



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas
Facultad de Biología**

Área temática: Biotecnología alimentaria

**Determinación y caracterización de los compuestos con actividad inhibitoria
de la lipasa pancreática presentes en las hojas de *Hibiscus rosa-sinensis***

TESIS

Que como requisito para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Biól. Oscar Fernando Gallegos Torres

Asesora de tesis:

D.C. Patricia Ríos Chávez

Morelia, Michoacán. Julio de 2024



**EI PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO DE FITOBIOQUÍMICA, UBICADO EN EL
EDIFICIO B-4 ADSCRITO A LA FACULTAD DE BIOLOGÍA
DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA D.C. PATRICIA
RÍOS CHÁVEZ**



Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el otorgamiento de la beca brindada para llevar a cabo mis estudios a nivel maestría.

También quiero agradecer a mi alma mater, la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Biología, institución donde me formé como biólogo, por permitirme tener una sólida formación a nivel profesional, tanto a nivel licenciatura, como a nivel de posgrado en el Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, con enfoque a Biotecnología Alimentaria.

No sin más agradecer a mi asesora, la Doctora en Ciencias Patricia Ríos Chávez, por ser una excelente guía y profesora, además de mostrarme su visión sobre los productos naturales y su apoyo para iniciar y ahora culminar mis estudios de maestría, así como sus aportes para la realización del presente proyecto.

De igual manera, agradezco a mi comité sinodal, conformado por el Dr. Asdrúbal Aguilera Méndez, la Dra. Berenice Yahuaca Juárez, Dra. Irene Ávila Díaz y Dra. Judit Araceli Aviña Verduzco, junto con mi asesora (miembro del comité) por asesorarme y aportar su profundo conocimiento de sus respectivos campos en la investigación científica, sus observaciones y su tiempo dedicado en revisar el presente trabajo.

Finalmente, y no menos importante, agradezco el compañerismo, apoyo y disponibilidad de mis compañeros de laboratorio y de la maestría (Gera, Luis, Aram, Charly, Mora, Jhon, Juan, Gus, Belén y Oli) por los buenos momentos compartidos.

Índice	
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 La lipasa pancreática.....	10
1.2 Obesidad y salud.....	11
1.3 La dieta como factor importante en la obesidad.....	14
1.4 El uso de plantas medicinales para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad.....	15
1.5 Antecedentes.....	16
1.5.1 <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	16
1.6 Características de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1 Método de extracción.....	25
6.2 Separación de los compuestos por cromatografía en capa fina (TLC) y columna. ..	25
6.3 Determinación de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática.....	25
6.4 Caracterización química de las fracciones obtenidas del extracto hexánico.....	25
6.5 Modelo murino.....	26
6.6 Estimación de la asimilación de los triacilgliceroles en el modelo murino.....	26
6.7 Análisis estadístico.....	27
7. RESULTADOS.....	28
7.1 Determinación <i>in vitro</i> del porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática frente a tres extractos diferentes (etanol, acetato de etilo y hexano).....	28
7.2 Separación de fracciones presentes en el extracto hexánico mediante un sistema de solventes por TLC.....	29
7.3 Determinación <i>in vitro</i> del porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática frente a nueve fracciones provenientes del extracto hexánico.....	30
7.4 Determinación <i>in vitro</i> del porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática frente a nueve sub-fracciones provenientes de la fracción 5 (F5). ..	36

8. DISCUSIÓN.....	39
8.1 Análisis químico del extracto hexánico, sus compuestos con mayor porcentaje de abundancia y su actividad biológica presentes en las hojas de <i>H. rosa-sinensis</i>	43
8.2 Análisis químico de la fracción 5 (F5) y sus compuestos con actividad biológica	45
8.3 Análisis químico de la sub-fracción 5 A (F5-A) y sus compuestos con actividad biológica	45
9. CONCLUSIÓN.....	46
10. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	46
11. REFERENCIAS.....	48

RESUMEN

Introducción. El sobrepeso y la obesidad en la población mexicana se incrementa año con año, siendo tratados con orlistat, un fármaco que inhibe la actividad de la lipasa pancreática, enzima clave en la asimilación de los lípidos dietarios. Sin embargo, presenta efectos secundarios, por esto, es de uso restringido. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue el aislamiento y la caracterización del compuesto o compuestos inhibitorios de la lipasa pancreática que están presentes en el extracto de hoja de *Hibiscus rosa-sinensis*.

Métodos. Se obtuvieron tres extractos en etanol, acetato de etilo y hexano de las hojas secas de *H. rosa-sinensis* en una relación 1:10 (p/v). Cada uno se sometió a la prueba *in vitro* de la actividad inhibitoria de la lipasa. Después, se realizaron TLC y cromatografía en columna del extracto que tuviera la mayor actividad inhibitoria. A cada una de las fracciones obtenidas se les realizó nuevamente la prueba inhibitoria *in vitro* y se analizaron por cromatografía de gases acoplada a masas para conocer los compuestos presentes en ellas. De la fracción que presentó el mayor porcentaje de inhibición se sometió a TLC analítica y preparativa para separarla en sub-fracciones y a cada una de ellas se sometieron nuevamente a la prueba de la lipasa *in vitro*. Posteriormente se llevaron a análisis por CG/EM la sub-fracción de la F5 que presentó mayor porcentaje de inhibición de la lipasa. Finalmente, se llevó a cabo la administración en un modelo murino de ocho grupos, todos suministrados con una emulsión lipídica, donde el grupo 1 solo se le dio la emulsión; el 2, emulsión + orlistat a 50mg/kg de peso; el 3, 4 y 5 la emulsión + F5 a 50, 25 y 12.5 mg/kg de peso; y el 6, 7 y 8 emulsión y a las mismas dosis, pero del extracto hexánico.

Resultados. El extracto hexánico presentó un 74% de inhibición de la enzima, a diferencia del 41% del orlistat. A partir de este extracto se aisló la fracción 5 (F5) la cual presentó un porcentaje de inhibición del 98%. De esta fracción se obtuvieron nueve sub-fracciones, siendo la F5-A aquella que obtuvo el mayor porcentaje de inhibición frente a la enzima, con 64%. Finalmente, en un modelo murino, la F5 a una concentración de 50 y 25 mg/kg de peso inhibieron a la lipasa pancreática, mayor que el orlistat (control). El análisis de la F5 y F5-A por cromatografía de gases

acoplada a gases masa presentó tres compuestos en común β -Sitosterol, ácido linolénico y α -Amirina.

Conclusión. Este trabajo es el primer informe sobre la actividad inhibidora de la lipasa pancreática del extracto hexánico de hojas secas de *Hibiscus rosa-sinensis*. Además, la fracción 5 (F5) aislada de este extracto tiene una inhibición del 98% de la enzima. Su constitución fitoquímica consiste en alcoholes cíclicos, triterpenos, ácidos grasos e hidrocarburos, de los cuales el ácido palmítico, el ácido α -linolénico, el ácido 9,12-octadecadienoico, el β -sitosterol y el fitol han tenido informes en la literatura con actividad supresora de esta enzima. Sin embargo, se desconocen los mecanismos de inhibición de estos compuestos.

Palabras clave: *Hibiscus rosa-sinensis*, obesidad, lipasa, cromatografía, modelo murino

ABSTRACT

Introduction. Overweight and obesity in the Mexican population increases year after year, being treated with orlistat, a drug that inhibits the activity of pancreatic lipase, a key enzyme in the assimilation of dietary lipids. Orlistat cannot be used for a long period because of its side effects. The objective of the present work was the isolation and characterization of the pancreatic lipase inhibitory compound(s) present in *Hibiscus rosa-sinensis* leaf extract.

Methods. Ethanol, ethyl acetate, and hexane extracts of the dried leaves of *H. rosa-sinensis* in a 1:10 (w/v) ratio, were tested *in vitro* for pancreatic lipase inhibitory activity. Then, TLC and column chromatography were performed of the extract with the highest inhibitory activity. Each of the fractions obtained was again subjected to the *in vitro* inhibitory test and analyzed by gas chromatography coupled to mass to determine the compounds present in them. The highest anti-lipase activity fraction was chromatographed in column using a gradient of hexane-ethyl acetate (6:4) to yield nine fractions (F1 -F9). Subsequently, the F5 subfraction that presented the highest percentage of lipase inhibition was subjected to GC/MS analysis. Finally, the oral lipid tolerance test was carried out in a murine model with eight groups, all supplied with a lipid emulsion, where group 1 was given only the emulsion; group 2, emulsion + orlistat at 50mg/kg of weight; groups 3, 4 and 5 the emulsion + F5 at 50, 25 and 12.5 mg/kg of weight; and groups 6, 7 and 8 emulsion with the hexane extract at the same doses.

Results. The hexane extract presented 74% inhibition of the enzyme, as opposed to 41% for orlistat. From this extract, fraction 5 (F5) was isolated, which showed an inhibition percentage of 98%. Nine sub-fractions were obtained from this fraction, F5-A being the one that obtained the highest percentage of inhibition against the enzyme, with 64%. Finally, in a murine model, F5 at a concentration of 50 and 25 mg/kg body weight inhibited pancreatic lipase, more than orlistat (control). The analysis of F5 and F5-A by gas chromatography coupled to gas mass presented three compounds in common β -sitosterol, linolenic acid and α -Amyrin.

Conclusion. This is the first report of pancreatic lipase inhibitory activity of hexane extract of dried leaves of *Hibiscus rosa-sinensis*. Also, fraction 5 (F5) isolated from this extract have a 98% inhibition of the enzyme. Its phytochemical constitution consists of cyclic alcohols, triterpenes, fatty acids, and hydrocarbons, of which palmitic acid, α -linolenic acid, 9,12-octadecadienoic acid, β -sitosterol and phytol have had reports in the literature with suppressive activity of this enzyme. However, the mechanisms of inhibition of these compounds are not known.

