacionado con prevención de la obesidad en hámsteres alimentados con dieta alta en grasas, mejorando el perfil secretor de adipocinas del tejido adiposo y atenuando el estrés oxidativo. Además, extractos de manzana y canela se destacan, ricos en polifenoles, han probado efectos importantes sobre obesidad en ratas. Adicionalmente, se han reportado efectos de polifenoles aislados, por ejemplo, para resveratrol y quercetina, que en combinación presentaron efectos sinérgicos sobre la reducción de depósitos de grasa en ratas. En humanos, un estudio de casos y controles describió que un extracto rico en polifenoles redujo el peso corporal, el IMC, la grasa corporal y la relación cintura-cadera en sujetos con sobrepeso. Además, se ha observado que los polifenoles del jugo de naranja reducen el peso corporal, junto con la actividad antioxidante y mejoran la presión arterial, en pacientes obesos (Pino y col., 2022).

2.4 *Cosmos bipinnatus*

Entre las plantas con posibles efectos medicinales se encuentra *Cosmos bipinnatus* Cav., especie anual de la Familia Asteraceae, conformada por 35 especies y cuatro variedades, se distribuye desde Estados Unidos hasta Argentina. En México crecen 33 especies y las cuatro variedades; son especies con cabezuelas de ocho flores liguladas de color blanco, violado o anaranjado y aquenios pubescentes de rostro largo, sus inflorescencias son muy vistosas, lo que convierte a estas plantas como elementos de ornato (Vargas y col., 2013). *C. bipinnatus* (Figura 2) es una especie que crece en la mayoría de los estados de México, pero es más común en el centro del país: Estado de México, Puebla, Tlaxcala, Michoacán y Jalisco (Rodríguez y col., 2006). Estas plantas pueden alcanzar una altura de 0.9 a 1.8 metros y tener un hábito abierto y extenso. Las hojas simples finamente cortadas y en forma de hilo se cortan pinnadamente en lóbulos profundos que parecen compuestos (Jang y col., 2008).



Figura 2. *Cosmos bipinnatus* Cav.

Es una especie llamativa de las partes altas de México, de las regiones de pino encino, puede dominar el paisaje cultural a partir de la segunda quincena de septiembre hasta el mes de noviembre. Generalmente crece como arvense, y menos frecuentemente como ruderal. En la Tabla 1 se presenta la taxonomía del mirasol morado (*Cosmos bipinnatus*). Sus nombres comunes son: amapola, amapola del campo, girasol, girasol morado, mirasol, mirasol morado, sharacamate, sharikamat, xaricamata (lengua purépecha) (INECOL Bajío, 2008, Conabio, 2009).

Tabla 1. Taxonomía de *Cosmos bipinnatus*.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Cosmos</i>
Especie	<i>C. bipinnatus</i> Cav.

Fuente: Conabio, 2009.

2.4.1. Usos y aplicaciones

C. bipinnatus se ha utilizado como un remedio herbal tradicional para diversas enfermedades como ictericia, fiebre intermitente y esplenomegalia (Jang y col., 2008). La infusión de las flores se emplea para la tos y para bajar la temperatura. También se coce junto con borraja y se colocan paños húmedos en el abdomen para comezones de la piel y hemorroides.

Existen evidencias de la actividad antioxidante y antigenotóxica de los extractos de *C. bipinnatus* ya que en una investigación se evaluaron los efectos genotóxicos de H₂O₂ y la capacidad protectora de varios extractos de flores de *Cosmos* en leucocitos humanos normales mediante el ensayo Comet. Ensayo que se ha utilizado con éxito para evaluar el daño del ADN y se ha sugerido como una técnica excelente para su uso con marcadores biológicos en la detección, seguimiento y pronóstico de enfermedad crónica degenerativa, incluidos ciertos tipos de cáncer, diabetes y

aterosclerosis (Jang y col., 2008).

También se realizó un ensayo con el aceite esencial de *C. bipinnatus* para probar sus propiedades antibacterianas, el cual mostró efectos inhibitorios significativos contra los aislados de bacterias Gram negativas y Gram positivas. La mayoría de los principales componentes de este aceite en otras plantas se han divulgado para actividades antimicrobianas. La actividad antibacteriana se puede atribuir a los efectos de la combinación de varios componentes del aceite. Los resultados indican que *C. bipinnatus* podría ser explotado como agente antibacteriano natural y tener aplicación en el tratamiento de varias enfermedades infecciosas causadas por estas bacterias (Olajuyigbe, 2014).

Según la bibliografía *C. bipinnatus* puede utilizarse como material vegetal para la remediación del suelo, en un estudio se mostró la gran capacidad para crecer y desarrollarse en sustratos compuesto de suelo agrícola contaminado con relaves de minas que contenían Cu, Zn, Mn, Cd, Ni, y Pb (Rodríguez y col., 2010), el mecanismo de tolerancia que tuvo lugar fue la acumulación. Estos resultados indican que *C. bipinnatus* es una especie potencial de plantas hiperacumuladoras de Cr y puede cultivarse directamente en suelos moderadamente contaminados con Cr (VI) (Cruz y col., 2014).

2.4.2 Composición química de *Cosmos bipinnatus*

El aceite esencial extraído de esta planta está compuesto predominantemente de monoterpenos (69-62%) y sesquiterpenos (22-73%) (Olajuyigbe, 2014). Según un análisis realizado con Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) a un extracto etanólico de *C. bipinnatus*, se encontró que contenía quercetina, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido sinápnico (Saleem y col., 2004).

Existen diferentes métodos para identificar los componentes de las mezclas o extractos, la HPLC es un método de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos. Básicamente, en este método participan la fase móvil y estacionaria (inmiscibles entre sí) y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla (Fallon y col., 1987). Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que

aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes.

2.4.3 Género *Cosmos* y sus propiedades antioxidantes

El término antioxidante se le da a una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Químicamente, la oxidación es una semirreacción donde una sustancia pierde electrones y, por lo tanto, se oxida, durante un proceso redox, que puede ocurrir por mecanismos que potencien la producción de radicales (sustancias inestables con electrones desapareados), los cuales desarrollan reacciones en cadena. Dichas reacciones son incontrolables mientras tengan sustrato suficiente para seguir desarrollándose y pueden causar daños a los distintos componentes de las células, especialmente a los de naturaleza lipídica. Los antioxidantes finalizan la reacción al interactuar con los compuestos intermedios que impiden su propagación.

A pesar de que el género *Cosmos* tiene una gran variedad de especies, no todas han sido estudiadas para conocer sus propiedades medicinales. A continuación, se hace un breve resumen de algunas especies y sus propiedades o aplicaciones (Tabla 2).

Tabla 2. Especies del género *Cosmos* (familia Asteracea) con propiedades antioxidantes.

Especie	Aplicaciones	Referencia
<i>Cosmos bipinnatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad antioxidante significativa y efecto protector contra el daño oxidativo del ADN inducido por H₂O₂. • Inhibe significativamente la expresión de óxido nítrico sintasa inducible y ciclooxigenasa-2, suprime la producción de NO y prostaglandina E. Inhibe significativamente las expresiones de citocinas proinflamatorias como IL-1β, IL-6, IFN-γ y TNF-α. Atenuó la actividad de unión al ADN de NF-κB inhibiendo la fosforilación de IκB. El extracto etanólico de <i>C. bipinnatus</i> muestra actividad antiinflamatoria en macrófagos murinos estimulados con LPS modulando la ruta NF-κB. • El extracto de <i>Cosmos</i> disminuyó significativamente el nivel de alanina aminotransaminasa y bilirrubina total (p < 0.05), dependiente de la dosis y protegió a los hepatocitos de la hepatotoxicidad inducida por paracetamol. Posee actividad hepatoprotectora posiblemente debido a la presencia de 	<p>(Jang y col., 2008)</p> <p>(Sohn y col., 2013)</p> <p>(Saleem y col., 2017)</p>

	quercetina y compuestos fenólicos.	
<i>Cosmos caudatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • En un estudio realizado para comprobar su efecto anti-obesidad con ratas, se observó una fuerte correlación positiva entre los compuestos fenólicos y flavonoides y la actividad de captación de radicales libres y anti-lipasa, lo que sugirió que estos compuestos eran los principales responsables del potencial antioxidante y anti-obesidad observado. • Actividad antioxidante; los estudios han demostrado que 100 g de <i>C. caudatus</i> fresco contienen aproximadamente 2500 mg de capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico. • Los extractos metanólico y acuoso de <i>C. caudatus</i> a una dosis de 200 mg/kg han mostrado una actividad antiinflamatoria significativa al suprimir el edema de la pata de ratón inducido por carragenina. 	<p>(Raham y col., 2017)</p> <p>(Cheng y col., 2015)</p>
<i>Cosmos sulphureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • El extracto exhibió una variedad de propiedades potenciales para mejorar la salud, como la supresión de la proliferación de células cancerosas asociadas con el sistema de digestión humano y la inhibición de las enzimas α-glucosidasa y lipasa. • Flores de <i>C. sulphureus</i> también han exhibido una actividad antioxidante significativa, potencial citotóxico contra líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y colorrectal y actividad antidiabética <i>in vitro</i>. 	<p>(Kaisoon y col., 2012)</p> <p>(Saleem y col., 2017)</p>

2.4.3.1 Métodos antioxidantes

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las técnicas más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical. La pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* brindan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoski y col., 2005).

2.4.3.1.1 DPPH

DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) es uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánico estables y disponibles en el mercado, y tiene un máximo de absorción UV-visible a 517 nm. Tras la reducción, el color de la solución se desvanece (Figura 3); por lo que el progreso de la reacción se monitoriza mediante el uso de un espectrofotómetro.

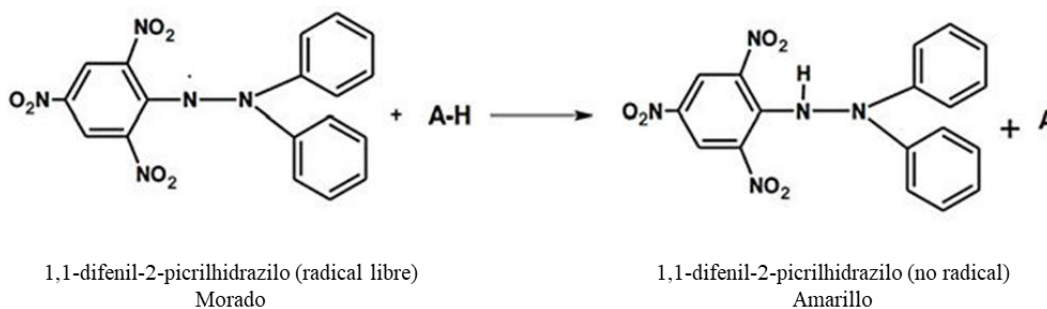


Figura 3. Estructura de DPPH antes y después de la reacción con un antioxidante.

El % DPPH_{rem} se expresa como EC₅₀, es decir la cantidad de antioxidante necesario para disminuir en un 50% la concentración inicial de DPPH. La principal limitación para la determinación del EC₅₀ es que el porcentaje de captación de radicales es dependiente de la concentración inicial del radical DPPH. Por esta razón es más exacto utilizar la variación de la absorbancia (o concentración del DPPH consumido) en lugar del porcentaje de radical consumido. Este valor de la absorbancia se interpola en una curva de dosis-respuesta de un antioxidante estándar tal como el ácido gálico o ácido ascórbico, y los resultados se expresan como concentración equivalente (Brand-Williams y col., 1995).

La accesibilidad estérica del radical DPPH es una determinante importante de la reacción, ya que las pequeñas moléculas que tienen un mejor acceso al sitio radical tienen relativamente mayor capacidad antioxidante. Por otra parte, muchos compuestos antioxidantes grandes que reaccionan con los radicales peroxilo pueden reaccionar lentamente o incluso pueden ser inertes en este ensayo. La inexistencia de DPPH o radicales similares en los sistemas biológicos es también un inconveniente.

2.4.3.1.2 ABTS

El ensayo se basa en la interacción entre antioxidantes y el catión radical ABTS que tiene un color característico mostrando máximas absorbancias a 645, 734 y 815 nm. El ABTS se genera por reacción de un agente oxidante fuerte (por ejemplo, permanganato de potasio o persulfato de potasio) con la sal de ABTS. La reducción del azul-verde ABTS por el antioxidante donador de hidrógeno se mide por la supresión de su característico espectro de absorción de onda larga, durante esta reacción el catión azul del radical ABTS se convierte de nuevo a su forma neutra incolora. Los resultados se expresan normalmente como capacidad antioxidante equivalente en Trolox.

El método es rápido y se puede utilizar en una amplia gama de valores de pH que es útil para estudiar el efecto del pH sobre los mecanismos antioxidantes. Además, el radical ABTS es estable y soluble en agua y disolventes orgánicos, lo que permite la determinación de la capacidad antioxidante de ambos compuestos o de muestras hidrófilas y lipófilas.

2.5 Compuestos fenólicos (CF)

Los CF, producto del metabolismo secundario de plantas, poseen capacidad antioxidante capaces de estabilizar radicales libres. Su estructura química se constituye por anillos aromáticos con presencia de uno o más grupos hidroxilos y su propiedad antioxidante se relaciona con la posición del grupo hidroxilo y grado de hidroxilación de los anillos (Rabassa y col., 2012). Diversos estudios han reportado las ventajas de los CF, tales como antienvjecimiento, antiinflamatorios, cardiprotectoras, antioxidantes y agentes antiproliferativos. Otros estudios concluyen que estos compuestos pueden actuar en diferentes aspectos: como antioxidantes, como polímeros estructurales (lignina), como atrayentes (flavonoides y carotenoides), como pantallas UV (flavonoides), como compuestos de señal (ácido salicílico y flavonoides) y como productos químicos de respuesta de defensa (taninos y fitoalexinas) (González y col., 2017). En un análisis realizado por Jang y col. (2008) se evaluaron flores de diferentes colores de *Cosmos* (blanco, rosa, naranja y violeta) y se encontró que el mayor contenido de CF estaba en el extracto de cosmos color violeta.

2.5.1 Ruta de biosíntesis de los CF

Los CF de las plantas son biosintetizados en diferentes rutas y (Figura 4), por ello, constituyen un grupo heterogéneo desde un punto de vista metabólico. Existen dos rutas básicas implicadas: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del ácido siquímico es responsable de la

biosíntesis de la mayoría de los fenoles en las plantas. El contenido de CF en plantas tiene variaciones que dependen del genotipo, especie, condiciones ambientales, grado de madurez, composición del suelo, ubicación geográfica y condiciones de almacenamiento.