Keywords: *Hibiscus rosa-sinensis*, obesity, lipase, chromatography, murine model

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la obesidad es una de las enfermedades más importantes en todo el mundo, se puede definir como una acumulación anormal y excesiva de tejido adiposo (OMS, 2021). Esto desencadena una gran acumulación energética aunada a la falta del uso de esta. Lo que conlleva a que los adipocitos aumentan de tamaño, produciendo la característica patológica. El crecimiento patológico de los adipocitos, sucesivamente, producen una alteración en las señales nutricionales que son responsables de la enfermedad conocida como obesidad (Magaña-Rodríguez, 2021). Para poder tratar la pérdida de peso efectivamente, existen varias estrategias en la prevención de la obesidad tales como el uso de anorexígenos, como la fentermina y el dietilpropión, los cuales promueven la alta producción de catecolaminas que, en altas concentraciones, tienden a suprimir el apetito. Otro tratamiento es el promover la actividad física acompañada de una dieta balanceada. Por último, un tratamiento que consiste en alterar el metabolismo de los lípidos por la inhibición de la absorción de las grasas (Singh, M. *et al.*, 2020). La tetrahidrolipostatina (Orlistat TM), derivado de lipostatina, obtenida de *Streptomyces toxytricini*, es el único inhibidor de la lipasa pancreática aprobado actualmente para el tratamiento de la obesidad a largo plazo. Los resultados de su empleo pueden llegar a un 10% de pérdida de peso acompañado de una dieta balanceada y actividad física (Castillo-Celis, 2018). Sin embargo, este fármaco puede ocasionar efectos adversos, tales como dolor de cabeza y, algo bastante característico son la incontinencia fecal y la consistencia de heces grasosas (Xiguanj Q, 2018). No obstante, una alternativa para el tratamiento en la pérdida de peso efectiva son las plantas, que comprenden una reserva diversa de metabolitos secundarios, muchos de estos con propiedades farmacológicas importantes por lo cual podrían ser usadas para disminuir la absorción de los lípidos de la dieta.

1.1 La lipasa pancreática

La lipasa pancreática (triacilglicerol acilhidrolasa) es una enzima gastrointestinal que tiene como papel fundamental hidrolizar los enlaces de éster de los triglicéridos a diglicéridos, después monoglicéridos y finalmente a ácidos grasos libres, lo cual va a ayudar al ingreso de lípidos en el metabolismo, lo que la involucra en el

desarrollo de enfermedades tales como la obesidad. Las sales biliares, como agente emulsificante en el proceso de la digestión, tienden a interponerse entre la lipasa y su sustrato, por lo que es necesario un cofactor que permita actuar a la lipasa, la colipasa. En un pH de 6 (el óptimo para esta enzima) y en presencia de la colipasa, la lipasa libera ácidos grasos y monoglicéridos de una manera rápida y eficiente. Al ser la enzima responsable de la hidrólisis de los triacilgliceroles, se ha vuelto un foco en la investigación para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad. Los tratamientos para tratar dicha condición han sido empleados desde 1960, tal es el caso del dietilpropión, además de la fentermina, ambos inhibidores del apetito. Estos fármacos empleados para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad se categorizaron como anorexígenos, que se caracterizan por actuar liberando catecolaminas, neurotransmisores tales como la noradrenalina y dopamina en altas concentraciones, lo que provoca que se inhiba la sensación de hambre y apetito. Un tercer fármaco que se emplea hoy en día es el Orlistat, un fármaco utilizado para el mismo fin que los anteriores, su principal función es prevenir la absorción de lípidos consumidos en la dieta, reduciendo así la ingesta calórica (Londoño-Lemos, 2012).

1.2 Obesidad y salud

La obesidad se caracteriza por la deposición excesiva de tejido adiposo. Este tejido es el encargado de llevar a cabo el almacén de energía corporal en forma de triacilgliceroles. Sin embargo, el desbalance energético es una de las causas de la obesidad, ya que una cantidad excesiva de energía ocasiona que las células preadipocíticas se conviertan en adipocitos (hiperplasia) y se acumulen triacilgliceroles en los adipocitos maduros (hipertrofia) (Ortega-Pérez, 2020). Para medir la obesidad se emplea el índice de masa corporal (IMC), el cual consiste en el peso de una persona (en kilogramos) dividido por el cuadrado de su altura (en metros). Una persona con un IMC igual o superior a 25 se considera con sobrepeso. Sin embargo, cuando presenta un IMC de 30 o más generalmente se considera obeso. Esta enfermedad se consideró como un problema que solamente se presentaba en los países económicamente desarrollados. Actualmente, el

sobrepeso y la obesidad están aumentando drásticamente en los países de ingresos bajos y medianos, en particular los entornos urbanos. Esta condición tiene niveles epidémicos a nivel mundial, razón por la que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera la epidemia del siglo XXI. De hecho, el aumento excesivo de peso corporal desencadena una serie de enfermedades crónicas, por lo cual, es el sexto factor principal de riesgo de defunción en el mundo. Cada año fallecen millones de adultos a consecuencia del sobrepeso o la obesidad, es por esto por lo que la primera causa de muerte por el exceso de peso son las enfermedades cardiovasculares (cardiopatías y accidentes cerebrovasculares), seguido de la diabetes y, por último, riesgos de padecer algunos cánceres (mama, ovarios, próstata, hígado, riñones y colon) que son atribuidos a esta condición patológica (OMS, 2017). De acuerdo con el Boletín Electrónico de Obesidad desde una Perspectiva Cognitivo Conductual, en el año 2021, el sobrepeso y obesidad se reconocen como uno de los retos más importantes de la Salud Pública a nivel mundial debido a su magnitud, la rapidez de su incremento y el efecto negativo que ejerce sobre la salud de la población que la padece. Además, incrementan significativamente el riesgo de padecer enfermedades crónicas degenerativas no transmisibles, la mortalidad prematura y el costo social de la salud. Se estima que el 90 % de los casos de diabetes mellitus tipo 2 se atribuyen al sobrepeso y la obesidad. México ocupa uno de los primeros lugares en la prevalencia mundial de obesidad en población adulta, la cual es diez veces mayor que en países como Japón y Corea. En nuestro país, más del 70 % de la población adulta tiene exceso de peso. La prevalencia de sobrepeso es más alta en hombres que en mujeres, mientras que la prevalencia de obesidad es mayor en las mujeres que en los hombres. Respecto a la población infantil, México ocupa el cuarto lugar de prevalencia mundial de obesidad, superado por Grecia, Estados Unidos e Italia. Por lo anterior, es necesario planear e implementar estrategias de acción efectivas, dirigidas a la prevención y control de la obesidad del niño, el adolescente y el adulto. La experiencia global indica que la atención correcta de la obesidad y el sobrepeso requiere coordinar estrategias multisectoriales eficientes, las que permiten potenciar los factores de protección hacia la salud, particularmente con la modificación del

comportamiento de los individuos, y de los ámbitos familiar y comunitario. De acuerdo con los datos más actualizados del INEGI y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en el 2020, la prevalencia de sobrepeso en la población mexicana dividido en subpoblaciones tres rangos de edad que son 5-11 años, 12-19 años y 20 o más años, el primer grupo presenta datos similares entre hombres y mujeres; el segundo grupo, las mujeres presentan una mayor prevalencia en condición de sobrepeso y; en el tercer grupo, los hombres llegan a mostrar mayor cifra que las mujeres. Esto sigue posicionando a México entre los primeros lugares en obesidad infantil a nivel mundial, problema que se presenta más a menudo en los estados del norte (Baja California Norte y Baja California Sur) y en comunidades urbanas con el 39.7% y en menor proporción en estados del sur del país (Oaxaca y Chiapas) en comunidades rurales con el 34.6%. Con respecto a los adultos, los resultados de la ENSANUT de 2020 indican que México es el segundo lugar mundial en personas adultas con 7 de cada 10 adultos (72.6% de población adulta en México) de ellos tienen sobrepeso u obesidad. Esta prevalencia es mayor en mujeres que en hombres y es similar entre los grupos de 30 a 79 años. En la última encuesta del 2018 del INEGI en colaboración con la ENSANUT, la cifra de personas con sobrepeso y obesidad aumento en adultos a un porcentaje de 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad) en donde la mayor prevalencia en sobrepeso es para hombres y en obesidad para mujeres.

La obesidad está estrechamente asociada con el deterioro de la salud, ya que es un factor de riesgo en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, enfermedad osteoarticular, varios tipos de cáncer como de colon, próstata y mama, además de apnea de sueño entre otros (Mnafgui *et al.*, 2014).

1.3 La dieta como factor importante en la obesidad

Una dieta se define como los hábitos alimenticios que se tienen determinados en la vida cotidiana de una persona. Este hábito se define por cuestiones geográficas, culturales y económicas (OMS, 2018).

La dieta debe ser completa, es decir, que contenga todos los nutrimentos que el ser humano requiere (hidratos de carbono, proteínas, grasas, vitaminas, minerales y agua); que exista un equilibrio entre los nutrimentos; en cantidades suficientes para permitir el crecimiento y desarrollo adecuados y mantener el peso dentro de los límites aconsejables en el adulto, evitando los excesos que causarían la obesidad y la deficiencia que daría por resultado la desnutrición. Otro requisito de la dieta es que sea variada, esto es que haya diversidad de alimentos. Sin olvidar que sea inocua, tanto por no contener sustancias perjudiciales, como por no poseer gérmenes que nos ocasionan daño, lo cual exige una preparación higiénica. Así como adecuada a la edad, sexo, tamaño corporal, actividad física y al estado de salud de quien la consume (Cápsulas para la vida, DGSM-UNAM, 2011).

En las últimas décadas ha incrementado el consumo de dietas de tipo occidental (**Western Diet, WD**) en las sociedades occidentalizadas, incluyendo la comida procesada, los bocadillos y los refrescos azucarados, y dejando de lado la fibra, las vitaminas y los minerales. La dieta occidental se caracteriza por ser rica en azúcares refinados, sal, carnes procesadas, grasas saturadas y aditivos alimentarios, y baja en fibras, vitaminas, minerales, frutas y verduras. Se trata de una dieta rica en energía, pero pobre en nutrientes. Además, presenta altos índices glucémicos por lo que los niveles de glucosa en sangre aumentan rápidamente. Por tanto, supone una elevada absorción de calorías proveniente de carbohidratos refinados y picos de glucosa e insulina en plasma en cortos períodos de tiempo y termina con una absorción de nutrientes en el tejido adiposo, lo que conlleva un rápido aumento de peso (Christ *et.al.*, 2019). Seguir una WD no sólo supone un aumento de peso, también cambios patológicos en los lípidos, un metabolismo energético y una activación del sistema inmune. Como modifica cualitativa y cuantitativamente el ecosistema microbiano intestinal, y por tanto altera el equilibrio inmuno-metabólico, incrementa la tendencia a desarrollar trastornos metabólicos crónicos como la

obesidad, la diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y autoinmunes, los cuales están asociados con inflamación sistémica de bajo grado atribuida a la endotoxemia (Statovci *et.al.*, 2017; Christ *et.al.*, 2019).

1.4 El uso de plantas medicinales para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad

Existe mucha evidencia acerca del uso de productos naturales para tratar la obesidad, como es el caso del té verde y el ginseng por mencionar algunos. Dentro de sus propiedades está la de inhibir a la lipasa gástrica y pancreática, así como la estimulación de la termogénesis reportada para el té verde (Chantre y Lairon, 2002). Por otro lado, *Panax ginseng*, perteneciente a la familia de las araliáceas, ha demostrado que tiene muchos beneficios fisiológicos y farmacológicos, como antidiabético, anticancerígeno, antiobesidad, anti-hiperglicémica y ayudan a la reducción del colesterol (Attele *et al.*, 2002). Los principales componentes activos de esta planta son las saponinas y los polisacáridos del ginseng y el principal componente activo responsable de su efecto contra la obesidad, que son los ginsenósidos. Según los informes, el ginseng influye en los niveles de hormonas como la leptina, la grelina y la adiponectina, así como en el apetito. Otra de las plantas usadas como tratamiento son *Hibiscus sabdariffa*, que tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiobesidad y antidiabéticas. Los principales compuestos bioactivos, como antocianinas, flavonoides y ácidos orgánicos, son responsables de la actividad antiobesidad de la planta. Finalmente, *Hibiscus rosa-sinensis*. Esta planta ha sido ampliamente estudiada principalmente por países del medio oriente por sus efectos benéficos como anticonvulsionante, antipirético, antidiabético, entre otras propiedades que se le atribuyen (Jena *et al.*, 2023)

La *H. rosa-sinensis* se encuentra dentro de la familia Malvaceae, y de esta especie, la flor se usa en la India como infusión o bebida refrescante para bajar la fiebre. Otra actividad reportada es la antihiperlipidémica o hipolipemiente (Sachdewa y Khemani, 2003). Dentro de los compuestos reportados en las flores de *H. rosa sinensis* están la tiamina, riboflavina y ácido ascórbico (Agarwal y Prakash, 2013).

El equipo de trabajo de Ríos-Chávez *et al.*, (2019) reporta que las hojas y flores frescas de *H. rosa-sinensis* tiene propiedad antimicrobiana y no presenta citotoxicidad además reporta la composición fitoquímica de ambos tejidos siendo el ácido linolénico y linoleico los componentes mayoritarios. Magaña-Rodríguez (2021) reporta que el extracto etanólico de las hojas fresca y secas presentan una actividad inhibitoria de la lipasa pancreática *in vitro*, así como inhibe la asimilación de una emulsión lipídica en ratas Wistar igual que el orlistat, pero sin los efectos indeseables de este fármaco. Sin embargo, se desconoce cuál es el compuesto que aporta esta actividad. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo es la determinación y caracterización del compuesto o compuestos inhibitorios de la lipasa pancreática presentes en las hojas de *H. rosa-sinensis*.

1.5 Antecedentes

Se sabe que una dieta alta en grasas llega a inducir hipercolesterolemia, hiperlipidemia, diabetes, hipertensión, obesidad, entre otras patologías. Existen dos tipos de grasas la de origen animal y vegetal cada una de ella con diferentes composiciones de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados y, por último, los ácidos grasos *trans*. Existen diferentes estudios de como el tipo de grasa y su composición pueden ser benéficos o perjudiciales para la salud (Vaca Navarrete, L. A., 2020)

Dentro de los mecanismos para perder peso, están la activación de la β -oxidación, inducir la saciedad, estimular que se gaste la energía, inhibición de la diferenciación de los adipocitos, promoviendo la apoptosis de los adipocitos, incrementando la lipólisis, y mejorar el metabolismo de los lípidos, como sería el caso de retardar la absorción de los ácidos grasos por medio de inhibir a la lipasa (Singh, M. *et al*, 2020).

1.5.1 *Hibiscus rosa-sinensis*

En el año 2003, la autora Ross reportó un estudio sobre algunos aspectos como su descripción botánica, origen y distribución, usos en medicina tradicional en algunos

países. Por ejemplo, en Bangladesh donde usan una decocción de sus flores como regulador del ciclo menstrual; en China hacen extracto con agua caliente de sus flores y lo usan como tónico y estimulante de la circulación sanguínea; en México reportó que las personas lo usan como tratamiento para la inflamación del colon, que ayuda con la diarrea grave acompañada de heces con sangre o mucosa. Además de esto, habla sobre su constitución fitoquímica y las actividades farmacológicas y aplicaciones en tratamientos clínicos, como, por ejemplo, antiestrogénico, anticonvulsivo, ayuda con la infertilidad, antifúngico, antiinflamatorio, antiovlatorio, entre otros más (Ross, 2003).

Jadhav *et al.*, en el año 2009 habla sobre los usos en medicina tradicional de *H. rosa-sinensis*, que se ha usado como estimulante en el crecimiento del cabello, así como tratamiento en úlceras. En una evaluación terapéutica en 30 personas que sufren de hipertensión e hipercolesterolemia se trataron con la droga Siddha, siendo uno de sus constituyentes *H. rosa-sinensis*, demostrando que es eficaz en la reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos (Jadhav *et al.*, 2009)

Por otro lado, existe un estudio donde fraccionaron en 5 partes el extracto etanólico de las hojas de *H. rosa-sinensis* y registraron la actividad antidiabética en las ratas no obesas con esta condición. Encontraron dos fracciones F3 y F5 que demostraron la naturaleza insulínica y el efecto protector en los ratones NOD, sugiriendo que estas fracciones pueden contener un potencial agente hipoglucemiante oral (Moqbel *et al.*, 2011).

En el año 2013, los investigadores Mamun y colaboradores realizaron un estudio sobre los efectos del extracto etanólico de las hojas de *H. rosa-sinensis* en ratas diabéticas inducidas por alloxan para averiguar sus efectos añadiendo una comparación con la metformina (un fármaco usado como tratamiento antidiabético). Los resultados señalaron que las hojas de la planta, en comparación con la metformina, tenían una profunda actividad hipoglucemiante e hipolipidémica, además de que no se presentaron efectos secundarios del extracto foliar (Mamun *et al.*, 2013).

Otro estudio fue el de Nwibo *et al.*, (2016) sobre los efectos de los productos de las hojas de *H. rosa-sinensis* en índices hematológicos, el perfil lipídico y los parámetros hepáticos de ratas hiperlipidémicas para demostrar cómo actúan los metabolitos secundarios de las hojas y este estudio resultó en que las hojas ayudaron a disminuir los niveles de LDL, así como de colesterol total. Sugiriendo que pueden ser empleadas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con síndromes metabólicos (Nwibo *et al.*, 2016)

En el estudio de Sahu (2016), se demostró que el extracto etanólico de hojas de *H. rosa-sinensis* tuvo capacidad de actuar contra los efectos hepatotóxicos del fármaco piroxicam el cual es usado principalmente como un tratamiento antiinflamatorio, analgésico y antipirético. Incluso como un antitumoral y contra cánceres de vejiga y colorrectales invasivos. Sin embargo, ha llamado la atención debido a su toxicidad producida por un consumo prolongado (Sahu, 2016).

En otro estudio a manera de revisión se habla sobre esta planta, donde mencionan que tiene varios usos medicinales importantes para tratar heridas, inflamaciones, fiebre y tos, diabetes, infecciones causadas por bacterias y hongos, caída del cabello y úlceras gástricas en varios países tropicales. Se realizó un análisis fitoquímico que documentó que los principales compuestos bioactivos responsables de sus efectos medicinales son los flavonoides, taninos, terpenoides, saponinas y alcaloides. Los experimentos de estudios recientes mostraron que varios tipos de extractos de todas las partes de *H. rosa sinensis* exhibían una amplia gama de efectos beneficiosos, como actividades hipotensoras, antipiréticas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes, antibacterianas, antidiabéticas, cicatrizantes y abortivas. Sin embargo, hay muy pocos estudios sobre toxicidad. No obstante, estos estudios mostraron que la mayoría de los extractos de todas las partes de esta planta no presentaban signos de toxicidad a dosis elevadas según el análisis histológico (Missoum, A., 2018).

En otro estudio realizado por Priya *et al.*, en el año 2021, su objetivo era averiguar la actividad antibacteriana y el análisis fitoquímico de los extractos de la planta entera (raíz, flor y hojas) de *H. rosa-sinensis*. Realizaron análisis fitoquímicos de varias partes de las plantas, que mostraron la presencia de los siguientes fitoquímicos: alcaloides, terpenoides, taninos, flavonoides, saponinas, compuestos fenólicos, carbohidratos, azúcares reductores y triterpenoides. Los estudios actuales han demostrado que la planta *H. rosa-sinensis* contiene actividades antimicrobianas significativas en los extractos de MeOH. Las actividades antibacterianas de la planta pueden deberse a la presencia de saponina, taninos y flavonoides (Priya *et al.*, 2021).

Otro estudio realizado por Olayiwola *et al.*, en 2021 nos habla sobre el aislamiento, la identificación y las actividades biológicas de *H. rosa-sinensis*. En este estudio, se investigó el contenido fenólico total, el contenido total de flavonoides, el potencial antioxidante, la inhibición de la acetilcolinesterasa y las actividades antibacterianas del extracto de hoja de esta planta. Los resultados demostraron que presenta una alta capacidad antioxidante y antimicrobiana. Además de que su contenido de fenoles, a partir de un extracto metanólico crudo, fue alto, alrededor de un 86.14 mg (Olayiwola *et al.*, 2021).