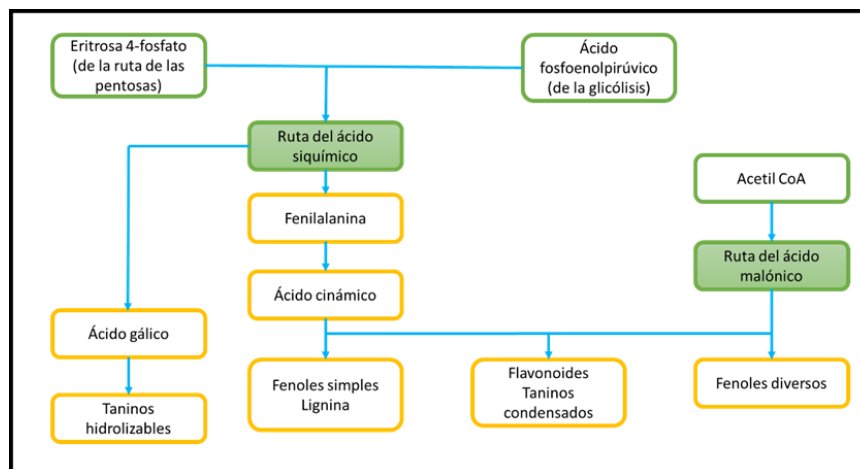


Figura 4. Biosíntesis de los compuestos fenólicos.

2.5.2 Clasificación

2.5.2.1 Flavonoides

De manera general, los CF se pueden clasificar en dos grupos: flavonoides y no flavonoides. Los primeros son la clase más abundante, derivados de aminoácidos aromáticos, como son la fenilalanina y tirosina. Constituyen un extenso grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y son necesarios para el desarrollo de vegetales ya que pueden actuar como señaladores químicos y tienen efectos sobre algunas enzimas ligadas a la fisiología y metabolismo del vegetal (Valencia y col., 2017). Son compuestos polifenólicos de bajo peso molecular que se encuentran prácticamente, en todas las partes de la planta: fruto, semilla, corteza, etc. El término flavonoide se refiere a un grupo de compuestos químicos que comparten un esqueleto común de tres anillos. Esta estructura básicamente permite multitud de sustituciones y variaciones que determinan las distintas clases de flavonoides. Esta estructura básica se compone de dos anillos bencénicos (A y B) unidos por un pirano (C) (Figura 5). Se han descrito más de 4000 flavonoides distintos y este número continúa creciendo cada día. Los flavonoides son compuestos típicamente polifenólicos y actúan como potentes agentes quelantes de metales y secuestradores de radicales libres. Se cree que su actividad antioxidante reside, principalmente, en su habilidad para donar átomos de hidrógeno (Rivera Soria, 2009).

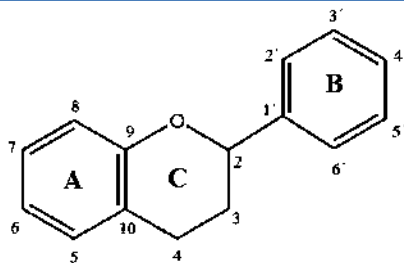


Figura 5. Estructura general de los flavonoides

CF como kaempferol ha mostrado efecto positivo en la captura de glucosa, y, reducción de la gluconeogénesis y adipogénesis, asociado a una modulación de las vías inflamatorias dependientes de NF- κ B, Tnf- α e Interleucinas (Vinayagam y Xu, 2014).

2.5.2.1.1 Quercetina

Este flavonoide presenta en su estructura varias sustituciones hidroxílicas en las posiciones 5, 7, 3', y 4' (Figura 6).

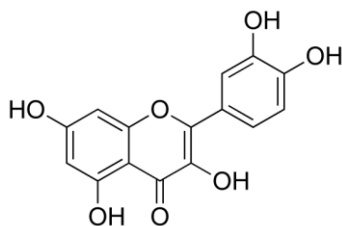


Figura 6. Estructura química de la quercetina.

Dentro de la familia de los flavonoides, la quercetina es el que posee mayor poder antioxidante contra especies reactivas del oxígeno, incluido el anión superóxido, el peroxinitrito y el radical hidroxilo (Boots y col., 2008). La quercetina reduce la oxidación de LDL mediante la inhibición de la enzima mieloperoxidasa en neutrófilos. La inhibición del sistema xantina deshidrogenasa/xantina-oxidasa es otro importante mecanismo por el que la quercetina disminuye el daño oxidativo tras una isquemia u otras condiciones patológicas (Bindoli y col., 1985).

Desde hace varios años se presenta la quercetina como posible principio activo antiinflamatorio, ya que ha mostrado ser inhibidor de la liberación de histamina y de otros mediadores inflamatorios en respuesta a lipopolisacárido (LPS) en macrófagos aislados y mastocitos. Dada la importancia de la infiltración de macrófagos en la aparición de inflamación en los tejidos, también se ha estudiado y puesto de manifiesto el efecto antiinflamatorio de la quercetina en órganos como

el hígado, el tejido adiposo (Rivera y col., 2008), el cerebro, el intestino, etc. Los mecanismos implicados no están totalmente definidos, pero existen numerosos estudios que proponen una reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias mediante una atenuación de la expresión de NF- κ B, STAT1 y p38 MAPK, inhibición de la isoforma inducible de la NOS (iNOS), COX-2 y LOX, bloqueando la ruta del ácido araquidónico y Proteína C reactiva y aumentando la expresión de adiponectina (Rivera Soria, 2009).

Los efectos que la quercetina, como otros polifenoles, tiene sobre el metabolismo glucídico y lipídico son complejos y han sido objeto de numerosos estudios en los últimos años. La quercetina ejerce una acción beneficiosa sobre la homeostasis lipídica en hígado y tejido adiposo (Peluso y col., 2005), que además puede verse reflejada en una mejora sustancial del perfil lipídico en el plasma de animales obesos. Los mecanismos propuestos para explicar estos efectos se centran en el poder antiinflamatorio y en parte también, antioxidante del flavonol, ya que la obesidad y el síndrome metabólico se entienden como enfermedades inflamatorias crónicas (Rivera Soria, 2009).

2.5.2.2 No flavonoides

Este grupo de CF está formado por ácidos fenólicos, xantonas, estilbenos, taninos hidrolizables, lignanos y cumarinas. Sus estructuras son muy variadas y muchos de ellos contribuyen al sabor y potentes actividades biológicas de las plantas.

2.5.2.2.1 Ácidos fenólicos

Algunos de los ácidos fenólicos más estudiados debido a sus propiedades antioxidantes son el ácido gálico, el ácido clorogénico, ácido cafeico, entre otros.

Estructuralmente, el ácido clorogénico es el éster formado entre ácido cafeico y la posición 3-hidroxilo de L-ácido quínico (Figura 7). Está presente en casi todas las plantas superiores en las que juega el papel de responder al estrés medioambiental como, por ejemplo, al desgarro de las hojas o de las flores o a los cortes que tengan lugar en la piel de la fruta. Se han atribuido al ácido clorogénico numerosas propiedades farmacológicas, algunas de las cuales han sido evidenciadas, en un estudio que se realizó con ratones obesos redujo significativamente el peso corporal, la masa grasa visceral, los triglicéridos, el colesterol, los niveles plasmáticos de leptina e insulina, mientras que aumentó el nivel plasmático de adiponectina, lo que sugiere los múltiples efectos del ácido clorogénico en la mejora del peso corporal, el metabolismo de los lípidos y los niveles hormonales. (Cho y col., 2010).

El ácido cafeico es un compuesto orgánico que es clasificado como un ácido hidroxicinámico. Este sólido amarillo contiene grupos funcionales fenólico y acrílico. Se encuentra en todas las plantas debido a que es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina.

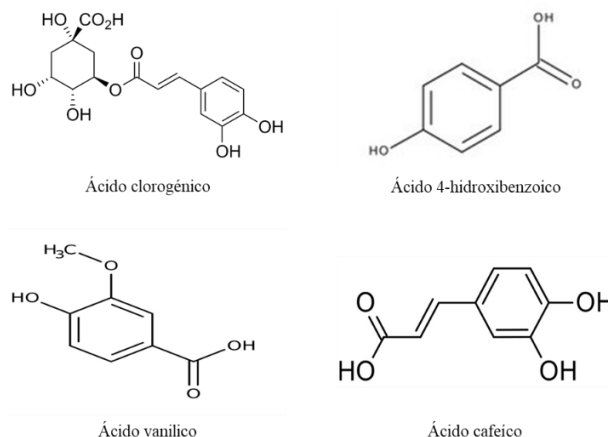


Figura 7. Estructura química de algunos ácidos fenólicos.

2.6 Métodos de extracción

La investigación de las plantas medicinales empieza con los procedimientos de extracción, que es un paso importante en el procesamiento de los componentes bioactivos de los materiales vegetales. Los métodos tradicionales como la maceración y la extracción Soxhlet se usan comúnmente en el ámbito a nivel de laboratorio o en el nivel de las pequeñas empresas de fabricación. Se han conseguido avances significativos en el procesamiento de plantas medicinales, como los métodos de extracción modernos; extracción asistida por microondas (MAE), extracción asistida por ultrasonido (UAE) y extracción por fluido supercrítico (SFE), en las que estos avances tienen como objetivo incrementar el rendimiento a menor costo. Además, se realizan continuamente modificaciones en los métodos. Con la diversidad de métodos existentes, la selección del método de extracción adecuado necesita una evaluación meticulosa (Azwanida, 2015). En ocasiones no hay suficiente información en la literatura para lograr determinar el mejor método de extracción para la especie en estudio, es por eso que se suelen comparar dos o más métodos de extracción para comprobar con cual se puede obtener un mejor rendimiento. Es necesario definir algunas condiciones de extracción que pueden mejorar el rendimiento como lo son, solvente, tamaño de partícula, temperatura y tiempo de extracción.

Solvente: las propiedades químicas moleculares de un solvente son importantes no solo para incrementar la selectividad de los componentes extraídos a partir de especies vegetales, sino también

para mejorar el rendimiento de la extracción. La polaridad del disolvente debe coincidir estrechamente con el de los compuestos objetivo. Los disolventes de mezcla de diferentes polaridades pueden extraer una amplia gama de clases compuestas (Beltrán y col., 2013).

Tamaño de partícula: la reducción del tamaño de las partículas aumenta el contacto superficial entre las muestras y los disolventes de extracción. La molienda da como resultado muestras más pequeñas y gruesas; mientras tanto, las muestras en polvo tienen una partícula más homogeneizada y pequeña, lo que conduce a un mejor contacto superficial con los disolventes de extracción. Esta preparación previa en particular es importante, ya que para que se produzca una extracción eficaz, el disolvente debe entrar en contacto con los analitos objetivo y el tamaño de partícula inferior a 0,5 mm es ideal para una extracción eficaz (Azwanida, 2015).

Temperatura: La temperatura de extracción es un importante parámetro que se optimiza incluso para minimizar costo de energía del proceso. Muchos autores están de acuerdo en el hecho de que un aumento de la temperatura de trabajo favorece extracción que mejora tanto la solubilidad del soluto como el coeficiente de difusión. Spigno y col. (2017), encontraron que la temperatura óptima para la extracción de compuestos fenólicos de la uva marc fue la de 60 °C.

Tiempo de extracción: depende del método, ya que al realizar la maceración se recomienda un tiempo estimado entre 24 a 72 h, mientras que para ultrasonido sus tiempos de extracción recomendados oscilan entre 10 a 60 min. Según Rafiee y col. (2011), la mayor extracción de los compuestos fenólicos totales en una maceración de distintas variedades de hojas de olivo se obtuvo después de 24 h. Por otro lado, en una extracción asistida por ultrasonido para obtener compuestos fenólicos de semillas de chía, el tiempo óptimo de extracción fue de 15 min (Corona y col., 2016)

2.6.1 Maceración

La maceración es una técnica utilizada en la elaboración del vino y ha sido adoptada y ampliamente utilizada en la investigación de plantas medicinales. La maceración implica remojar los materiales vegetales (gruesos o en polvo) en un recipiente con tapa con un solvente y dejarlos reposar a temperatura ambiente por un período con agitación frecuente. El procesado pretende ablandar y romper la pared celular de la planta para liberar los fitoquímicos solubles como son los compuestos fenólicos. Después, la mezcla se prensa o se cuela por filtración. En este método convencional, el calor se transfiere por convección y conducción y la elección de los disolventes determinará el tipo de compuesto extraído de las muestras (Azwanida, 2015).

2.6.2 Extracción asistida por ultrasonido

Este método utiliza cavitación acústica (Figura 8) para alterar los tejidos de las plantas y aumentar la transferencia de masa, obteniendo beneficios como una mayor eficiencia, menor tiempo de extracción y menos consumo de energía que las técnicas de extracción convencionales (Deng y col., 2017). Este tipo de cavitación es causada por una onda de presión de alta frecuencia (ultrasónicas) y alta amplitud, transmitida al interior de un líquido. Las ondas de presión son generadas comúnmente por un piezoelectrico, un transductor que convierte la energía eléctrica en energía mecánica, en un resonador acústico. El piezoelectrico produce ondas de presión de sonido en el resonador acústico lleno de agua. Como punto de nucleación se usa una burbuja de vapor previamente creada mediante calentamiento de un alambre por el que se hace pasar una corriente eléctrica. La variación de presión provocada por las ondas de sonido en el agua causa que la burbuja expanda cuando la presión es negativa y se contraiga cuando la presión es positiva hasta colapsar, dañando así la pared del objeto en disolución que facilitará la extracción de compuestos químicos solubles en el solvente por ejemplo compuestos fenólicos (Ramírez, 2015).

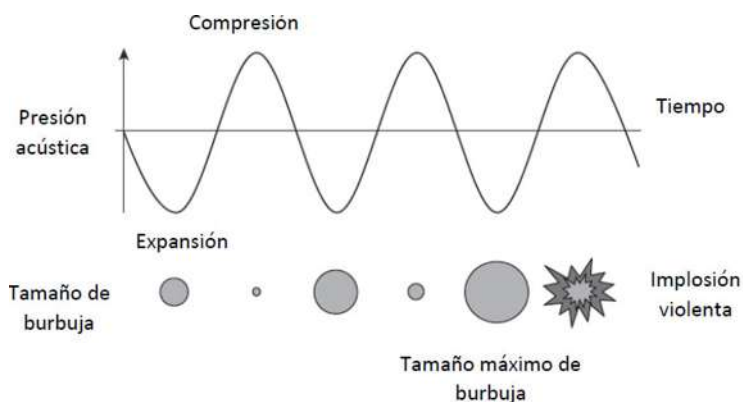


Figura 8. Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido. (Salazar y col. 2010).

3. Justificación

El aumento de la obesidad, dislipidemias y diabetes en el mundo ha requerido buscar nuevas soluciones para su tratamiento y prevención. Una alternativa prometedora es obtener extractos de plantas que contengan agentes bioactivos, como son los compuestos fenólicos, que podrían tener un efecto en la prevención de la obesidad. En el Estado de Michoacán crece de manera silvestre la especie *Cosmos bipinnatus*, que ha sido pobremente estudiada con relación a su actividad antiobesogénica. En consecuencia, en este estudio se plantea obtener un extracto fenólico de *C. bipinnatus* para utilizarlo en la prevención de complicaciones asociadas a la obesidad. El uso de biomarcadores de obesidad evaluado en un modelo de rata obesa es una herramienta para evaluar los efectos de extractos como el de *C. bipinnatus* sobre la obesidad.