Según Sanadheera *et al.*, en el año 2021 reportaron en su artículo de revisión que los pétalos de flores de *H. rosa-sinensis* como "té" son eficaces para pacientes diabéticos e hipercolesterolémicos. Se realizaron búsquedas en las siguientes bases de datos médicas. Evaluaron los datos obtenidos críticamente para evaluar si las dosis efectivas de los estudios de investigación coincidían con las dosis presentes en las infusiones de esta planta. Se categorizaron y extrajeron los datos sobre los usos de *H. rosa-sinensis*, los efectos antidiabéticos, los efectos antiinflamatorios, los efectos antihipercolesterolémicos y sus fitoquímicos. La revisión reveló que la dosis de pétalos de *H. rosa-sinensis* presente en un té de hibisco casero es teóricamente suficiente para provocar efectos antihiperglucémicos y antihiperlipidémicos. La infusión casera de hibisco es eficaz para controlar la

diabetes y la hipercolesterolemia sin causar toxicidad aguda (Sanadheera *et al.*, 2021).

Asimismo, existe un estudio que habla sobre la importancia etnofarmacológica de las especies de *Hibiscus* que conforman a la familia Malvaceae, donde reportan que las dosis suministradas de estas plantas optimizaron los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total y mejoraron la hipertensión (Jeffery y Richardson, 2021).

Savale *et al.*, en 2022 realizó una revisión que resume la fitoquímica, la farmacología y los usos medicinales de esta flor con el propósito de encontrar lagunas exigentes para futuras investigaciones e investigar su potencial terapéutico mediante ensayos clínicos. Documentó que el análisis fitoquímico de *H. rosa-sinensis* presenta los siguientes compuestos bioactivos principales como responsables de sus efectos medicinales: flavonoides, taninos, terpenoides, saponinas y alcaloides. También menciona que los experimentos de estudios recientes han mostrado que varios tipos de extractos de todas las partes de exhibían una amplia gama de efectos beneficiosos, como actividades hipotensoras, antipiréticas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes, antibacterianas, antidiabéticas, cicatrizantes y abortivas. Asimismo, se realizaron estudios sobre toxicidad, que mostraron que la mayoría de los extractos de todas las partes de esta planta no mostraban signos de toxicidad a dosis elevadas según el análisis histológico. Sin embargo, algunos de los extractos sí alteraron los parámetros bioquímicos y hematológicos. Por lo tanto, deben realizarse más investigaciones para aislar los fitoquímicos y explorar su mecanismo de acción específico (Savale *et al.*, 2022).

Sable y colaboradores en el año 2023 estudiaron varias plantas con actividad medicinal y farmacológica sobre la diabetes mellitus (DM) con la finalidad de demostrar que se puede hacer uso de plantas como alternativa a los medicamentos comunes, como la metformina. Consultaron datos etnobotánicos de alrededor de unas 800 plantas, de las cuales, entre todas ellas, *H. rosa-sinensis* se ha registrado como una planta que se usa con el fin de mantener el nivel y el metabolismo del azúcar en personas que padecen esta enfermedad. Demostrando que los medicamentos a base de plantas son una mejor opción que los medicamentos

sintéticos debido a sus menores efectos secundarios. Además, los medicamentos formulados a base de plantas están ampliamente disponibles y se pueden adquirir sin necesidad de una receta médica (Sable *et al.*, 2023).

H. rosa-sinensis se le conoce comúnmente como rosa de China, es una planta medicinal con una rica historia de uso tradicional. Presenta diversas propiedades farmacológicas, incluidas sus actividades antibacterianas, antifúngicas, antidiabéticas y anticancerígenas. Además, presenta efectos antioxidantes, antiinflamatorios y cicatrizantes, lo que la convierte en un valioso recurso botánico para diversas necesidades sanitarias. La rosa de China encierra un potencial prometedor para la medicina moderna y los remedios naturales (Sharma y Sharma, 2023).

A últimas fechas, Amtaghri, S. *et al.*, en este año (2024) revisaron las propiedades farmacológicas y fitoquímicas de *Hibiscus rosa-sinensis* L y también resumieron las características farmacológicas, fotoquímicas y toxicológicas de *H. rosa-sinensis*. Todas sus partes contienen numerosos compuestos químicos, como flavonoides, taninos, terpenoides, antocianinas, saponinas, alcaloides ciclopeptídicos y vitaminas. Y lo que es más interesante, las raíces de esta planta contienen glucósidos, taninos, fitosteroles, aceites fijos, grasas, flavonoides, saponinas, gomas y mucílagos. Las hojas contienen alcaloides, glucósidos, azúcares reductores, grasas, resinas y esteroides. El tallo contiene otros compuestos químicos, como sitosterol, acetato de teraxerilo, ácidos estercúlico cíclico y malválico. Por último, las flores contienen riboflavina, tiamina, apigenidina, ácido oxálico, ácido cítrico, quercetina, niacina, pelargonidina y ácido ascórbico. Mencionan que esta especie tiene una amplia variedad de aplicaciones farmacológicas, como actividades antimicrobianas, antioxidantes, antidiabéticas, antiinflamatorias, antihipertensivas, antifertilidad, antifúngicas, anticancerígenas, promotoras del crecimiento del cabello, antihiperlipidémicas, reproductivas, neuroconductuales, antidepresivas y antipiréticas. Por último, revelaron que los estudios toxicológicos han demostrado que las dosis más altas de extractos de la planta son seguras (Amtaghri, S. *et al.*, 2024).

1.6 Características de *Hibiscus rosa-sinensis*

Es una planta arbórea, ya que llega a crecer hasta los 4.7 metros de alto. Presenta hojas con forma ovalada (siendo más anchas en la base que en la punta) y su crecimiento va de los 5 a los 15 cm de longitud, disponiéndose de manera alterna en la inflorescencia, llegando a tener un color verde oscuro y su margen es dentado. El estambre y estilo presentan tallos fusionados a manera de una columna que va desde el centro de los pétalos y permanece extendido. Sus flores llegan a medir hasta los 15 cm y, dependiendo de las variedades de la planta, los pétalos llegan a ser festoneados o lisos, simples o dobles, dependiendo de la variedad cultivada. Carl von Linnæus fue el primero en describirla y hasta la fecha no se ha modificado algo con respecto a su taxonomía. Su clasificación biológica es la siguiente (www.tropicos.org, 2021):

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Malvales
- Familia: Malvaceae
- Género: *Hibiscus*
- Especie: *Hibiscus rosa-sinensis*



Fotografía de la flor de *Hibiscus rosa-sinensis*. (Fuente: elaboración propia)

2. JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento de casos de obesidad en México se han reportado el incremento de enfermedades asociadas a dicha condición. Existen algunos fármacos que son usados para tratar esta afección. No obstante, la mayoría de estos presentan efectos secundarios, por lo cual se restringe su uso. Las hojas de *H. rosa-sinensis* presentan una actividad inhibitoria contra la lipasa pancreática *in vitro*. Sin embargo, se desconoce cuál es la naturaleza química del compuesto o compuestos que presentan dicha actividad. Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo determinar y caracterizar el o los compuestos activos.

3. HIPÓTESIS

Los compuestos presentes en las hojas de *H. rosa-sinensis* presentan una capacidad inhibitoria sobre la lipasa pancreática.

4. OBJETIVOS

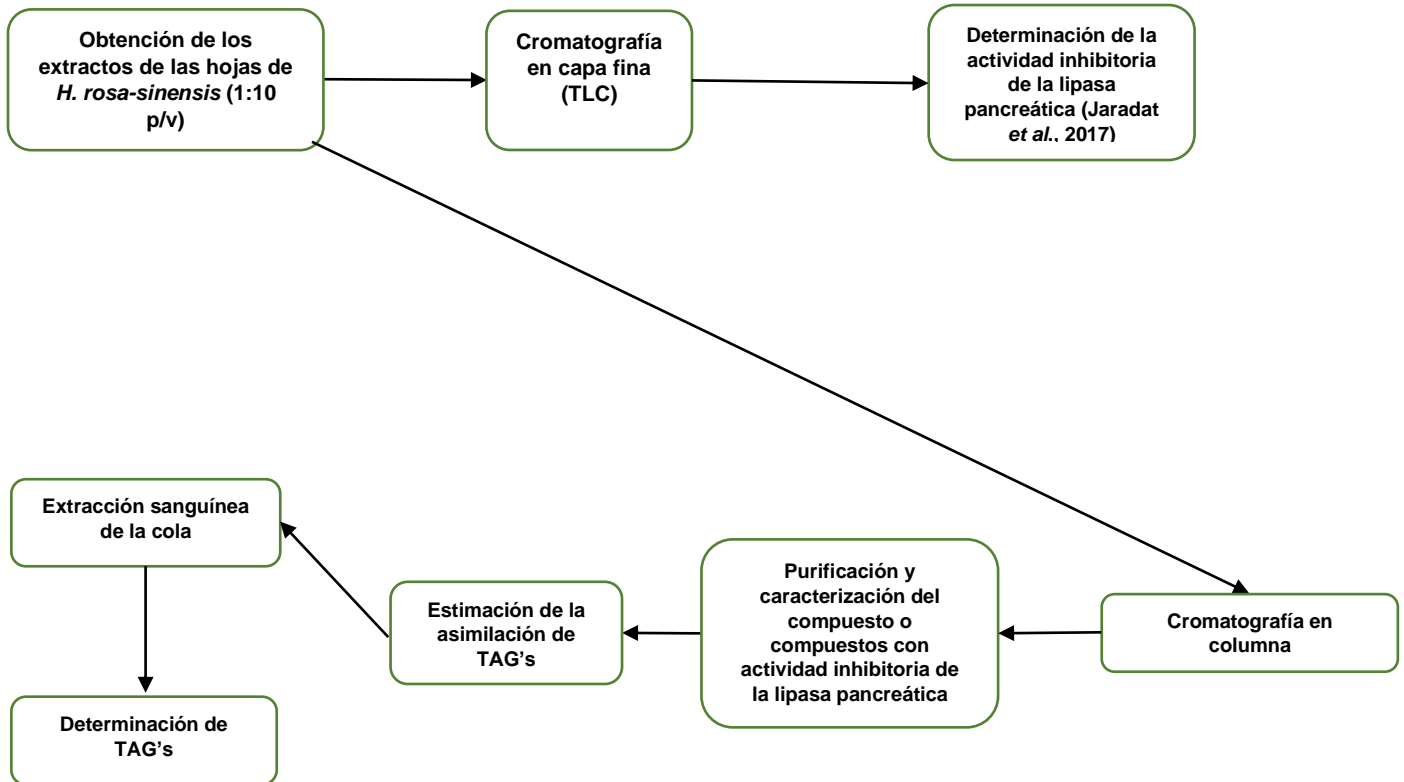
4.1 Objetivo general

Determinar y caracterizar cual es el compuesto o compuestos que tiene la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad inhibitoria de las diferentes fracciones del extracto de hoja de *H. rosa-sinensis* sobre la lipasa pancreática *in vitro*
2. Determinar el efecto de la fracción con mayor actividad inhibitoria de la lipasa pancreática sobre la asimilación de lípidos en un modelo animal.
3. Caracterizar fitoquímicamente el compuesto o compuestos que presentaron la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Método de extracción

Luego de la recolección de las hojas de *H. rosa-sinensis* se trituró el material y se colocó en un matraz con etanol al 98%, acetato de etilo y hexano cada uno en una relación [1:10^{W/V}]. Se dejó macerar a 4°C por una semana. Después, se llevaron a sequedad con ayuda de un rota vapor con bomba de vacío, y el residuo se resuspendió en los diferentes solventes antes mencionados para la realización de la cromatografía en capa fina y en DMSO concentrado para tener una concentración de 1mg/ml, para la determinación de la actividad de la lipasa pancreática.

6.2 Separación de los compuestos por cromatografía en capa fina (TLC) y columna.

Se usaron placas de sílice gel de 20 x 20 cm y se probaron diferentes combinaciones de solventes para ver en cuál sistema se obtenía un mayor número de bandas. Después, se usó una columna para poder obtener mayor cantidad de cada una de las fracciones, las cuales fueron usadas para determinar la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática *in vitro*.

6.3 Determinación de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática

De cada fracción que se obtuvo se hizo un barrido de concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400 µg/ml disueltos en DMSO al 1%. Se tomo 0.2 ml de las diferentes concentraciones y se le añadió 0.1 ml de una solución de la lipasa pancreática (1mg/ml) y 1 ml de buffer Tris-HCl pH 7.4 y se incubó durante 15 min a 37°C, transcurriendo ese tiempo se le añadió 0.1 ml de una solución de p-nitrofenil-butilato y se incubo durante 30 min a 37°C, transcurrido ese tiempo se midió su absorbancia a 405 nm. Se utilizó orlistat como control positivo (Jaradat *et al.*, 2017).

6.4 Caracterización química de las fracciones obtenidas del extracto hexánico

Se analizaron las diferentes fracciones con y sin silanización mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masa (CG/EM).

6.5 Modelo murino

Se utilizaron ratas blancas de la cepa Wistar, todas hembras, criadas y mantenidas en condiciones estándar: 12 horas de luz/12 horas oscuridad, humedad relativa 60-70 %, temperatura promedio de 20°C, con libre acceso a comida y agua. En todos los tratamientos se emplearon adultos jóvenes de 3 meses de edad con un peso entre los 200 y los 250 gramos. Los individuos fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La atención del modelo murino y el proceso experimental se llevó a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

6.6 Estimación de la asimilación de los triacilgliceroles en el modelo murino

Se basa en el procedimiento propuesto por Kin *et al.*, (2009). Se hicieron ocho grupos con ratas hembra de la cepa Wistar de 3 meses de edad, con un peso aproximado de 200 a 250 gr. A todos se les administró vía oral 2 mL de una emulsión lipídica conformada por 6 mL de aceite de maíz, 80 mg de ácido cólico, 5 mL de yema de huevo (colesterol) y 6 mL de una solución salina, previo ayuno de 8 horas. El grupo 1 fue el control, por lo que solo se le administró una emulsión lipídica; el grupo 2 fue administrado con la emulsión lipídica más orlistat a una concentración de 50 mg/kg de peso; los grupos 3, 4 y 5, se les administró la fracción con mayor actividad inhibitoria de la lipasa pancreática *in vitro* a diferentes dosis (50, 25 y 12.5 mg/kg de peso); y a los grupos 6, 7 y 8 se le administró el extracto con mayor actividad inhibitoria de la enzima *in vitro* a las mismas dosis. Finalmente, se les tomó sangre de la vena de la cola a los tiempos 0, 1, 2 y 3 horas después de la administración de la emulsión de lípidos y se determinó el contenido de triacilglicéridos con ayuda de un aparato de la marca Accutrend-plus.

6.7 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó al menos tres veces. Los resultados obtenidos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba *post hoc* de Dunnett con un nivel de significancia de $p^* \leq 0.05$, usando los softwares Excel 2021, para la elaboración de bases de datos; JMP versión 13.0, para el análisis estadístico correspondiente; y GraphPad prism versión 8.0, para la creación de gráficas.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación *in vitro* del porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática frente a tres extractos diferentes (etanol, acetato de etilo y hexano).

Para determinar cuál solvente presentaba la mayor capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática se realizó una maceración de las hojas secas de *Hibiscus rosa sinensis* con un solvente polar (etanol), uno medidamente polar (acetato de etilo) y uno no polar (hexano). Como se observa en la figura 1, el extracto hexánico presentó una mayor capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática del 70.64% a diferencia del orlistat cuyo porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática fue de 42.81%. Por otro lado, el extracto etanólico presentó una actividad inhibitoria similar al orlistat de 48.30%. Mientras que el extracto con acetato de etilo presentó una capacidad inhibitoria de la enzima lipasa de 35.10%, menor a la del orlistat.

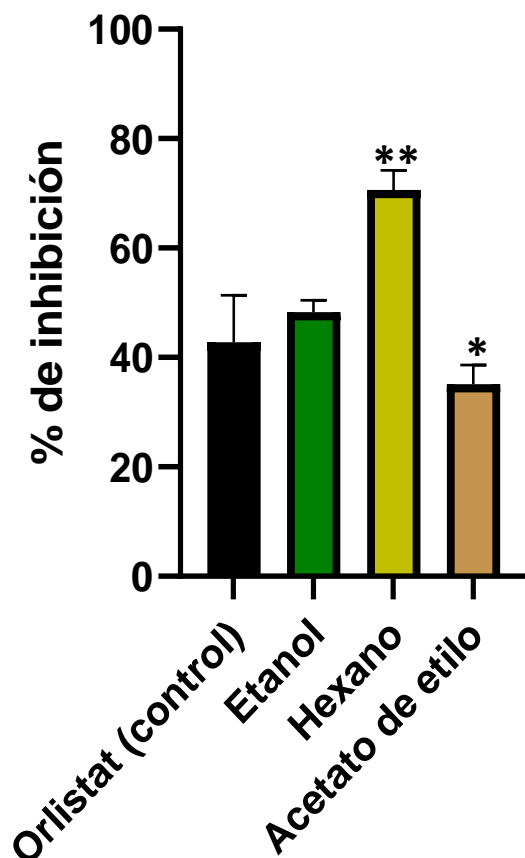
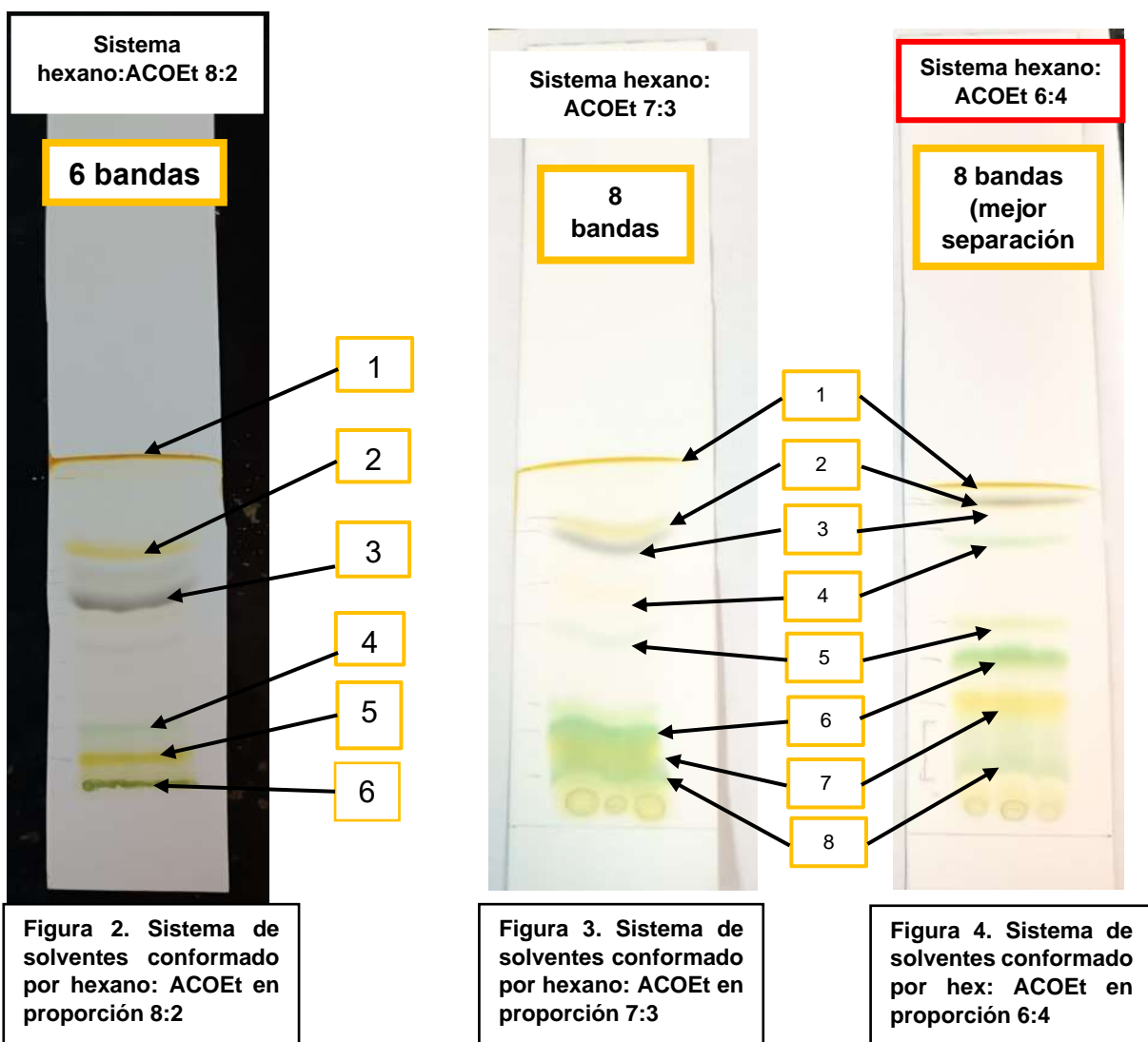


Figura 1. Comparación del porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática de tres extractos de las hojas de *Hibiscus rosa-sinensis* frente al orlistat. Los valores se representan como media \pm desviación estándar (n = 4) (prueba de Dunnett, $p \leq 0.05^*$).