4. Hipótesis

El extracto fenólico de *Cosmos bipinnatus* contribuye a la disminución de algunos biomarcadores de la obesidad y hepatoprotector en un modelo de rata obesa.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de extractos fenólicos de *Cosmos bipinnatus* sobre la disminución de biomarcadores de obesidad y hepatoprotector utilizando un modelo de rata obesa.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar eficiencia de extracción de la maceración tradicional y el ultrasonido para la obtención de compuestos fenólicos de *Cosmos bipinnatus* Cav.
- Caracterizar químicamente el extracto que tenga el mayor contenido de polifenoles.
- Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto fenólico de *Cosmos bipinnatus* Cav.
- Evaluar el efecto antiobesogénico del extracto fenólico, a través de la determinación del consumo de alimento y cambio de peso corporal en ratas obesas.
- Determinar el impacto del extracto en los valores de los perfiles de lípidos y hepático en suero de las ratas control y las ratas obesas.

6. Estrategia experimental

En las Figuras 9 y 10 se muestra el diagrama de la parte práctica del desarrollo experimental de la tesis.

6.1 Obtención y caracterización del extracto

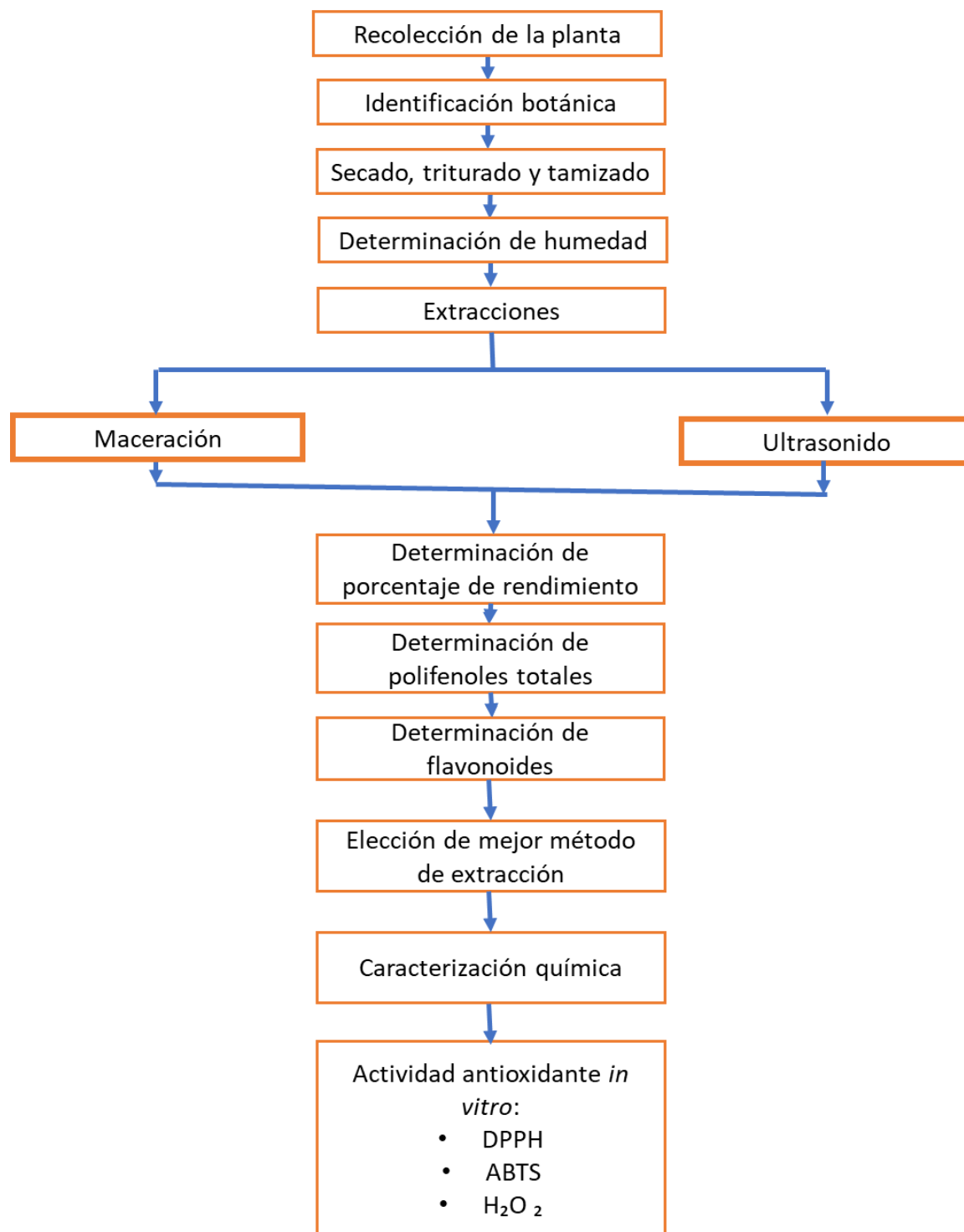


Figura 9. Estrategia experimental para la obtención y caracterización del extracto.

6.2 Modelo biológico

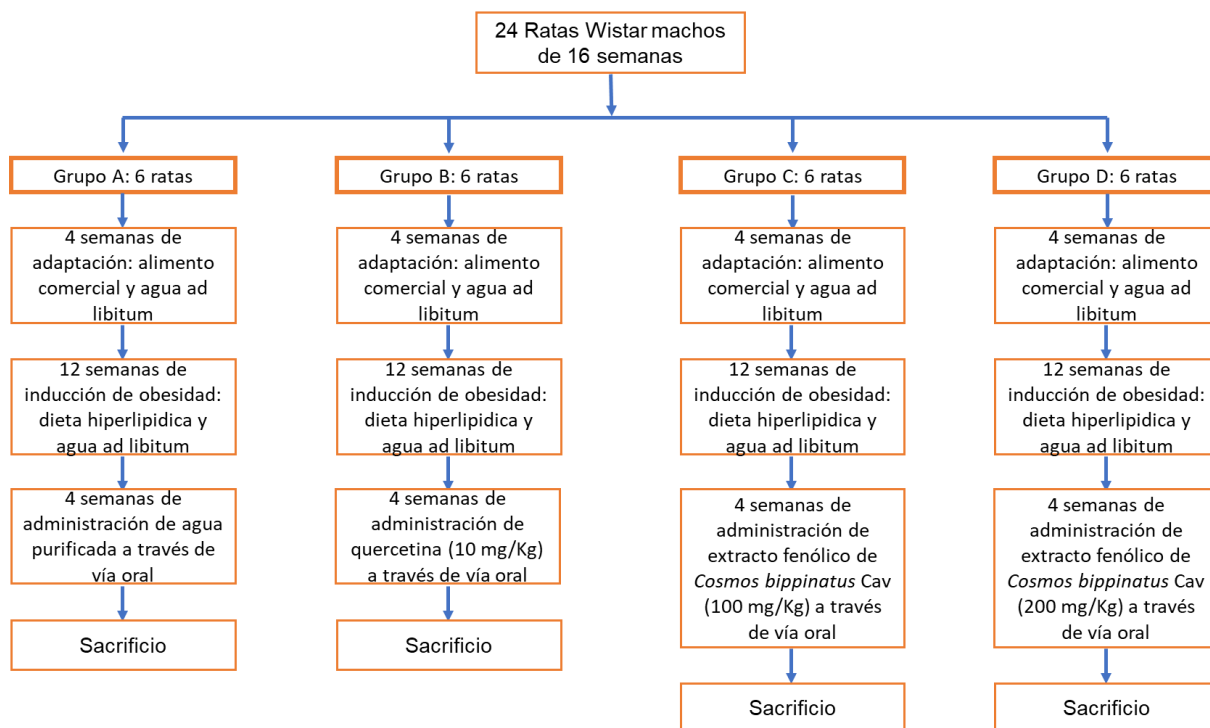


Figura 10. Estrategia experimental usada con el modelo biológico.

7. Material y métodos

7.1 Reactivos

- Etanol
- Agua destilada
- Ácido gálico
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Quercetina
- Metanol
- Cloruro de Aluminio (AlCl_3)
- Metanol grado HPLC
- Ácido fórmico grado HPLC
- Estándares de referencia HPLC:

- Ácido gálico
 - Ácido 4-p-OH-benzoico

 - Ácido clorogénico
 - Ácido vanílico
 - Ácido cafeico
 - Ácido p-cumárico
 - Manguiferina
 - Ácido ferúlico
 - Ácido sinapico
 - Quercetina
- DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)
 - Trolox
 - ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico-2NH₄)
 - Persulfato de potasio (K₂S₂O₈)
 - Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
 - Éter etílico
 - LEGENDplex™ Panel de detección de anticuerpos de inflamación de ratas

7.2 Equipos

- Balanza analítica marca Sartorius serie BL 120 S
- Estufa marca Felisa
- Termobañó agitador marca Julabo serie SW22
- Ultrasonido Sonics Vibra cell modelo VC505
- Centrifuga Centrificient IV, marca CRM Globe
- Espectrofotómetro UV/vis marca Velab modelo VE-5600 UV
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent Technologies Infinity 1260 series
- Balanza de precisión Sartorius modelo AY3101
- Glucómetro one touch
- Extractor soxhlet

7.3 Recolección de la planta

Cosmos bipinnatus cav. fue recolectada en los meses de octubre y noviembre de 2020 de una sola población ubicada en la ciudad de Morelia, Michoacán ($19^{\circ}44'20.5''N$ $101^{\circ}12'27.1''W$) (Figura 11). Se recolectó toda la parte aérea de la planta.

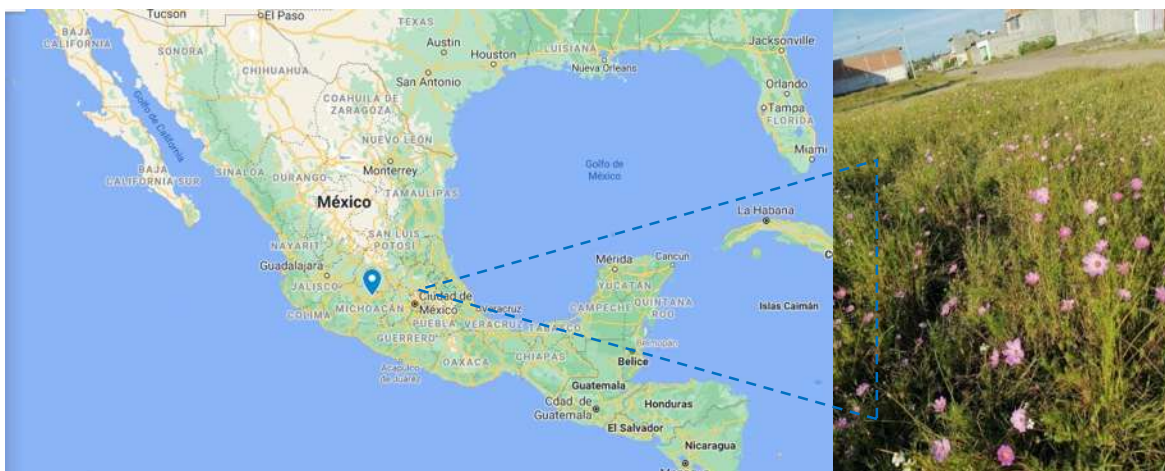


Figura 11. Sitio de recolección de *Cosmos bipinnatus*.

7.4 Identificación de la planta

Se realizó la determinación taxonómica de un ejemplar botánico constituido por hojas, flores y frutos secos, los cuales fueron entregados al personal del herbario de la Facultad de Biología (EBUM) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El nombre científico del ejemplar fue *Cosmos bipinnatus* Cav., el que fue herborizado de acuerdo con las técnicas estandarizadas y cumple los requisitos para ser incorporado a la colección científica del Herbario EBUM con el número de folio 30478 (véase Figura 12).



Figura 12. Ejemplar *Cosmos bipinnatus* Cav en el EBUM.

7.5 Secado, triturado y tamizado

Para llevar a cabo el secado, se colocó la planta en sombra, en el suelo sobre cartones y se removió dos veces al día durante siete días. Ya seca la planta, se trituró en una licuadora marca Osterizer® hasta convertirlas en partículas de menor tamaño. Por último, se tamizó con una malla del No. 60 marca Daigger serie 800-621-7193, el cual tenía aberturas de 250 μm (0.250 mm) (Figura 13). Se obtuvo una harina que se guardó al vacío hasta su uso.

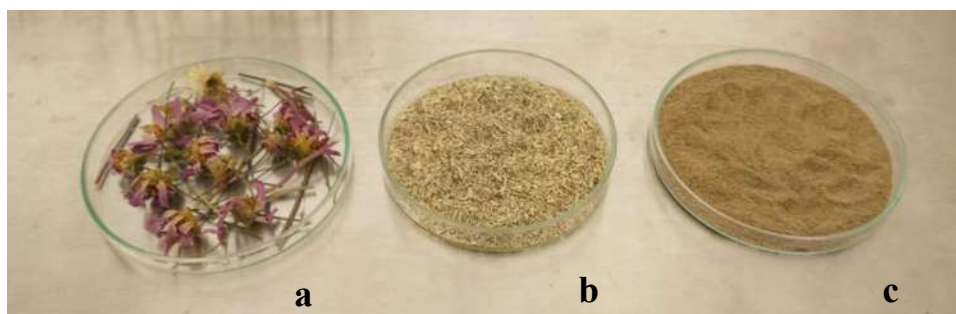


Figura 13. Transformación que sufrió *Cosmos bipinnatus*. a) Secado, b) Triturado c) Tamizado.

7.6 Determinación de humedad

Esta determinación se llevó a cabo de acuerdo con la NMX-F-083-1986 Determinación de humedad en productos alimenticios. Se llevó una cápsula de porcelana a peso constante por triplicado, pesando en una balanza analítica (Sartorius serie BL 120 S), se taró y posteriormente se pesaron 3 g de muestra del tamizado de *C. bipinnatus*. Se llevaron las cápsulas a estufa (Felisa

(Figura 14) a una temperatura de $100\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5$, por un tiempo de 3 h. Se sacó de la estufa y se llevó al desecador para atemperar por 30 min, se repitió el procedimiento hasta obtener peso constante.

La Norma indica la fórmula para realizar los cálculos posteriormente llevado a cabo el último pesaje.

$$\% \text{ en Humedad} = \frac{(P - P_1)}{P_2} \times 100$$

En donde:

P = Peso del recipiente con la muestra húmeda; en gramos.

P₁ = Peso del recipiente con la muestra seca en gramos.

P₂ = Peso de la muestra en gramos.



Figura 14. Estufa con muestras para determinación de humedad.

7.7 Extracciones

Se realizaron ocho extracciones con diferentes condiciones enumerándolas de la siguiente manera (Tabla 3):

Tabla 3. Diferentes condiciones de extracción para *Cosmos bipinnatus*.