7.2 Separación de fracciones presentes en el extracto hexánico mediante un sistema de solventes por TLC

En virtud de que el extracto hexánico presentó la mayor capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC), con diferentes sistemas de solventes para encontrar un sistema que originara el mayor número de fracciones. Como se aprecia en las siguientes figuras 2, 3 y 4, los sistemas de solventes que se utilizaron y la cantidad de bandas que se generaron son los siguientes:



Hasta el momento el mejor sistema de solventes fue el de hexano: acetato de etilo (6:4) que dio como resultado un total de 8 fracciones.

7.3 Determinación *in vitro* del porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática frente a nueve fracciones provenientes del extracto hexánico.

Una vez encontrado el mejor sistema de solventes se procedió a realizar una cromatografía en columna con el objeto de obtener un mayor rendimiento de las diferentes fracciones y poder determinar su capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática *in vitro*. Como se observa en la figura 5, solamente la fracción 3, fue la que presentó una menor capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática. Por otro lado, la fracción 2 tuvo una capacidad inhibitoria similar al orlistat (control). Las demás fracciones presentaron mayores actividades inhibitoria de la lipasa pancreática frente al orlistat. Sin embargo, la fracción 5 presentó el mayor porcentaje de inhibición cercano al 100%.

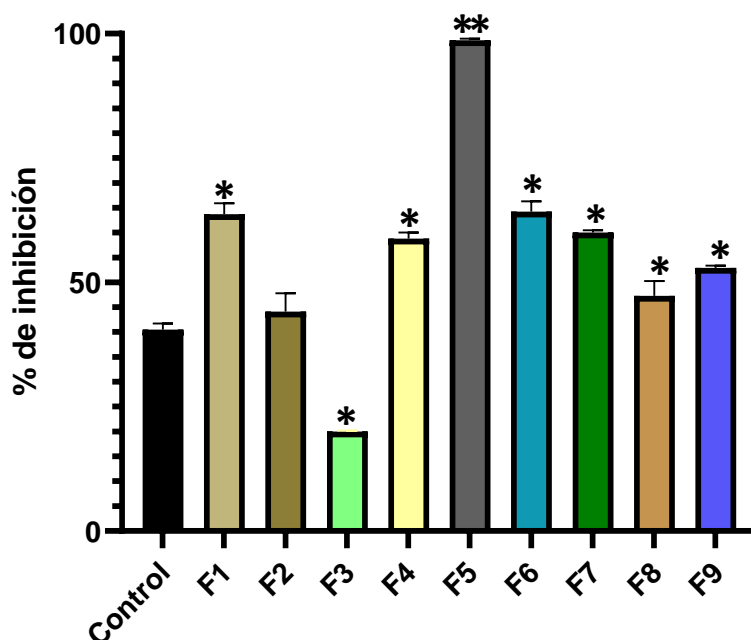


Figura 5. Comparación del porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática de nueve fracciones presentes en el extracto hexánico de las hojas de *Hibiscus rosa-sinensis* frente al orlistat. Los valores se representan como media \pm desviación estándar (n = 4) (prueba de Dunnett, $p \leq 0.05^*$).

Las nueve fracciones obtenidas del extracto hexánicos de las hojas secas de *Hibiscus rosa-sinesis* se analizaron mediante un cromatógrafo de gases acopado a un espectrómetro de masas (CG/EM). Como se observa en la tabla 1, se puede apreciar que existen compuestos encontrados en diferentes fracciones:

Tabla 1. Compuestos encontrados en las fracciones obtenidas del extracto hexánico por medio de CG/EM de las hojas de *Hibiscus rosa-sinensis*.

Fracción	Nombre	% del compuesto
F-1	1. 2,4-bis-(1,1-dimetiletil) fenol	1. 61.2
	2. 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	2. 45.2
	3. Ácido hexadecanoico etil esterificado	3. 63.9
	4. (Z, Z, Z)- Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico metil esterificado	4. 44.3
	5. Ácido 9,12-Octadecadienoico etil esterificado	5. 41.6
	6. (Z, Z, Z)- Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico, etil esterificado	6. 53.5
	7. Escualeno	7. 47.2
F-2	1. (Z, Z, Z)- Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico metil esterificado	1. 45.3
	2. (Z, Z, Z)- Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico, etil esterificado	2. 45.6
	3. Escualeno	3. 45.3
	4. (3 α)-12-Oleanen-3-il acetato	4. 64.4
F-3	1. (Z, Z, Z)- Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico metil esterificado	1. 40.5
	2. Ácido 9,12-Octadecadienoico etil esterificado	2. 41.6
	3. Esqualeno	3. 53.6
	4. (3 α)-12-Oleanen-3-il acetato	4. 56.6
F-4	1. (3 β ,13 β ,14 β)-13,27-Ciloursan-3-ol, acetato	1. 40.2
	2. (3 α)-12-Oleanen-3-il acetato	2. 65.6
F-5	1. Trifluorometil-bis-cetona	1. 88.2
	2. Etil-bi-amina	2. 86.2
	3. 1,2-Bis-etano	3. 83.1
	4. N, N-Dietilcarbamato	4. 68.1
	5. Ácido propanoico, 2-[oxi]-	5. 63.6
	6. 3,6,9-Trioxa-2,10-disilaundecano-2,2,10,10 tetrametilo	6. 76.4
	7. Ácido nonanoico	7. 93.3
	8. Trimetil (2,6 ditertbutilfenoxi)	

	9. 1,3,5-Triazina, 2,4,6-tris[oxi]- 10. 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol 11. Ácido tetradecanoico 12. Ácido benzoico, 3,4,5-tris 13. Ácido hexadecanoico 14. Fitol 15. Ácido octadecanoico 16. β -Sitosterol 17. β -Amirina 18. Germanicol 19. α -Amirina 20. 1-Monolinoleoilglicerol 21. Betulina	8. 52.6 9. 87.5 10. 43.5 11. 89.3 12. 96 13. 96.7 14. 67.5 15. 95.4 16. 85.2 17. 72.9 18. 64.3 19. 31.4 20. 55.7 21. 38.7
F-6	1. 1-metil-ciclopentanol 2. 2,2-dimetilpentanal 3. Propil-benzeno	1. 70.9 2. 42.9 3. 69.6
F-7	1. 2,4-bis (1,1-dimetiletil)-fenol 2. (Z, Z, Z)- Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico 3. β -Sitosterol	1. 51.1 2. 39.9 3. 45
F-8	1. Dimetil Sulfóxido 2. 2,2'-oxibis-Etanol 3. 2-(2-butoxi)etoxi-Etanol	1. 87.5 2. 98 3. 60.1
F-9	1. 2,4-Dimetil-1-hepteno 2. fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil) 3. Ácido pentanoico, 2,2,4-trimetil-3-carboxyisopropil, isobutil ester 4. γ -Tocoferol	1. 49.6 2. 55.2 3. 43.3 4. 70.4

Posteriormente, y con base en que tuvo un porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática del 98%, se analizó la fracción 5 mediante un cromatógrafo de gases acopado a un espectrómetro de masas (CG/EM) para determinar su composición fitoquímica, dando como resultado los siguientes compuestos tanto libres (tabla 2) como silanizados (tabla 3):

Tabla 2. Compuestos libres presentes en la fracción 5.	
Compuestos	% del compuesto
1. Ácido nonanoico	1. 93.3
2. Ácido tetradecanoico	2. 89.3
3. Ácido benzoico	3. 96.0
4. Ácido hexadecanoico	4. 96.7
5. Fitol	5. 67.5
6. Ácido octadecanoico	6. 95.4
7. β -Sitosterol	7. 85.2
8. β -Amirina	8. 72.9
9. Germanicol	9. 64.3
10. α -Amirina	10. 31.4
11. 1-Monolinoleoilglicerol	11. 55.7
12. Betulina	12. 38.7

Tabla 3. Compuestos silanizados presentes en la fracción 5.

Compuestos	% del compuesto
13. Trifluorometil-bis-cetona	13. 88.2
14. Etil-bis-amina	14. 86.2
15. 1,2-Bis-etano	15. 83.1
16. N, N-Dietilcarbamato	16. 68.1
17. Ácido propanoico, 2-[oxi]-	17. 63.6
18. 3,6,9-Trioxa-2,10-disilaundecano-2,2,10,10 tetrametilo	18. 76.4
19. Ácido nonanoico	19. 93.3
20. Trimetil (2,6 ditertbutilfenoxi)	20. 52.6
21. 1,3,5-Triazina, 2,4,6-tris[oxi]-	21. 87.5
22. 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	22. 43.5
23. Ácido tetradecanoico	23. 89.3
24. Ácido benzoico, 3,4,5-tris	24. 96.0
25. Ácido hexadecanoico	25. 96.7
26. Fitol	26. 67.5
27. Ácido octadecanoico	27. 95.4
28. β -Sitosterol	28. 85.2
29. β -Amirina	29. 72.9
30. Germanicol	30. 64.3
31. α -Amirina	31. 31.4
32. 1-Monolinoleoilglicerol	32. 55.7
33. Betulina	33. 38.7

7.4 Determinación *in vitro* del porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática frente a nueve sub-fracciones provenientes de la fracción 5 (F5).

Adicionalmente, se analizó la fracción cinco (F5) por técnicas de cromatografía en capa fina de tipo analítica y preparativa y de cada fracción separada se llevó a cabo la prueba de inhibición de la lipasa pancreática *in vitro*, para saber cuál sub-fracción presenta la mayor actividad inhibitoria de dicha enzima, dando como resultado que la sub-fracción F5-A presentó un porcentaje de inhibición de aproximadamente un 63%, a diferencia del control, que presentó un porcentaje del 45%, incluso las demás sub-fracciones (desde la F5-B hasta la F5-I) tuvieron un porcentaje de inhibición del 37% en promedio, siendo todas estas menores que el grupo control (Figura 6).

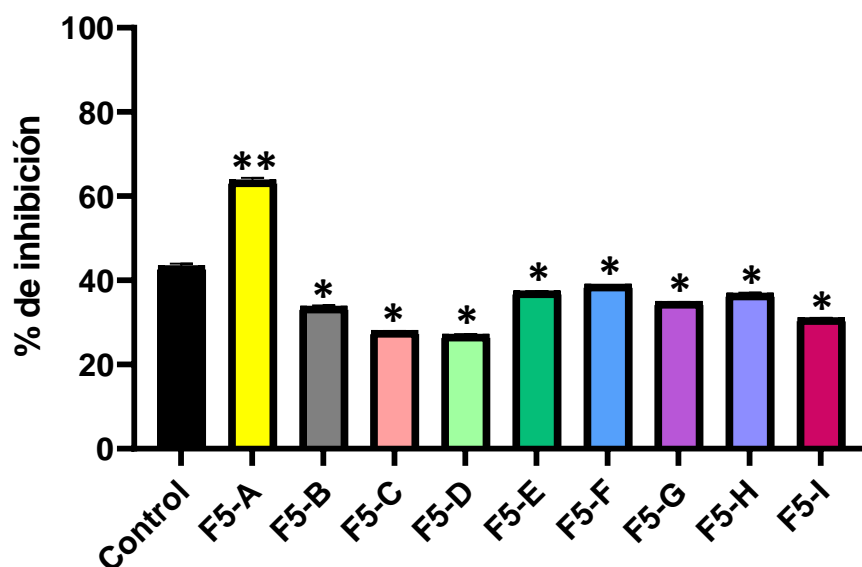


Figura 6. Comparación de los porcentajes de inhibición de la actividad de la lipasa pancreática *in vitro* presente en las sub-fracciones de la fracción cinco del extracto hexánico de las hojas de *H. rosa-sinensis*. Los valores se representan como media \pm desviación estándar (n = 4) (prueba de Dunnett, $p \leq 0.05^*$).

Debido a que la sub-fracción F5-A presentó la mayor actividad inhibitoria de la lipasa pancreática *in vitro*, se analizó mediante la técnica de CG/EM. En la tabla 3 y 4 se muestran los compuestos encontrados en esta sub-fracción tanto libres como silanizados respectivamente:

Tabla 4. Compuestos presentes en la sub-fracción 5-A (F5-A) libres.

Compuestos	% del compuesto
1. Ácido decanoico	1. 50.1
2. Ácido tetradecanoico	2. 91.2
3. Ácido hexadecanoico	3. 97.3
4. Ácido ursólico	4. 25.3
5. Ácido α -Linolenico	5. 46.6
6. Ácido octadecanoico	6. 97.4
7. Estigmasterol	7. 70.5
8. β -Sitosterol	8. 86.7
9. β -Amirina	9. 28.3

Tabla 5. Compuestos presentes en la sub-fracción 5-A (F5-A) silanizados.

Compuestos	% del compuesto
10. Trifluorometil-bis-metil cetona	10. 90.4
11. Etil-biamina	11. 86.2
12. 1,2-bietano	12. 83.5
13. 3,6-Dioxa-2,7-disilaoctano, 2,2,4,7,7-pentametil-	13. 72.6
14. N, N-Dietilcarbamato	14. 59.5
15. 2-[oxi]-Ácido propanoico	15. 63.5
16. 3,6,9-Trioxa-2,10-disilaundecano-2,2,10,10 tetrametilo	16. 75.7
17. Tris, ácido fosfórico	17. 95
18. Ácido decanoico	18. 50.1
19. Ácido tetradecanoico	19. 91.2
20. 3,4,5-tris Ácido benzoico	20. 97
21. Ácido hexadecanoico	21. 97.3
22. Ácido ursólico	22. 25.3
23. Ácido α -Linolenico	23. 46.6
24. Ácido octadecanoico	24. 97.4
25. Estigmasterol	25. 70.5
26. β -Sitosterol	26. 86.7
27. β -Amirina	27. 28.3

Finalmente, se realizó la prueba inhibitoria de la lipasa pancreática en el modelo murino en base al método propuesto por Kim *et al* en el año 2009 con algunas modificaciones. Se llevó a cabo la de estimación de la asimilación de los triacilgliceroles en dicho modelo, tratadas con una emulsión lipídica (2 mL) que contenía 6 mL de aceite de maíz, 80 mg de ácido cólico, 5 mL de yema de huevo y 6 mL de una solución salina (Cloruro de sodio al 0.9 %). El grupo 1 fue el control, por lo que sólo se le administró una emulsión lipídica; el grupo 2 fue administrado con la emulsión lipídica más orlistat a una dosis de 50 mg/kg de peso; los grupos 3, 4 y 5, se les administró la fracción con mayor actividad inhibitoria de la lipasa pancreática *in vitro* (F5) a tres diferentes dosis (50, 25 y 12.5 mg/kg de peso); y a los grupos 6, 7 y 8 se le administró el extracto con mayor actividad inhibitoria de la enzima *in vitro* (extracto hexánico) a las mismas dosis. Luego de haber suministrado a dicho modelo se les tomó sangre de la punta de la cola y, con ayuda de un aparato de la marca Accutrend plus, se realizó la estimación de triacilgliceroles en unidades de mg/dL en tres tiempos que son a las 0, 1, 2 y 3 horas posteriores a la administración, como se puede ver en la siguiente figura:

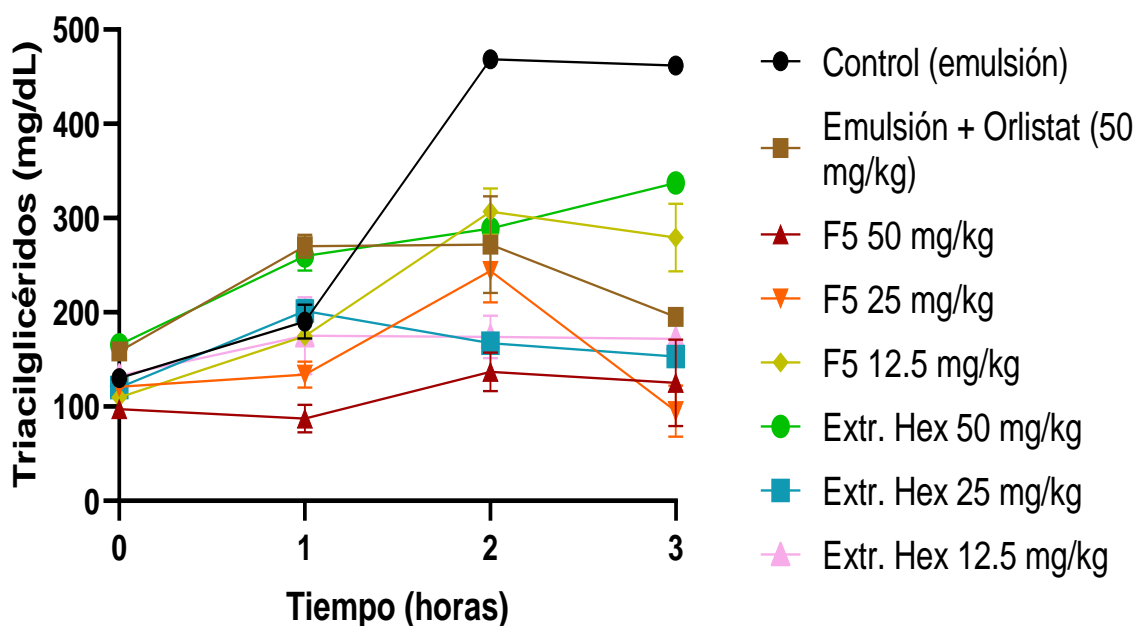


Figura 7. Efecto del extracto hexánico y de la fracción 5 de las hojas de *Hibiscus rosa-sinensis* sobre la asimilación de triacilglicéridos en ratas Wistar después de ser tratadas con una emulsión lipídica. Los valores se representan como media \pm desviación estándar (n = 3) (prueba de Dunnett, $p \leq 0.05^*$).

8. DISCUSIÓN

Considerada como un trastorno progresivo metabólico, la obesidad ha sido catalogada como una pandemia que está presente en la población mundial (Castillo y Rojas, 2018). Esta afección es definida como una alta deposición de tejido adiposo, que pone en riesgo el estado de salud de las personas (OMS, 2021). En las últimas décadas, esta enfermedad se ha triplicado, afectando a la salud de personas de todos los grupos de edad, etnia, sexo y género, la cual está relacionada con un estilo de vida sedentario, malos hábitos alimentarios, trastornos del sueño entre otras causas (Kumar *et al.*, 2022). Además, la obesidad tiene importantes repercusiones en la salud y puede provocar complicaciones graves como diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hipertensión y cáncer, así como causar un aumento de la morbilidad y la mortalidad prematura (Fernández-Travieso, J. C., 2016).