No. de identificación	Método	Temperatura	Solvente	Tiempo
1	Maceración	25°C	EtOH 70%	24 h
2	Maceración	25°C	EtOH 50%	24 h
3	Maceración	60°C	EtOH 70%	24 h

4	Maceración	60°C	EtOH 50%	24 h
5	Ultrasonido	25°C	EtOH 70%	15 min
6	Ultrasonido	25°C	EtOH 50%	15 min
7	Ultrasonido	60°C	EtOH 70%	15 min
8	Ultrasonido	60°C	EtOH 50%	15 min

7.7.1 Maceración

Se llevó a cabo la extracción mediante el método de maceración, con dos solventes (EtOH 70% y EtOH 50%), a dos temperaturas diferentes (25 °C y 60 °C). Se pesaron 5 g de planta y se colocaron en 50 mL de cada solvente anteriormente mencionado, se sometieron durante 24 h a agitación mecánica en un termobañero marca Julabo serie SW22, a las dos temperaturas indicadas en la Tabla 3. La mezcla se filtró y posteriormente se guardó el extracto en refrigeración hasta su uso.



Figura 15. Maceración en termobañero a 25 °C.

7.7.2 Ultrasonido

Para realizar la extracción asistida por ultrasonido, de acuerdo se utilizaron las condiciones indicadas en la Tabla 2, es decir, con dos solventes (EtOH 70% y EtOH 50%) y a dos temperaturas diferentes (25 °C y 60 °C). Se colocaron 5 g de planta en 50 mL de cada solvente y se sometieron a ondas ultrasónicas en el equipo Sonics Vibra cell modelo VC505, con una potencia de 500 watts, 20 Khz de frecuencia y 40% de amplitud. Durante 15 min con lapsos de 55 s y 5 s de descanso. La mezcla se llevó a centrifugación durante 10 min a una velocidad de 4000 rpm. Se filtró el sobrenadante y se guardó el extracto en refrigeración hasta su uso.



Figura 16. Extracción de *Cosmos bipinnatus* asistida con ultrasonido.

7.8 Porcentaje de rendimiento

El porcentaje de rendimiento es la proporción porcentual del rendimiento real con respecto al rendimiento teórico. Se calculó el rendimiento experimental dividido por el rendimiento teórico multiplicado por el 100%. Para llevar a cabo este procedimiento, se llevaron a peso constante los crisoles y posteriormente se colocaron 3mL de cada extracto, se llevaron a sequedad en estufa marca Felisa a una temperatura de $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$ durante 3h y posteriormente se atempero en el desecador durante 30 min, se repitió el procedimiento hasta obtener peso constante. La fórmula para calcular el porcentaje de rendimiento fue la siguiente:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Rendimiento experimental}}{\text{Rendimiento teórico}} \times 100$$



Figura 17. Extractos llevados a sequedad para determinación de porcentaje de rendimiento.

7.9 Determinación de polifenoles totales

Los polifenoles totales se cuantificaron utilizando la metodología de Taga y col. (1984), con algunas modificaciones a la técnica. Las lecturas se llevaron a cabo con un espectrofotómetro UV/vis marca Velab modelo VE-5600 UV a una longitud de onda de 750 nm.

Para llevar a cabo la metodología, se inició preparando las siguientes soluciones:

- Solución stock de ácido gálico a una concentración de 200 ppm (0.020 g/ 100 mL).
- Solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) a una concentración de 75 g/L (1.875 g/ 25 mL).

Se realizó una curva de calibración, a continuación, en la Tabla 4 se muestran las diferentes concentraciones de ácido gálico usadas:

Tabla 4. Curva de calibración de ácido gálico.

[ppm]	μL de solución stock	μL de H_2O	Volumen final
0	0	1000	1 mL
20	100	900	1 mL
50	250	750	1 mL
70	350	650	1 mL
90	450	550	1 mL
110	550	450	1 mL
150	750	250	1 mL

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado, se tomaron 250 μL de: cada concentración de la curva de calibración, solución de Na_2CO_3 , reactivo de Folin-Ciocalteu. Posteriormente, se homogenizó y se incubó durante 30 min a 40 °C. Transcurrido el tiempo se agregaron 2 mL de H_2O y se leyó a una longitud de onda de 750 nm.



Figura 18. Reacción colorimétrica de ácido gálico a diferentes concentraciones.

Preparación de las muestras: para hacer la determinación de las muestras con los ocho diferentes tratamientos, se tomaron 50 μL de cada extracto, posteriormente se diluyeron en 950 μL de H_2O y se realizó la siguiente preparación para cada muestra por triplicado:

Tabla 5. Preparación de la muestra para medir polifenoles totales.

Extracto (μL)	250
Reactivo Folin-Ciocalteu (μL)	250
Carbonato de sodio (μL)	250
Homogenizar e incubar por 30 minutos a 40 °C	
H_2O destilada (mL)	2
Leer a 750 nm	

7.10 Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides totales se cuantificaron de acuerdo con la metodología de Dewanto y col. (2002), con algunas modificaciones a la técnica. Las lecturas se llevaron a cabo con un espectrofotómetro UV/vis marca Velab modelo VE-5600 UV a una longitud de onda de 415 nm. Para llevar a cabo la metodología, se inició preparando las siguientes soluciones con metanol al 50%:

- Solución stock de quercetina a una concentración de 20 ppm (0.02mg/mL).
- Solución de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% (0.2g/10mL).

Se realizó una curva de calibración, a continuación, en la Tabla 6 se muestran las diferentes concentraciones de quercetina usadas:

Tabla 6. Curva de calibración de quercetina.

[μg]	μL de solución stock	μL de Metanol 50%	μL de AlCl_3	Volumen final
0	0	2000	500	2.5 mL
4	200	1800	500	2.5 mL
8	400	1600	500	2.5 mL
12	600	1400	500	2.5 mL
24	1200	800	500	2.5 mL
28	1400	600	500	2.5 mL

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado, se homogenizó durante 30 min.

Transcurrido el tiempo se leyó a una longitud de onda de 415 nm.

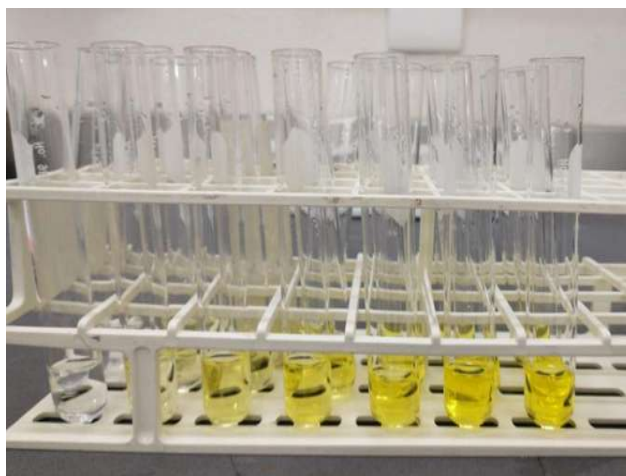


Figura 19. Reacción colorimétrica de quercetina a diferentes concentraciones.

Preparación de las muestras: para hacer la determinación de las muestras con los ocho diferentes tratamientos, se realizó la misma preparación que para la curva de calibración de quercetina, únicamente se sustituyó la solución stock por nuestro extracto.

7.11 Caracterización del extracto mediante HPLC

La cuantificación de compuestos fenólicos en extractos se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent Technologies Infinity 1260 series en el Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán (CIDAM). Equipado con una columna C18 Ascentis Express 250 × 4.6 mm, 5 μm. La fase móvil consistió en Metanol (disolvente A) y Ácido fórmico 1 % (disolvente B) a un flujo de 0.8 mL/min. Se utilizó el gradiente de elución que se muestra en la Tabla 7:

Tabla 7. Gradiente de elución utilizado en HPLC.

Tiempo	% de disolvente A
0 – 5 min	2 %
5 – 15 min	2 – 15%
15 – 30 min	15 – 25%
30 – 35 min	25 – 35%
35 – 45 min	35 – 55%
45 – 50 min	55%

50 – 55 min	55 – 2 %
55 – 60 min	2 %

Las condiciones de funcionamiento fueron las siguientes, temperatura de la columna: 35 °C, volumen de inyección: 10 µl y matriz de diodos UV detección a 255, 260, 270 nm (ácidos hidroxibenzoicos), 310, 320 nm (ácidos hidroxicinámicos) y 370 nm (flavonoles). Los compuestos fenólicos en las muestras se identificaron comparando sus tiempos de retención relativos y espectros UV con los estándares de referencia (Figura 18).

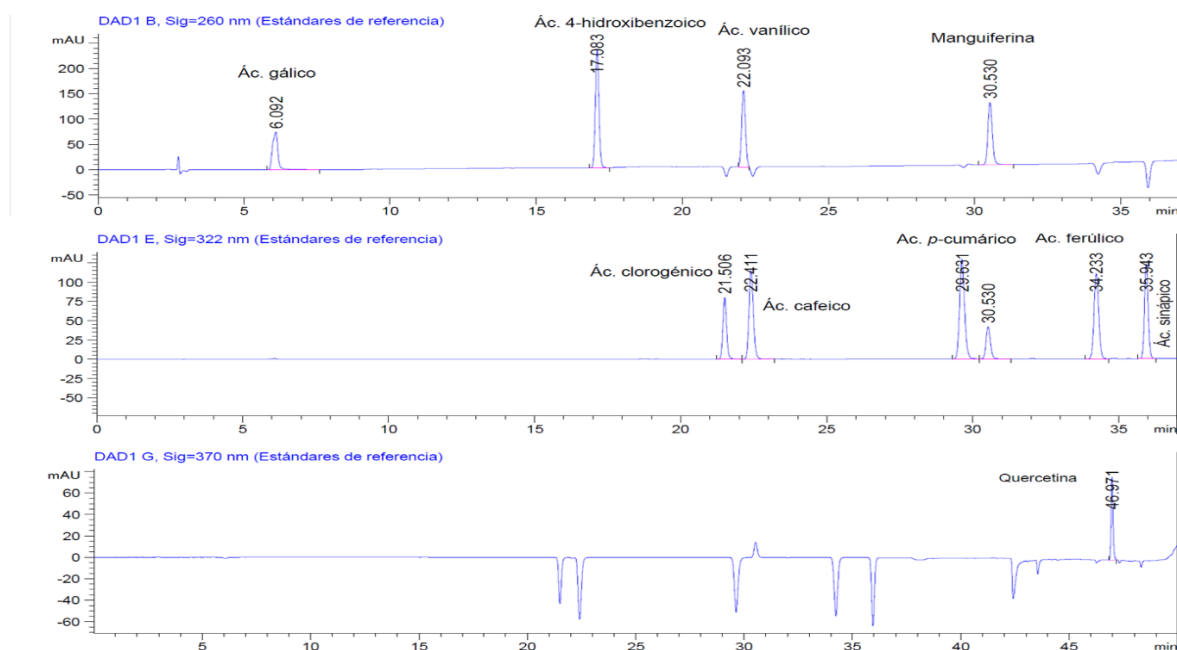


Figura 20. Cromatograma de los estándares de referencia.

7.12 Métodos para determinar capacidad antioxidante

7.12.1 Radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

La capacidad para capturar radicales libres de los extractos fue determinada utilizando como referencia la capacidad de atrapar el radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). Esta determinación se realizó utilizando la metodología de Brand y col. (1995). Las lecturas se llevaron a cabo con un espectrofotómetro UV/vis marca Velab modelo VE-5600 UV a una longitud de onda de 515 nm.

Para llevar a cabo la metodología se inició preparando las siguientes soluciones:

- Solución stock de ácido gálico a una concentración de 200 ppm (0.020 g/ 100 mL).

- 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH): Se preparó a una concentración de 6×10^{-5} M utilizando como diluyente al metanol (0.0024g/100mL).

Se realizó una curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y el tratamiento de la muestra se indica en la Tabla 8:

Tabla 8. Tratamiento de la muestra para DPPH.

Extracto	50 μ L
DPPH	2950 μ L
Homogenizar e incubar por 30 minutos en oscuridad	
Lectura a 517 nm	



Figura 21. Inhibición del radical DPPH.

El porcentaje de DPPH restante se calcula como:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) * 100$$

Donde:

A_0 = Absorbancia del DPPH

A_1 = Absorbancia del Extracto + DPPH

7.12.2 Radical ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- ácido sulfónico-2NH₄)

La actividad antioxidante se determinó usando el radical ABTS de acuerdo con el método de Pastrana-Bonilla y col. (2003). La generación del ABTS^{o+}, se llevó a cabo con la producción del cromóforo azul/verde ABTS^{o+}, a través de la reacción entre el ABTS y persulfato de amonio.

Para lleva a cabo la metodología, se inició preparando las siguientes soluciones:

- ABTS: Se disolvió en agua destilada a una concentración 7 mM. El catión del radical ABTS (ABTS^{•+}) se produjo haciendo reaccionar la solución stock de ABTS con persulfato de amonio 2.45 mM en una relación 1:1 y permitiendo que la mezcla estuviera en la oscuridad 24 horas antes de su uso. Posteriormente se realizó una dilución del ABTS^{•+} con etanol, para obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.020 a 734 nm.
- Solución stock Trolox® a 200 ppm.

Se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones, como se muestra en la Tabla 9:

Tabla 9. Curva de calibración de Trolox.

[ppm]	μL de solución stock	μL de H ₂ O	Volumen final
0	0	1000	1 mL
20	200	800	1 mL
40	400	600	1 mL
60	600	400	1 mL
80	800	200	1 mL
100	1000	0	1 mL

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado con un espectrofotómetro UV/vis marca Velab modelo VE-5600 UV a una longitud de onda de 734 nm, el tratamiento de la muestra se indica en la Tabla 10:

Tabla 10. Tratamiento de la muestra para ABTS.

Extracto	100 μL
ABTS	1900 μL
Lectura a 734 nm	

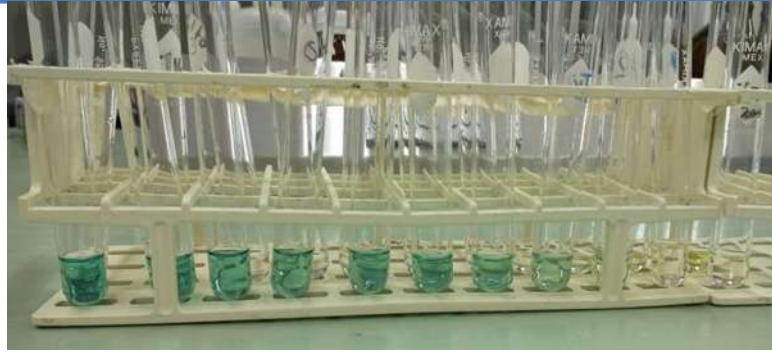


Figura 22. Inhibición del radical ABTS.

7.12.3 Peróxido de hidrógeno

La capacidad de los extractos para eliminar la especie reactiva H_2O_2 se calculó siguiendo el procedimiento descrito por Ruch y col. (1989). En tubos de ensayo, 1.7 mL de la solución de extracto, en concentraciones entre 0.5 y 1500 $\mu g / mL$, más 300 μL de solución H_2O_2 (40 mM) y se mantuvo a 22 °C durante 3 min. La absorbancia se midió a 230 nm con un espectrofotómetro UV/vis marca Velab modelo VE-5600 UV.



Figura 23. Inhibición del peróxido de hidrógeno.

El porcentaje de inhibición de peróxido de hidrógeno se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Scavenging} = 100 \left[\frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \right]$$

Donde:

A_0 = Absorbancia de la mezcla sin el extracto

A_1 = Absorbancia de la mezcla con el extracto

A_2 = Absorbancia del extracto

La concentración efectiva (CE50) Se calculó, definida como la cantidad de extracto requerido hasta reducir al 50% la concentración de la especie reactiva.

7.13 Animales de experimentación

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las Normas Institucionales para el trato ético de los animales. Se utilizaron ratas Wistar macho de 453-582 g de peso de 20 semanas de edad (Figura 24), adquiridas en el bioterio de la Universidad Autónoma de México campus Juriquilla, Qro. Para su adaptación, los animales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por cuatro semanas antes de iniciar los experimentos, a temperatura de 22 ± 2 °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. Las ratas se alojaron en cajas de plástico con lecho de viruta, en 4 grupos de 6 ratas por caja.



Figura 24. Grupo A en tiempo de adaptación.

Fueron alimentadas con una dieta estándar que a continuación se muestra en la Tabla 11, recibiendo agua potable *ad libitum*.

Tabla 11. Información nutrimental de los nutricubos de purina.

Humedad	12.0 % máx.	Proteína	23.0 % min.
Grasa	3.0 % min.	Fibra	6.0 % máx.
Cenizas	7.0 % máx.	E.L.N.	49.0 % P. Dif.
Calcio	1.0 % min.	Fósforo	0.6 % min.
Ingredientes	Cereales molidos, combinación de pasta de oleaginosas, harina de pescado, subproductos de cereales, alfalfa, melaza de caña.		
Vitaminas	A, B1, B2, niacina, cloruro de colina, pantotenato de calcio, B12, D, E, K.		
Minerales	Fosfato dicálcico, roca fosfórica, carbonato de calcio, cloruro de sodio, óxido cúprico, óxido férrico, sulfato ferroso, óxido de manganeso, yoduro de potasio, yoduro de calcio, tiosulfato de sodio, óxido de zinc.		

7.13.1 Inducción de obesidad

Se separaron individualmente las ratas en un módulo de 24 jaulas de acero inoxidable (Figura 25).



Figura 25. Disposición de las ratas en jaulas individuales

A todas las ratas se les administró una dieta rica en grasas, constituida por 60 % de alimento comercial y 40 % manteca de cerdo, en la Figura 26 se indica la información nutrimental de ésta.

Info. Nutricional	
Tamaño de la Porción	100 g
Por porción	
Energía	3774 kJ 902 kcal
Proteína	0g
Carbohidratos	0g
Fibra	0g
Azúcar	0g
Grasa	100g
Grasa Saturada	39,2g
Grasa Poliinsaturada	11,2g
Grasa Monoinsaturada	45,1g
Colesterol	95mg
Sodio	0mg
Potasio	0mg

Figura 26. Información nutricional de la manteca de cerdo empleada en la dieta (Tomada de The FatSeceret Platform API).

Se pesaron semanalmente los roedores para obtener el peso ganado y se registró el alimento consumido. En la última semana se midió el índice de Lee, para determinar si alcanzaron la obesidad. Se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{Peso corporal (g)}}}{\text{Longitud ocico} - \text{ano (cm)}}$$

Un valor igual o menor a 0.300 es considerado como normal, mientras que un valor mayor de 0.300, las ratas fueron clasificadas como obesas.

7.13.2 Evaluación del efecto antiinflamatorio y antiobesogénico del extracto fenólico de *Cosmos bipinnatus* Cav. administrado por vía oral a Ratas Wistar

Se inició el tratamiento de los cuatro grupos, al primero se le administró agua destilada, al segundo quercetina en una concentración de 10 mg/Kg, al tercero y cuarto, el extracto fenólico de *Cosmos bipinnatus* en concentraciones 100 mg/Kg y 200 mg/Kg, respectivamente. El tratamiento se administró durante 28 días mediante una cánula por vía oral forzada. Al inicio de este tratamiento se tomó una muestra sanguínea de la cola de las ratas, al igual que al finalizar los 28 días se volvió a tomar otra muestra, para obtener el suero y congelarlo para análisis posteriores.

7.13.3 Sacrificio y obtención de muestras biológicas

El sacrificio de las ratas Wistar se llevó a cabo después de cuatro semanas de tratamiento. La mañana del sacrificio se les realizó una medición de glucosa en sangre con un glucómetro One touch.

Posteriormente las ratas fueron sacrificadas, mediante la DL50 (135 mg/kg de peso corporal) de pentobarbital sódico vía intraperitoneal. Se extrajeron muestras de sangre por rata, mediante punción cardiaca y se extrajo el hígado de todas las ratas para su posterior análisis. Una de las muestras de sangre se envió al laboratorio EDULAB para las diferentes determinaciones de química sanguínea, perfil hepático, perfil lipídico. También se pesaron varios órganos de las ratas (Pulmones, hígado, riñones, grasa visceral) para conocer si había alguna diferencia entre los grupos en estudio.

7.13.4 Determinación de perfil lipídico y hepático de los sueros de las ratas Wistar

El perfil de lípidos (triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, lípidos totales) y el perfil hepático, (bilirrubina total, aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), gamma glutamil transpeptidasa (GGT)), se realizaron en el laboratorio de análisis clínicos y microbiológicos EDULAB, ubicado en Morelia Michoacán. Método: Colorimetría enzimática Cobas c111 ROCHE Diagnostics.

8. Resultados y discusión

8.1 Determinación de humedad

La muestra seca de *C. bipinnatus* tuvo un porcentaje de humedad de $8.76\% \pm 0.1$. Este resultado está dentro de los obtenidos con otras especies; se encuentra por encima del determinado para hojas secas de *Cosmos peucedanifolious* (panti) cuyo contenido de humedad fue de 5.83% (Choque-Salas, 2011). Es importante que la muestra tenga un contenido de humedad menor del 10% para así interrumpir los procesos de degradación de metabolitos, causados por enzimas, bacterias, hongos, o reacciones de hidrólisis y oxidación.

8.2 Porcentaje de rendimiento

A continuación, se presenta la Tabla 12 en donde se muestran los porcentajes de rendimiento obtenidos con cada tratamiento de la muestra:

Tabla 12. Rendimiento de diferentes extractos de *Cosmos bipinnatus* cav.

No. de identificación	Método	Temperatura	Solvente	Porcentaje de rendimiento
8	Ultrasonido	60°C	EtOH 50%	20.39 ± 0.12 ^A
5	Ultrasonido	25°C	EtOH 70%	18.46 ± 0.13 ^B
6	Ultrasonido	25°C	EtOH 50%	18.26 ± 0.24 ^B
7	Ultrasonido	60°C	EtOH 70%	18.39 ± 0.20 ^B
1	Maceración	25°C	EtOH 70%	16.36 ± 0.32 ^C
2	Maceración	25°C	EtOH 50%	15.65 ± 0.20 ^D
3	Maceración	60°C	EtOH 70%	15.58 ± 0.20 ^D
4	Maceración	60°C	EtOH 50%	14.91 ± 0.12 ^E

Los niveles no conectados por la misma letra por columna son significativamente distintos. Tukey (p=0.05).

Para realizar la comparación de los diferentes tratamientos de extracción a los que sometió la planta seca *C. bipinnatus*, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en el programa estadístico JMP. De igual manera se realizó la prueba de Tukey - Kramer (p = 0.05).

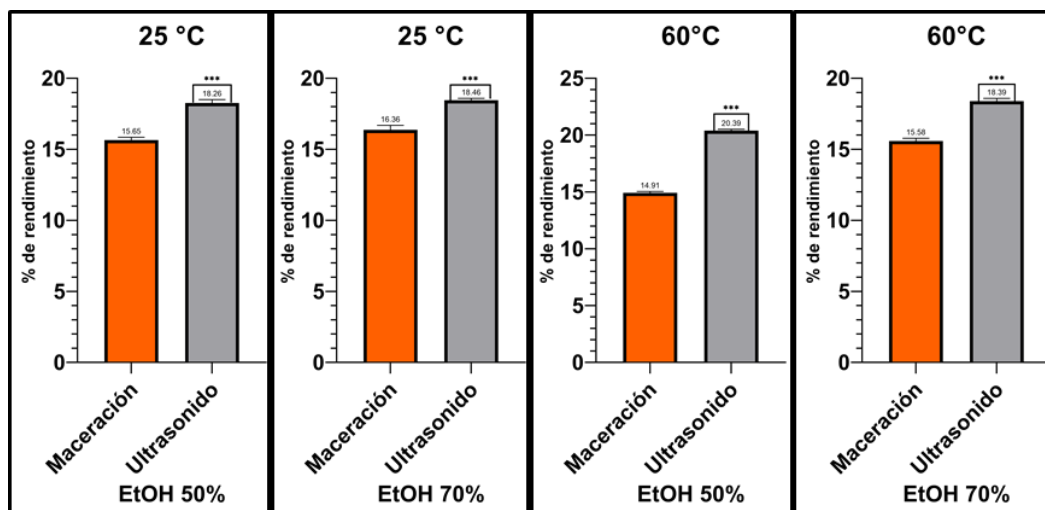


Figura 27. Comparación del porcentaje de rendimiento.

Se observó que el método de ultrasonido a 60 °C con EtOH al 50% arrojó el mayor porcentaje de rendimiento. Al realizar una correlación de Pearson se encontró que la temperatura y el solvente no tuvieron significancia estadística para la determinación de este parámetro. En cambio, existió una diferencia significativa (p < 0.001) para los dos métodos de extracción evaluados. Esto concuerda con el estudio realizado por Deng y col. (2017) donde encontraron que la extracción por

ultrasonido arroja un mayor porcentaje de rendimiento debido a su fundamento donde en éste, el solvente logra tener mayor contacto con el soluto debido al proceso de cavitación.

8.3 Contenido de polifenoles totales

Construyendo la curva de calibración con ácido gálico se obtuvo la siguiente ecuación de la recta y $= 0.0072x + 0.0223$, $R^2 = 0.9973$ y con ella se lograron determinar las concentraciones de cada tratamiento expresadas en mgEAG que se muestran en la Tabla 13:

Tabla 13. Contenido de polifenoles totales para los diferentes extractos de *Cosmos bipinnatus*.

No. de identificación	Método	Temperatura	Solvente	mgEAG/g de extracto seco
8	Ultrasonido	60°C	EtOH 50%	86.32 ± 3.54 ^A
7	Ultrasonido	60°C	EtOH 70%	89.33 ± 3.87 ^A
6	Ultrasonido	25°C	EtOH 50%	86.20 ± 1.81 ^{AB}
5	Ultrasonido	25°C	EtOH 70%	83.20 ± 4.78 ^{BC}
4	Maceración	60°C	EtOH 50%	78.90 ± 5.7 ^{CD}
3	Maceración	60°C	EtOH 70%	63.18 ± 4.47 ^{DE}
1	Maceración	25°C	EtOH 70%	61.42 ± 1.74 ^E
2	Maceración	25°C	EtOH 50%	58.04 ± 5.93 ^E

Los niveles no conectados por la misma letra por columna son significativamente distintos. Tukey (p=0.05).

La mayor concentración de compuestos polifenólicos (mgEAG/g de extracto seco) se encontró en el tratamiento de ultrasonido a 60 °C con EtOH al 70% y al 50%. De acuerdo con algunos autores, entre ellos Safdar y col. (2016), consideran que la extracción asistida por ultrasonido es una técnica más eficiente y condujo a un contenido de polifenoles comparativamente más alto que la maceración. Así como también la temperatura influyo en este resultado ya que se obtuvieron mejores extracciones a 60 °C, coincidiendo con Spigno y col. (2007), en su análisis hecho con dos temperaturas diferentes, obteniendo mayor contenido de fenoles a 60 °C. Mientras que el último parámetro que es el solvente utilizado no presento significancia estadística para esta determinación; en contraste con el autor antes mencionado el cual concluye que la adición de agua al etanol mejora la tasa de extracción.

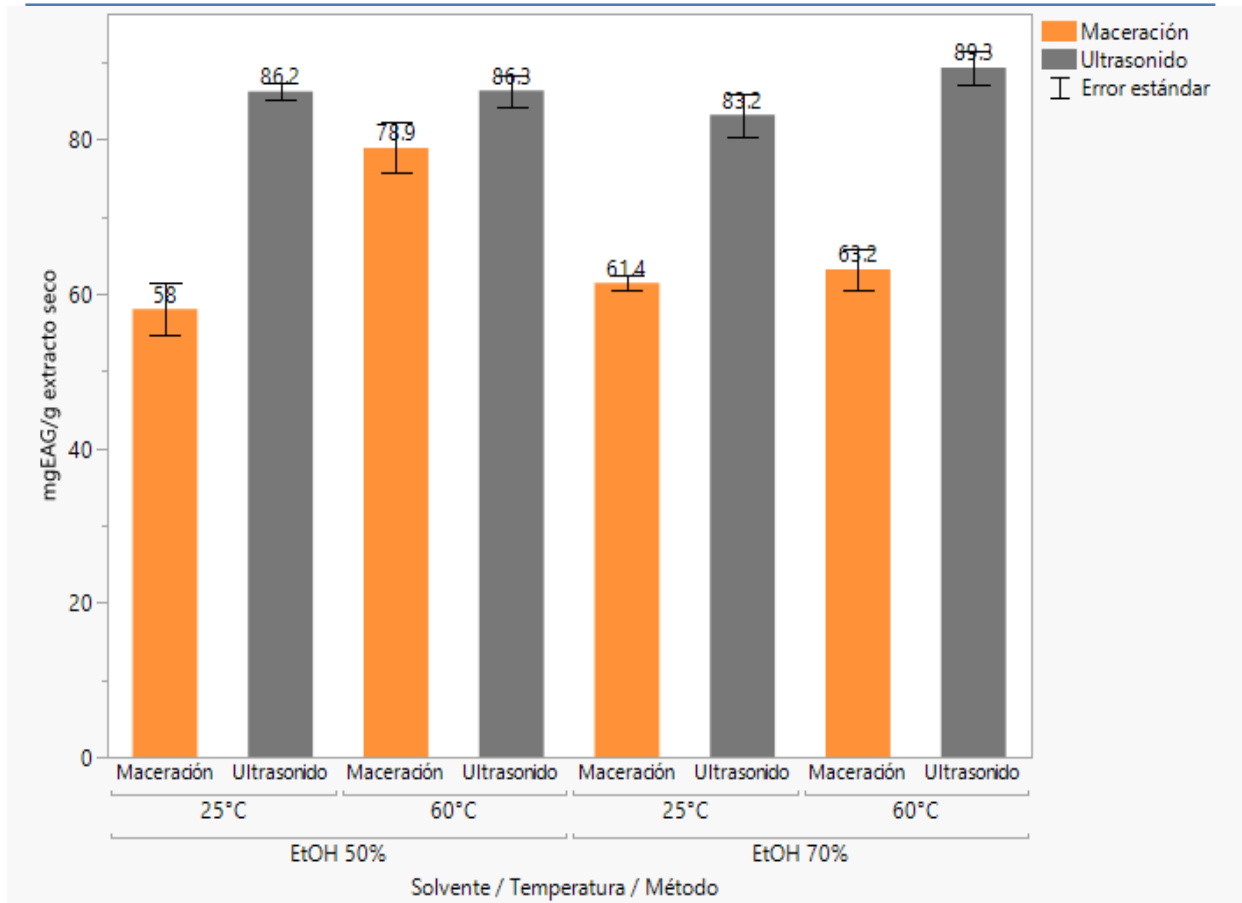


Figura 28. Contenido de fenoles totales.

8.4 Contenido de flavonoides totales

Construyendo la curva de calibración con quercetina se obtuvo la siguiente ecuación de la recta $y = 0.0221x + 0.0023$, y una $R^2 = 0.9984$ y con ella se lograron determinar las concentraciones de cada tratamiento expresadas en mgEQ que se muestran en la Tabla 14:

Tabla 14. Contenido de flavonoides con diferentes condiciones de extracción.

No. de identificación	Método	Temperatura	Solvente	mgEQ/g de extracto seco
7	Ultrasonido	60°C	EtOH 70%	68.73 ± 2.37^A
6	Ultrasonido	25°C	EtOH 50%	56.92 ± 2.20^{AB}
8	Ultrasonido	60°C	EtOH 50%	50.46 ± 1.43^{AB}

5	Ultrasonido	25°C	EtOH 70%	47.31 ±3.45 ^{BC}
4	Maceración	60°C	EtOH 50%	35.13 ±3.11 ^{CD}
2	Maceración	25°C	EtOH 50%	34.33 ± 1.10 ^{DE}
1	Maceración	25°C	EtOH 70%	33.11 ± 1.11 ^{DE}
3	Maceración	60°C	EtOH 70%	32.73 ±0.40 ^E

Los niveles no conectados por la misma letra por columna son significativamente distintos. Tukey (p=0.05).

Nuevamente se obtuvo la mayor cantidad de flavonoides con las mismas condiciones de extracción: Ultrasonido a 60 °C con EtOH 70%.

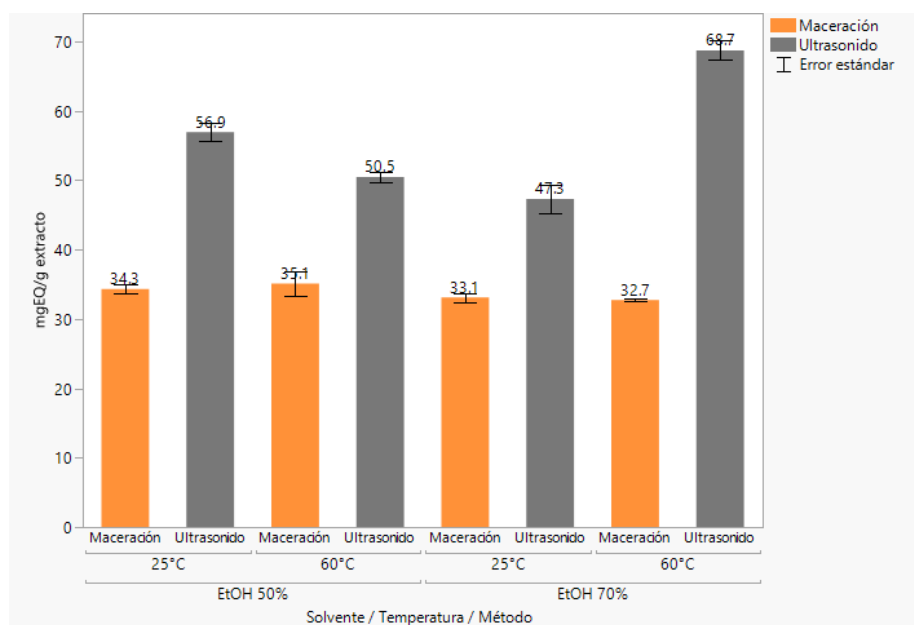


Figura 29. Contenido de Flavonoides totales.

8.5 Caracterización química del extracto

Para las siguientes pruebas se seleccionaron los extractos que dieron los mejores resultados en extracción, siendo para la maceración y el ultrasonido en los que se utilizaron 60 °C y solvente etanólico al 70%.

Mediante la técnica de Cromatografía líquida de alta eficacia, se logró identificar diferentes compuestos fenólicos a través de la comparación de los tiempos de retención de los compuestos estándares (Tabla 15) y sus picos en los cromatogramas a diferentes longitudes de onda.

Tabla 15. Composición fenólica de dos extractos etanólicos de *Cosmos bipinnatus* Cav.

Clase	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ultrasonido (µg/mL)	Maceración (µg/mL)
Ácidos fenólicos	Ácido 4-p-OH-benzoico	17.083	5.4640	2.0473
	Ácido clorogénico	21.506	164.8425	186.5256
	Ácido vanílico	22.093	1.0812	-
	Ácido cafeico	22.411	1.7673	3.5131
Polifenoles	Quercetina	46.971	6.1600	6.1600

Según un análisis realizado por Saleem y col. (2017), mediante HPLC, encontraron que el extracto acuametanólico de *Cosmos bipinnatus* Cav. contenía quercetina, ácido gálico, ácido cafeico y ácido clorogénico. Sin embargo, en nuestro análisis de HPLC coincidió con el contenido excepto que el ácido gálico no fue encontrado.

A continuación, se muestran los cromatogramas de los compuestos encontrados.

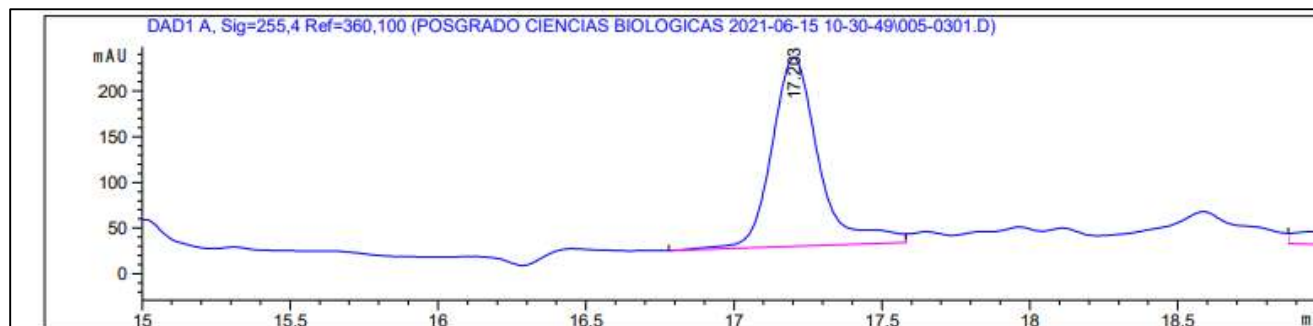


Figura 30. Cromatograma del ácido 4-hidroxibenzoico a 255nm

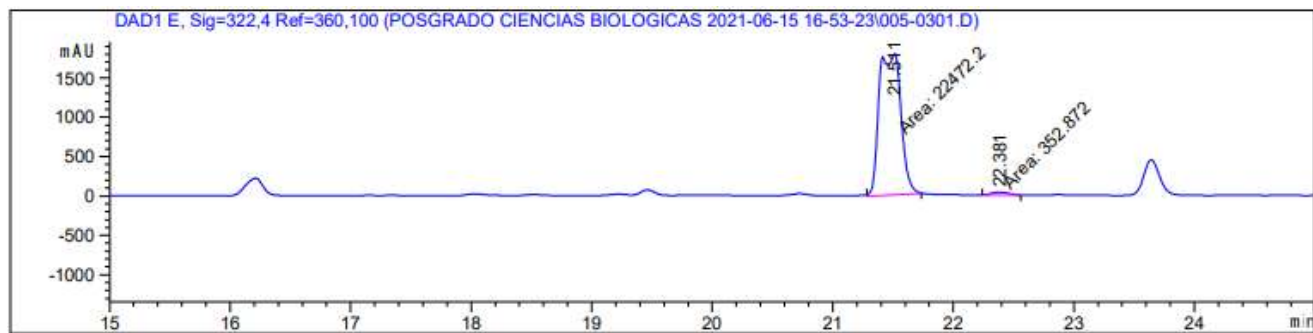


Figura 31. Cromatograma de los ácidos clorogénico y cafeico a 322nm.

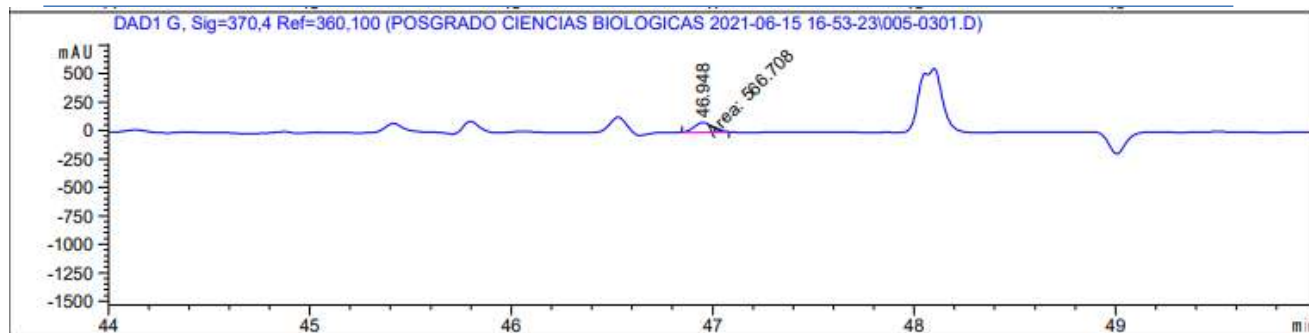


Figura 32. Cromatograma de la quercetina a 370 nm.

De acuerdo con la siguiente tabla, algunas especies de *Cosmos* tienen los mismos componentes, es por estos que se les atribuyen la mayoría de sus propiedades antioxidantes (Janne y col., 2020) (Saleem y col., 2017) (Cheng y col., 2015).

8.6 Capacidad antioxidante

8.6.1 Radical DPPH

Los extractos se evaluaron por su reactividad frente a un radical libre estable DPPH. Este radical se ha utilizado comúnmente para medir el estado antioxidante total de varias muestras biológicas debido a su buena reproducibilidad y fácil control de calidad. Obteniendo un mayor efecto para eliminar este radical con el extracto obtenido mediante maceración, contrario al contenido de fenoles y flavonoides, los cuales se obtuvieron en mayor concentración en los extractos obtenidos por ultrasonido. Jang y col. (2008), evaluaron la capacidad para inhibir este radical en cuatro colores de *Cosmos bipinnatus* Cav., encontrando que la flor color violeta tuvo el mayor efecto eliminador de radicales DPPH, con un IC_{50} de 610 ppm, muy parecido al que obtuvimos en nuestro ensayo.

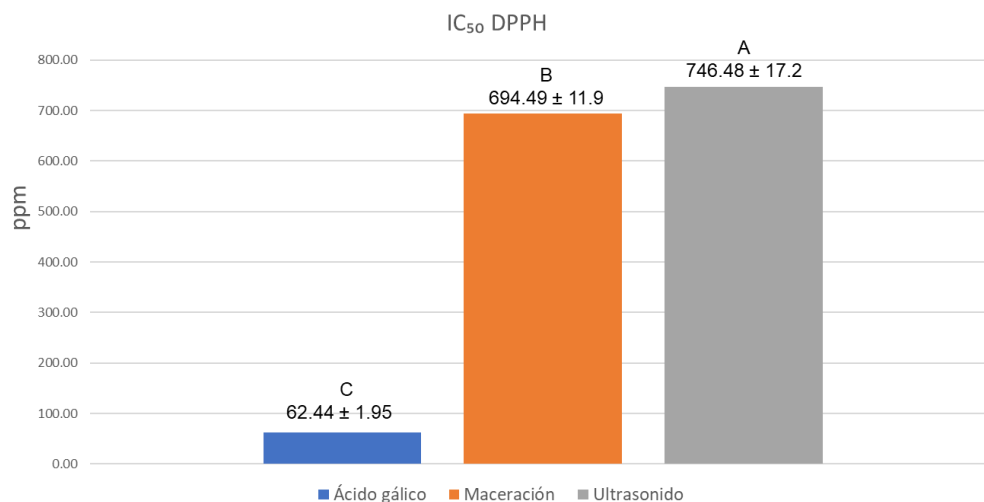


Figura 33. Capacidad de inhibición al radical DPPH.

8.6.2 Radical ABTS

El extracto también se evaluó frente al radical libre ABTS, al igual que el radical DPPH son muy empleados para medir la capacidad antioxidante debido a su buena reproducibilidad. Obteniendo como resultado que el extracto obtenido mediante maceración tiene un poder de inhibición mayor, incluso que Trolox que en este ensayo fue nuestro control. Jang y col. (2008), vuelven a coincidir que la menor concentración necesaria para inhibir el 50% de este radical se encontró en *Cosmos bipinnatus* Cav. color violeta.

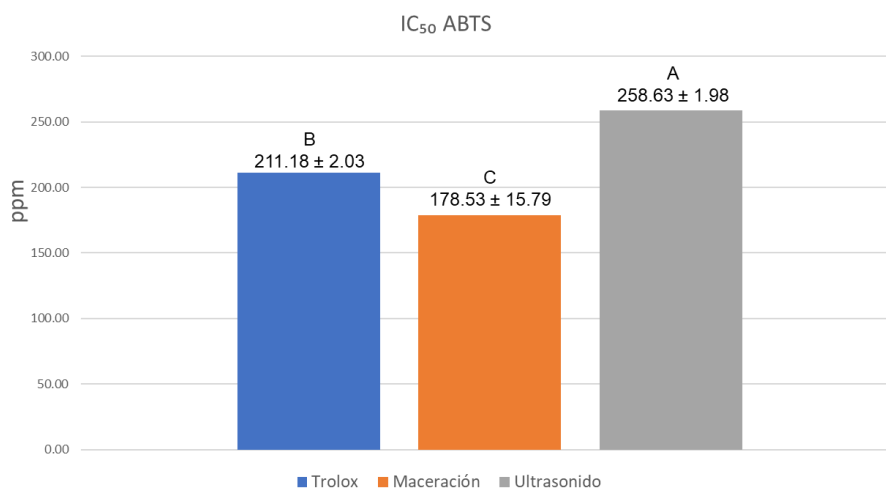


Figura 34. Capacidad de inhibición al radical ABTS.

8.6.3 Peróxido de hidrógeno

Contrario a los dos radicales anteriores, el % scavenging del H₂O₂ se logró obtener con una menor concentración del extracto obtenido por ultrasonido, incluso muy por debajo de nuestro control que fue Oligopin®. Cabe mencionar que los dos radicales anteriormente mencionados no son producidos naturalmente en nuestro cuerpo, y que debido a las estructuras químicas de los compuestos fenólicos contenidos en los extractos se puede entender que exista una afinidad diferente por cada uno de los radicales.

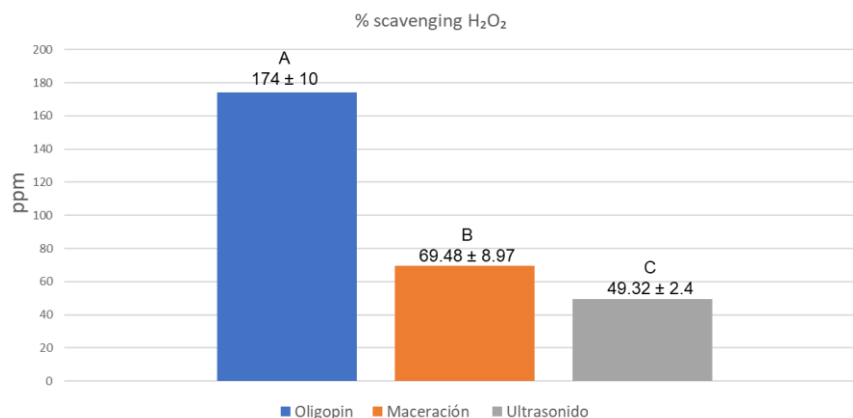


Figura 35. % scavenging del H₂O₂.

Tabla 16. Capacidad antioxidante de extractos obtenidos por diferente método.

	Maceración	Ultrasonido
DPPH	694.49 ± 11.9 ^B	746.48 ± 17.2 ^A
ABTS	178.53 ± 15.79 ^B	258.63 ± 1.98 ^A
H₂O₂	69.48 ± 8.97 ^A	49.32 ± 2.4 ^B

Los niveles no conectados por la misma letra por fila son significativamente distintos. Tukey (p=0.05)

Existe discrepancia entre el contenido de compuestos fenólicos en el extracto obtenido por ultrasonido y su capacidad antioxidante, puesto que existe un mayor contenido de CF, se esperaría que tenga una mejor capacidad antioxidante, sin embargo, Jang y col. (2008) mencionan que las actividades de algunos antioxidantes se han atribuido a varios mecanismos, como la prevención del inicio de la cadena, la unión de catalizadores de iones de metales de transición, la descomposición de peróxidos, la prevención de la abstracción continua de hidrógeno y la eliminación de radicales. Por lo tanto, no siempre puede haber una correlación lineal entre las actividades antioxidantes entre sí. Son necesarios más ensayos con otros radicales libres, para poder concluir con qué tipo de extracción se obtiene mejor capacidad antioxidante.

8.7 Determinación de obesidad

Para lograr la obesidad en las ratas, se hizo una modificación en su dieta, en el tiempo de adaptación las ratas consumían 23.9 g de alimento diario, mientras que después de determinar la obesidad en

ellas, el consumo aumentó a 26.3 g de alimento diario. La obesidad de las ratas se calculó mediante el índice de Lee. En la tabla 17 se muestran los valores obtenidos para cada una de las ratas en estudio, de acuerdo con éste, todas las ratas alcanzaron la obesidad puesto que un resultado mayor de 0.300 es positivo para obesidad. Según Rahman y col. (2017) ratas alimentadas con una dieta regular no modificada, obtuvieron un aumento de peso de 102.6%, mientras que las alimentadas con una dieta alta en grasas aumentaron un 154.0% de peso.

Tabla 17. Índice de Lee para determinación de obesidad.

Rata No.	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Peso ganado (g)	Longitud hocico-ano (cm)	Índice de Lee
1	516.4	667	150.6	24	0.364
2	543.3	750	206.7	24	0.379
3	506	634	128	25	0.344
4	561.1	734	172.9	25	0.361
5	526.8	640	113.2	23	0.375
6	506.8	646	139.2	25	0.346
7	527.4	722	194.6	24	0.374
8	490.2	678	187.8	27	0.325
9	534.5	701	166.5	27	0.329
10	524.9	637	112.1	26	0.331
11	500.4	711	210.6	26	0.343
12	513.5	678	164.5	25	0.351
13	520.2	675	154.8	24	0.366
14	513.7	701	187.3	26	0.342
15	498.8	595	96.2	25	0.336
16	582	753	171	25	0.364
17	544	738	194	27	0.335
18	511.1	689	177.9	27	0.327
19	564.4	700	135.6	24	0.370
20	507.7	655	147.3	28	0.310
21	533.9	713	179.1	26	0.344
22	523.2	704	180.8	25	0.356
23	457.4	567	109.6	25	0.331
24	453	591	138	25	0.336

8.8 Determinación de glucosa

Al realizar la determinación de glucosa en los cuatro grupos de ratas, se encontró diferencia

significativa entre el grupo tratado con agua respecto a los otros tres grupos tratados con quercetina y con extracto de *C. bipinnatus* Cav. de 100 mg/kg y 200 mg/kg, respectivamente. Según el estudio de Wang y col. (2010) el límite superior de glucosa en sangre en ratas es de 111.6 mg/dL. En la tabla 18 se muestra que el nivel de glucosa del grupo tratado con agua está muy cerca de llegar a este límite. Mahesh y Menon (2004), reportaron que la quercetina redujo el estrés oxidativo y el nivel de glucosa en ratas diabéticas; el efecto hipoglucemiante de ésta puede deberse a su propiedad antioxidante. Por lo tanto, los resultados obtenidos de los grupos tratados con quercetina y extracto de *C. bipinnatus*, indican que tienen un efecto hipoglucemiante.

Tabla 18. Determinación de glucosa en los cuatro grupos de ratas con diferentes tratamientos.

	T1	T2	T3	T4
Glucosa (mg/d L)	106.20 ± 6.14 ^a	81.60 ± 3.21 ^{bc}	91.20 ± 9.26 ^b	89.00 ± 2.92 ^{bc}

Valor promedio de 5 repeticiones ± desviación estándar. Medias con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0.10$). T1 = Grupo tratado con agua, T2 = Grupo tratado con quercetina, T3 = Grupo tratado con extracto de *Cosmos bipinnatus* Cav. de 100 mg/kg, T4 = Grupo tratado con extracto de *Cosmos bipinnatus* Cav. de 200 mg/kg.

8.9 Perfil lipídico

En la determinación del perfil lipídico, al final de las cuatro semanas no se observaron diferencias significativas ($p > 0.1$) en el contenido de triglicéridos ni de colesterol-LDL entre el grupo control y los grupos tratados con quercetina y los extractos de *C. bipinnatus*. En el colesterol total se observó una diferencia significativa del grupo control con respecto al de la quercetina y con el grupo administrado con 200 mg/kg del extracto de *C. bipinnatus*. Perumal y col. (2014), en un estudio tomo muestras al inicio, intermedio y final del tratamiento, en el cual fue más notoria la disminución en el colesterol plasmático en ratas tratadas con un extracto etanólico de una especie de la familia Cosmos. En los lípidos totales el valor para el grupo tratado con una dosis de 200 mg/kg de extracto de *C. bipinnatus* fue de 240.80 mg/dL mientras que el tratado con agua fue de 289.35 mg/dl indicando que el tratamiento con extracto redujo el valor en 16.7%. Situación similar a lo que sucedió con los triglicéridos, si bien no existió diferencia significativa, si disminuyeron de manera importante los valores del grupo que recibió las dosis de extracto de Cosmos.

Tabla 19. Determinación de perfil lipídico en suero e hígado en ratas Wistar al final de 4 semanas de tratamiento.

	T1	T2	T3	T4
Suero				
Triglicéridos (mg/dL)	101.30 ± 22.58 ^a	98.55 ± 29.93 ^a	91.10 ± 13.42 ^a	87.07 ± 14.36 ^a
Colesterol (mg/dL)	59.03 ± 3.03 ^a	54.54 ± 2.83 ^{ab}	56.93 ± 3.66 ^a	50.07 ± 2.96 ^b
Colesterol-HDL (mg/dL)	28.96 ± 2.42 ^a	23.17 ± 3.19 ^b	28.68 ± 2.75 ^a	23.50 ± 2.75 ^b
Colesterol-LDL (mg/dL)	12.98 ± 2.25 ^a	11.73 ± 2.23 ^a	10.24 ± 2.76 ^a	9.15 ± 4.09 ^a
Lípidos totales (mg/dL)	289.35 ± 28.91 ^a	267.90 ± 18.40 ^{ab}	259.40 ± 18.01 ^{ab}	240.80 ± 31.43 ^b
Hígado				
Colesterol (mg/dL)	29.13 ± 2.986 ^a	21.22 ± 21.22 ^a	25.61 ± 8.14 ^a	26.86 ± 6.74 ^a

Valor promedio de 5 repeticiones ± desviación estándar. Medias con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0.10$). T1 = Grupo tratado con agua, T2 = Grupo tratado con quercetina, T3 = Grupo tratado con extracto de *Cosmos bipinnatus* Cav. de 100 mg/kg, T4 = Grupo tratado con extracto de *Cosmos bipinnatus* Cav. de 200 mg/kg.

8.10 Perfil hepático

Las pruebas del perfil hepático se realizaron para determinar si había algún efecto tóxico como resultado de la administración oral o el tratamiento con el extracto de *C. bipinnatus* Cav. Esta evaluación es muy importante para determinar la seguridad del extracto para su aplicación posterior (Rahman y col. 2017). Los resultados mostraron que tanto la dosis más baja como la más alta del extracto no fue significativamente diferente con el de los grupos tratados con quercetina y agua (Tabla 20), excepto la bilirrubina directa e indirecta donde si existió diferencia significativa, así como en la fosfatasa alcalina. Los niveles de TGO, TGP Y GGT cambiaron de manera no significativa en los grupos tratados con extracto de *C. bipinnatus* Cav., en comparación con el grupo tratado con agua. Se observó que la administración de dosis altas y bajas de extracto en los grupos tratados con él durante 4 semanas no indujo ningún efecto tóxico adverso detectable en las ratas estudiadas.

Tabla 20. Valores de perfil hepático realizado después de 4 semanas de tratamiento de ratas Wistar.

	T1	T2	T3	T4
Bilirrubina total (mg/dL)	0.10 ± 0.00 ^a	0.08 ± 0.04 ^a	0.10 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.00 ^a
Bilirrubina directa (mg/dL)	0.10 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.05 ^{ab}	0.02 ± 0.04 ^b	0.08 ± 0.04 ^{ab}
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	0.02 ± 0.04 ^a	0.02 ± 0.04 ^a	0.08 ± 0.04 ^b	0.02 ± 0.00 ^a
TGO (U/L)	114.48 ± 32.99 ^a	111.42 ± 14.04 ^a	119.52 ± 25.39 ^a	107.78 ± 20.97 ^a
TGP (U/L)	53.14 ± 13.48 ^a	42.02 ± 15.24 ^a	44.84 ± 14.99 ^a	40.82 ± 18.30 ^a
Fosfatasa alcalina (U/L)	106.54 ± 22.69 ^a	64.78 ± 16.69 ^b	61.10 ± 13.43 ^b	57.12 ± 8.07 ^b
GGT (U/L)	0.46 ± 0.43 ^a	0.24 ± 0.48 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.08 ± 0.18 ^a
Deshidrogenasa láctica (U/L)	811.10 ± 340.93 ^a	857.46 ± 374.78 ^a	983.76 ± 465.59 ^a	702.08 ± 133.26 ^a
Proteínas totales (g/dL)	5.92 ± 0.41 ^a	5.60 ± 0.12 ^a	5.86 ± 0.30 ^a	5.92 ± 0.29 ^a
Albúmina (g/dL)	4.14 ± 0.26 ^a	3.91 ± 0.18 ^a	4.22 ± 0.32 ^a	4.19 ± 0.08 ^a
Globulina (g/dL)	1.86 ± 0.16 ^a	1.73 ± 0.24 ^a	1.64 ± 0.21 ^a	1.71 ± 0.25 ^a
Relación A/G (g/dL)	2.34 ± 0.23 ^a	2.31 ± 0.40 ^a	2.61 ± 0.47 ^a	2.48 ± 0.36 ^a

Valor promedio de 5 repeticiones ± desviación estándar. Medias con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0.05$). T1 = Grupo tratado con agua, T2 = Grupo tratado con quercetina, T3 = Grupo tratado con extracto de *Cosmos bipinnatus* Cav. de 100 mg/kg, T4 = Grupo tratado con extracto de *Cosmos bipinnatus* Cav. de 200 mg/kg.

8.11 Peso de órganos

Los resultados muestran que las ratas tratadas con las diferentes concentraciones de extracto de *C. bipinnatus*, quercetina y agua, no presentaron diferencia significativa en el peso de los órganos, sin

embargo, con respecto a la grasa visceral si existió una disminución significativa entre el grupo control (71.91 g) con respecto al grupo administrado con los extractos de *C. bipinnatus* en la dosis de 100 mg/kg (59.28 g) y 200mg/Kg (55.18 g) y parcial significativa con quercetina (64.63) (Tabla 21). La suplementación de ratas tratadas con extracto de *C. bipinnatus* Cav. a concentración de 100 y 200 mg/kg disminuyó la ganancia de peso corporal en comparación con las ratas tratadas con agua. La supresión del aumento de peso corporal se acompañó de una disminución de la masa grasa visceral entre los grupos tratados. No obstante, el extracto de *C. bipinnatus* Cav. no causó ninguna supresión significativa en el peso corporal, así como en su masa de grasa visceral en las ratas tratadas con agua en comparación con los grupos tratados con quercetina y con extracto. Raham y col. (2017), realizaron un experimento usando la hoja de *Cosmos caudatus* donde obtuvieron disminución en peso de las ratas tratadas con el extracto, pero no fue una diferencia significativa, ellos concluyeron que el extracto de *Cosmos caudatus* no impactaba significativamente en la disminución del peso de ratas obesas.

Tabla 21. Peso de algunos órganos de ratas Wistar después de 4 semanas de tratamiento.

	T1	T2	T3	T4
Pulmones (g)	2.26 ± 0.42 ^a	2.71 ± 0.51 ^a	2.31 ± 0.48 ^a	2.44 ± 0.64 ^a
Riñones (g)	3.54 ± 0.38 ^a	3.67 ± 0.32 ^a	3.64 ± 0.47 ^a	3.41 ± 0.16 ^a
Hígado (g)	18.63 ± 2.52 ^a	18.79 ± 2.09 ^a	17.76 ± 2.26 ^a	17.00 ± 1.87 ^a
Testículos (g)	4.36 ± 0.18 ^a	4.39 ± 0.23 ^a	3.94 ± 1.40 ^a	4.62 ± 0.76 ^a
Grasa visceral (g)	71.91 ± 6.04 ^a	64.63 ± 2.87 ^{ab}	59.28 ± 7.65 ^b	55.18 ± 10.87 ^b

Valor promedio de 5 repeticiones ± desviación estándar. Medias con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes (p<0.10). T1 = Grupo tratado con agua, T2 = Grupo tratado con quercetina, T3 = Grupo tratado con extracto de *Cosmos bipinnatus* Cav. de 100 mg/kg, T4 = Grupo tratado con extracto de *Cosmos bipinnatus* Cav. de 200 mg/kg.

9. Conclusiones

El presente estudio reveló que las condiciones óptimas para obtener el mayor contenido de compuestos fenólicos en el extracto de la especie *Cosmos bipinnatus* Cav. fue usando como solvente etanol al 50%, ultrasonido como método de extracción y una temperatura de extracción de 60 °C. El extracto etanólico de la especie *C. bipinnatus* Cav., tuvo un alto contenido de compuestos fenólicos, y específicamente se identificaron el ácido 4-p-OH-benzoico, ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido cafeico y quercetina. La capacidad antioxidante del extracto se midió frente a los radicales ABTS Y DPPH, obteniendo una capacidad superior comparado con compuestos antioxidantes de referencia (ácido gálico y trolox). Si bien se consiguió una disminución en la ingesta de alimento y ganancia de peso en las ratas tratadas con las dos concentraciones de extracto de *C. bipinnatus* Cav., no fue suficiente para que se constatará una diferencia significativa frente al grupo control. Este estudio sugiere que el tratamiento con el extracto etanólico de *C. bipinnatus* Cav. a ratas obesas durante cuatro semanas fue eficaz para disminuir algunos biomarcadores obesogénicos como fueron glucosa, colesterol total, y lípidos totales séricos así como la grasa visceral, siendo más efectivo el tratamiento que incluyó la dosis de 200 mg/Kg de peso corporal. Así como también no se observaron efectos tóxicos adversos detectables en el perfil hepático realizado al finalizar el tratamiento.

10. Referencias

- Aso Y., Okumura K., Takebayashi K., Wakabayashi S., Inukai T. (2003) Relationships of plasma interleukin-18 concentrations to hyperhomocysteinemia and carotid intimal-media wall thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26:2622-7.
- Azwanida N.N. (2015) Una revisión sobre el uso de métodos de extracción en plantas medicinales, principio, fuerza y limitación. *Plantas Aromáticas Medicinales*, 4:196. doi: 10.4172 / 2167-0412.1000196
- Barroso P. A. (2019). Mecanismos moleculares asociados a la inflamación, obesidad y resistencia a la insulina. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 9. Obtenido de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ALMUDENA%20BARROSO%20PEINADO.pdf>
- Beltrán D. Y., Morris Q. H., de la Cruz E. R., Quevedo M. Y. y Bermúdez S. R. C. (2013). Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(2):121-129.
- Bindoli A, Valente M, Cavallini L. (1985). Inhibitory action of quercetin on xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activity. *Pharmacological Research Communications*, 17:831–839.
- Boots AW, Haenen GR, Bast A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585:325-337.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie*, 22:25-30.
- Bruun J. M., Helge J.W., Richelsen B., Stallknecht B (2006). Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 290:961-7
- Cedillo C.D. 2006. Tesis de maestría. Identificación de los compuestos fenólicos en el capulín *Prunus serotina* Ehrh y evaluación de su capacidad antioxidante y estabilidad en mermeladas. ENCB-IPN.
- Cheng, S. H., Barakatun-Nisak, M. Y., Anthony, J., & Ismail, A. (2015). Potential medicinal benefits of *Cosmos caudatus* (Ulam Raja): A scoping review. *Journal of Research in Medical*

Sciences, 20(10): 1000–1006. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.172796>

- Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, Lee MK. (2010). El ácido clorogénico exhibe propiedades contra la obesidad y mejora el metabolismo de los lípidos en ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas. *Toxicol Químico Alimentario*, 48:937-43.
- Choque Estrada, C. T., & Salas Cárdenas, E. L. (2011). Evaluación del efecto inhibitorio sobre la respuesta alérgica y determinación de la toxicidad aguda del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (Licenciatura). Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco.
- Corona J. E., Martínez N. N., Ruiz E. H. y Carranza C. J. (2016). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chia (*Salvia hispanica* L.) y su actividad antioxidante. *Agrociencia*, 50(4):403-412.
- Covarrubias, D., Coria A. G. A., Fernández P. C., Aranda A., G. E, Manzo D. J. & Hernández, M. E. (2015). La obesidad como factor de riesgo en el desarrollo de cáncer. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(4), 766-776.
- Cruz M. A., Villagrán V. E., Velázquez R. A. S., Vernon C. E. J., Cruz S. F., Orozco V. J. y Buendía G. L. (2014). Exploring the Cr (VI) Phytoremediation Potential of *Cosmos bipinnatus*. *Water, Air & Soil Pollution*, 225(11):2166.
- Dávila T. J., González I. J. y Barrera C. A., (2015). Panorama de la obesidad en México. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 53(2): 240-9.
- Deng, J., Xu, Z., Xiang, C., Liu, J., Zhou, L., Li, T., ... Ding, C. (2017). Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37:328–334.
- Dewanto V., Wu X., Adom K. K., Liu R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10):3010-3014.
- Drago S. M. E., López L. M. y Sainz E. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37:58-68.
- Fallon, A., Booth, R., y Bell, L. (1987). Applications of HPLC in biochemistry (1.^a ed.). EE. UU.: Elsevier Science Ltd.
- Fernández S. A., Madrigal S. E., Bautista M., Esquivel S. J., Morales G. A., Esquivel C. C., Durante M. I., Sánchez R. G., Valadez V. C., Morales G. J. A. (2011). Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5): 3117-3132.

doi:10.3390/ijms12053117

- González B. L., Díaz G. R., Castillo G. C., Nieto C. A., Méndez I. D. (2017). Phenolic compounds: presence, identification and antioxidant activity in plants and fruits. *Mexican Journal of Biotechnology*, 2:46-64. 10.29267/mxjb.2017.2.1.46.
- Heike Vibrans (2009). *Cosmos bipinnatus* cav. Conabio. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/cosmos-bipinnatus/fichas/ficha.htm>, 02 de septiembre 2020.
- INECOL Bajío. (2008). Flora del bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 157.
- Jang I., Park J., Park E., Park H. y Lee S. (2008). Actividad antioxidante y antígenotóxica de extractos de flores de Cosmos (*Cosmos bipinnatus*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 63:205–210.
- Juárez R. C. R., Aguilar C. J. A., Juárez R. M. E., Bugarín M. R., Juárez L. P. y Cruz C. E. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista Bio Ciencias*, 2(3):119-129.
- Kang, M., X. Liu, Y. Fu, and W. Timothy Garvey. (2018). Improved systemic metabolism and adipocyte biology in miR-150 knockout mice. *Metabolism*, 83: 139-48.
- Korc I., Bidegain M., Martell M. (1995). Radicales libres, bioquímica y sistemas antioxidantes, implicancia en la patología neonatal. *Revista Médica del Uruguay*, 11:121-135.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4):726-732
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., y Chandra, N. (2010). Radicales libres, antioxidantes y alimentos funcionales: Impacto en la salud humana. *Críticas de farmacognosy*, 4(8): 118–126.
- Matsuzawa, T., Hayashi, Y., Nomura, M., Unno, T., Igarashi, T., Furuya, T. y T. Kurokawa. 1997. Encuesta de los valores de los parámetros de química clínica obtenidos para una muestra de sangre de rata común en noventa y ocho laboratorios japoneses. *J. Toxicol. ciencia* 22: 25-44.
- Mahesh, T. y Menon, V. P. (2004), La quercetina alivia el estrés oxidativo en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina. *Phytoteraphy Research*, 18: 123-127. <https://doi.org/10.1002/ptr.1374>
- Olajuyigbe, O., & Ashafa, A. (2014). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Cosmos bipinnatus* Cav. *Revista Iraní de Investigación Farmacéutica*:

- OMS. 2020. Organización, Mundial de la Salud. 2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- Pastrana-Bonilla E, Akoh C, Sellappan S, and Gerard Krewer. (2003). Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Muscadine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5497-5503.
- Peluso, M.R. (2006). Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Experimental Biology and Medicine*, 231(8):1287-99.
- Perumal, V., Hamid, A., Ismail, A., Saari, K., Abas, F., Ismail, I., M., Lajis, N. y Khatib, A. (2014). efecto de las hojas de cosmos caudatus kunth sobre el perfil lipídico de un modelo animal inducido por hiperlipidemia. *Revista de Química y Nutrición de Alimentos*, 2 (1), 43-51. Obtenido de <https://esciencepress.net/journals/index.php/JFCN/article/view/450>
- Pino Q., M.T. y Vergara H., C. (eds.). (2022). Colorantes y Antioxidantes Naturales en la Industria de Alimentos: Tecnologías de Extracción y Materias Primas Dedicadas. Boletín INIA N°455. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago, Chile. 184pp.
- Rabassa M., Trespalacios M., Urpi-Sardá M., Tulipani S., Zamora R. R., García-Aloy M. (2012). Polifenoles como antioxidantes. En P. E. Álvarez, L. De la Rosa, Z. J. Ayala, *Antioxidantes en Alimentos y Salud* (págs. 155-199). México, D.F.
- Rafiee Z., Jafari S. M., Alami M. y Khomeiri M. (2011). Extracción asistida por microondas de compuestos fenólicos de oliva hojas; una comparación con maceración. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21 (4):738-745.
- Rahman H.A., Sahib N.G., Saari N., Abas F., Ismail A., Mumtaz M.W., Hamid A.A. (2017). Anti-obesity effect of ethanolic extract from *Cosmos caudatus* Kunth leaf in lean rats fed a high fat diet. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1):122. doi: 10.1186/s12906-017-1640-4. PMID: 28228098; PMCID: PMC5322639
- Ramírez R. J. (2015). Generación de Chorros de Agua Mediante Termocavitación en Tubos Capilares. Maestría. Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica.
- Rao, MNA. (1997). Elimination of nitric oxide by curcuminoids. *Journal of Pharmacy and*

Pharmacology, 49:105-107.

- Rivera S. L., (2009). Efectos de polifenoles de la dieta en el modelo experimental de síndrome metabólico de rata zucker. Doctorado. Universidad de Granada, Facultad de Farmacia.
- Rodríguez A., Harker M., Quezada S. A. y Casillas G. S. (2006). Diversidad y potencial ornamental del género *Cosmos* cav. (Asteraceae) en Jalisco. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*, 610-619.
- Rodríguez E. M. A., Delgado A. A., González C. M. C., Carrillo G. R., Mejía M. J. M., y Vargas H. M. (2010). Emergence and growth of ornamental plants on substrates polluted with mine residues. *Interciencia*, 35(1):26–32.
- Rodríguez L. C. P., González T. M. C., Aguilar S. C. A., y Nájera M. O. (2017). Mecanismos inmunológicos involucrados en la obesidad. *Investigación Clínica*, 58(2):175-196.
- Ruch, RJ; Cheng, S.; Klaunig, JE. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6):1003–1008
- Safdar M. N., Kausar T. y Nadeem M. (2016). Comparison of Ultrasound and Maceration Techniques for the Extraction of Polyphenols from the Mango Peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4) e13028 <https://doi.org/10.1111/jfpp.13028>
- Salazar, J., Chávez, J. A., Turó, A. García-Hernández, M. J. (2010). Effect of Ultrasound on Food Processing. En “Novel Food Processing: Effects on Rheological and Functional Properties”. Jasim Ahmed, Hosahalli S. Ramaswamy, Stefan Kasapis & Joyce I. Boye (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton Florida, Estados Unidos de América. Pag: 65-84.
- Saleem M., Akbar A. H., Furqan A. M., Saleem U., Saleem A. y Irshad I. (2017). Chemical characterisation and hepatoprotective potential of *Cosmos sulphureus* Cav. and *Cosmos bipinnatus* Cav. *Natural Product Research* DOI: 10.1080/14786419.2017.1413557
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2022). El sobrepeso y la obesidad se ha incrementado en todo el mundo durante las últimas tres décadas. México. Secretaria de salud. Recuperado de <https://www.gob.mx/siap/es/articulos/el-sobrepeso-y-la-obesidad-se-ha-incrementado-en-todo-el-mundo-durante-las-ultimas-tres-decadas?idiom=es>
- Smirnoff, N.; Cumbes, QJ. (1989) Actividad captadora de radicales hidroxilo de solutos compatibles. *Fitoquímica*, 28:1057–1060

- Sohn S.H., Yun B.S., Kim S.Y., Choi W.S., Jeon H.S., Yoo J.S., Kim S.K. (2013). Actividad antiinflamatoria de los componentes activos de las raíces de *Cosmos bipinnatus* en macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipopolisacáridos. *Natural Product Research*, 27(11):1037–1040.
- Soler C. A. (2009). Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional. Doctorado. Universidad de Lérida, Departamento de Tecnología de Alimentos.
- Spigno G., Tramelli L., De Faveri D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81 (1):200-208.
- Sun K., Kusminski C. M., Scherer P. E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 121 (6):2094-2101. <https://doi.org/10.1172/JCI45887>
- Taga, M. S., Miller E. E. y Pratt D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(5):928-931.
- Tung Y. C., Hsieh P. H., Pan M. H. y Ho C. T. (2017). Cellular models for the evaluation of the antiobesity effect of selected phytochemicals from food and herbs. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25:100-110.
- Valencia A. E., Ignacio F. I., Sosa M. E., Bartolomé C. M. C., Martínez F. H. E., García P. M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 16:15-29.
- Vargas A. G., Castro C. A., Harker, M., Villaseñor, J.L., Ortiz, E. y Rodríguez, A. (2013). Distribución geográfica y riqueza del género *Cosmos* (Asteraceae: Coreopsidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84:536-555.
- Vargas Corrales, V. (2012). Elaboración de té aromático a base de plantas cedrón (*Aloysia citrodora*) y toronjil (*Mellisa officinalis*) procesado con stevia (*Stevia rebaudiana* bertoni) endulzante natural, utilizando el método de deshidratación. Tesis de grado.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2):126-133.
- Vinayagam, R., Xu, B. (2015) Propiedades antidiabéticas de los flavonoides dietéticos: una revisión del mecanismo celular. *Nutrition & Metabolism*, 12:60.
- Wang Z, Yang Y, Xiang X, Zhu Y, Men J, He M. (2010). Estimation of the normal range of blood glucose in rats. *Wei Sheng yan jiu = Journal of Hygiene Research*, 39(2):133-7, 142. PMID:

20459020.

Zorzanelli R. V., Folco E. (2011). Inflammatory concepts of obesity. *International Journal of Inflammation*, 2011, 529061. <https://doi.org/10.4061/2011/529061>

Zulet M. A., Puchau B., Navarro C., Martí A. y Martínez J. A. (2007). Biomarcadores del estado inflamatorio: nexo de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. *Nutrición Hospitalaria*, 22(5):511-527.