En México, esta enfermedad se ha convertido en uno de los principales problemas a los que se enfrenta el Sistema Nacional de Salud Pública. Ahora, si bien la obesidad tiene que ver con el estilo de vida de cada persona, independientemente del grupo al que pertenezca, esta condición física va más allá de los efectos que tiene en la salud (Pérez Gil Romo *et al.*, 2020). Contreras y Gracia (2005) demuestran que se debe tomar conciencia por la extrema complejidad de que el acto de comer tiene un trasfondo en cuestiones bastantes diversas, referentes a lo biológico, ecológico, tecnológico, económico, social, político e ideológico. Para tratar esta afección de manera efectiva, existen diversos métodos de tratamiento que pueden emplearse, como el ejercicio, la modificación de la dieta, la farmacoterapia, y la cirugía. (Li *et al.*, 2022). Si bien hay maneras efectivas de combatir esta enfermedad, cada una de estas opciones presentan su lado negativo. Por ejemplo, con respecto a la cirugía bariátrica, se ha reportado que los efectos posteriores a su realización son, por mencionar algunos, infecciones microbianas,

sangrado excesivo y reacción a la anestesia (Gotthardt & Bello, 2016; Mayo clinic, consultado el 17 de enero de 2024). Por otra parte, en cuanto a la farmacoterapia se puede considerar un método mucho menos invasivo, sin embargo, los medicamentos aprobados para su uso contra el sobrepeso y/o la obesidad presentan efectos secundarios, tal es el caso del Orlistat (tetrahidrolipostatina), un efectivo inhibidor de la lipasa pancreática, que uno de sus efectos secundarios característico es la esteatorrea (Song *et al.*, 2019). Por estas razones, se han incrementado los estudios hacia los compuestos provenientes de fuentes naturales, como las plantas, por ejemplo, ya que la finalidad de esto es encontrar compuestos que tengan efectos adversos mínimos o nulos en su totalidad. Algunos de los compuestos encontrados, como flavonoides, saponinas y terpenoides, presentan una alta capacidad de inhibición frente a esta enzima (Zhang *et al.*, 2021).

Las lipasas son enzimas hidrosolubles que hidrolizan los enlaces éster de sustratos insolubles en agua, como los triglicéridos, en diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos. Es una diana atractiva para el tratamiento de la obesidad, ya que desempeñan funciones críticas en la digestión de las grasas alimentarias, entre otras funciones fisiológicas. También se conoce como lipasa pancreática clásica (Lim *et al.*, 2022).

En la presente investigación se buscaron el o los compuestos presentes en las hojas secas de *Hibiscus rosa-sinensis* en diferentes extractos (polar, con etanol; medianamente polar, con acetato de etilo y; no polar, hexánico) para saber en cuál rango de polaridad se encuentra el o los compuestos que presentan una alta capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática, tanto *in vitro*, como en un modelo murino, comparado con el orlistat (control), dando como resultado que el extracto hexánico de las hojas secas de la planta presentó un porcentaje de inhibición del 70.64%, un 30% más efectivo que el orlistat, siendo el primer reporte de inhibición de la lipasa pancreática usando un extracto hexánico de las hojas de *Hibiscus rosa-sinensis*. Si bien no se cuenta con información específicamente de esta especie con relación a su capacidad de inhibir a la lipasa pancreática, hay trabajos relacionados con ello, por ejemplo, el de Magaña-Rodríguez (2021) haciendo una búsqueda

dentro de 37 plantas encontró que el extracto etanólico de la hoja seca de *H. rosa-sinensis* presentó un 73% de inhibición de la lipasa pancreática frente a un 70% del orlistat. Sin embargo, en este trabajo se obtuvo una menor capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática en el extracto etanólico del 48.30%, esta posible diferencia puede deberse a que la colecta de las hojas fue en diferentes estaciones del año ya que, como se sabe, la producción de los metabolitos secundarios se ven modificados por las condiciones ambientales, por lo que este factor pudo haber influido en la producción de los compuestos responsables de la alta capacidad inhibitoria de la enzima (Acosta de la luz, 2003).

Como se mencionó anteriormente, no se cuenta con más información sobre la inhibición de la lipasa pancreática bajo el efecto de un extracto hexánico de las hojas de *H. rosa-sinensis*, sin embargo, hay varios estudios que señalan que el género taxonómico de *Hibiscus* incluye otra especie con capacidad de inhibir a esta enzima, como lo es el caso de *Hibiscus sabdariffa*, conocida comúnmente como “jamaica”. Esta planta fue estudiada por Carvalho *et al.*, en el año 2022, donde menciona que el hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L. - Malvaceae) destaca por su supuesto efecto hipoglucemiante y adelgazante, teniendo como objetivo realizar ensayos de inhibición enzimática de extractos acuosos de hibisco, como posible mecanismo de acción relacionado con los supuestos efectos adelgazantes e hipoglucemiantes. Se ensayó la inhibición de cuatro enzimas digestivas (α -amilasa, α -glucosidasa, lipasa y tripsina) antes y después de la exposición a un fluido gástrico simulado. Los resultados mostraron que el extracto acuoso de hibisco, en la proporción 1:10 (p/v), inhibe únicamente la α -glucosidasa. Se observó que el cianidin-3-sambubiósido, tiene interacción con la enzima con propiedades similares a la acarbosa, lo que corrobora la posibilidad de la presencia de un efecto inhibitor en el extracto acuoso de hibisco (Carvalho *et al.*, 2022). Otro estudio fue el de Bucholz y Melzig (2015) donde se investigaron 23 plantas medicinales con potencial reductor del peso, de la glucosa sérica o afines, evaluando sus extractos metanol y agua por medio de dos sistemas de ensayo *in vitro*. Sus resultados demostraron que el extracto metanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) mostró una elevada actividad inhibitoria de la lipasa pancreática (IC50: $35,8 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$), así mostrando una especie alternativa

del género *Hibiscus* como una planta interesante para futuros estudios con relación al sobrepeso, obesidad y su tratamiento (Bucholz y Melzig, 2015). Un tercer estudio fue el realizado por Krishnamurthy *et al.*, en el año 2020, sobre la jamaica como suplemento antienvjecimiento por sus efectos antioxidantes y antiobesogénicos, donde se investigaron los extractos acuosos y etanólicos al 50% de *H. sabdariffa* para determinar sus actividades inhibitorias sobre la lipasa pancreática y la alfa-glucosidasa, además de sus actividades antioxidantes. Ambos extractos mostraron propiedades antioxidantes. Los extractos también suprimieron las actividades de las enzimas lipasa pancreática y alfa-glucosidasa, lo que sugiere posibles actividades antiobesidad y antidiabéticas. El extracto acuoso de *H. sabdariffa* inhibió la actividad de la lipasa pancreática con una IC50 de 167,5+/-12,7 mg/mL, mientras que el extracto etanólico de *H. sabdariffa* al 50% inhibió la enzima con una IC50 de 790,65+/-16,02 mg/mL. Tanto el extracto acuoso como el etanólico de *H. sabdariffa* inhibieron también con éxito la actividad de la enzima α -glucosidasa con una IC50 de 949,88 +/-10,83 mg/mL y 378,33 +/-4,20 mg/mL, respectivamente, ofreciendo la posibilidad de que los extractos sean un agente antiobesidad, antidiabético, antimetabólico y antienvjecimiento, que puede convertirse en suplementos para adultos con el fin de prevenir la aparición de estas enfermedades prevalentes y retrasar la aparición y los efectos del envjecimiento (Krishnamurthy *et al.*, 2020).

Otras especies vegetales con la cualidad de inhibir a la lipasa pancreática que no pertenecen al género *Hibiscus*, son las investigadas por Mhatre *et al.*, en el año 2017, quienes evaluaron las actividades inhibitorias de la lipasa de extractos metanólicos de dieciocho especies. Los extractos de *Zanthoxylum armatum*, *Cinnamomum tamala*, *Syzygium aromaticum* y *Myristica fragrans* se consideraron de alta potencia en el ensayo con sustrato sintético. Sólo *Syzygium aromaticum* mostró una elevada potencia en el ensayo de lipasa basado en sustrato natural. El extracto de *Zanthoxylum armatum* mostró el IC50 más bajo de 9,0 μ g/mL (Mhatre *et al.*, 2017). Los investigadores Rismayanthi y Purnama realizaron un estudio sobre el consumo de té verde acompañado de ejercicio como tratamiento para el sobrepeso y la obesidad en el año 2021. El propósito de este estudio fue determinar el efecto del consumo de té verde (*Camellia Sinensis*) acompañado de ejercicio

aeróbico sobre la pérdida de peso en adolescentes obesos. Los resultados mostraron que había un efecto muy significativo sobre la pérdida de peso, la circunferencia de la cintura, la circunferencia de la cadera y el IMC. La conclusión de este estudio fue que la administración de té verde (*Camellia sinensis*) seguida de ejercicio aeróbico puede reducir el peso corporal, disminuir el perímetro de cintura y cadera y el IMC (Rismayanthi y Purnama, 2021). Una especie muy conocida por sus efectos antiobesogénicos es el té verde, *Camellia sinensis*, el cual es rico en catequinas y taninos, metabolitos conocidos por su alta capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática (Cai *et al.*, 2018).

Las investigaciones mencionadas con el presente trabajo indican que los metabolitos presentes en las plantas que tienen la capacidad de inhibir la lipasa pancreática no se distribuyen uniformemente entre familias o géneros. Algunos grupos taxonómicos tienen más especies con esta capacidad inhibitoria que otros, y esta variabilidad puede deberse tanto a la presencia de metabolitos específicos en ciertos grupos como a las diferencias entre las plantas probadas. Los metabolitos secundarios en las plantas tienden a cambiar en concentración o composición debido al estrés que puedan experimentar las plantas. (Akula *et al.*, 2011).

A continuación, se mencionarán algunos reportes sobre los compuestos encontrados tanto en el extracto hexánico, como en la F5 y la F5-A que tienen actividad biológica, así como la capacidad de inhibir a la lipasa pancreática.

8.1 Análisis químico del extracto hexánico, sus compuestos con mayor porcentaje de abundancia y su actividad biológica presentes en las hojas de *H. rosa-sinensis*.

Dentro de los compuestos obtenidos en el extracto hexánico de la hoja seca de *Hibiscus rosa-sinensis* está el ácido palmítico es un inhibidor de la fosfolipasa A2, responsable de la actividad antiinflamatoria (Aparna *et al.*, 2012).

Otro de estos compuestos es el ácido 9,12,15-octadecatrienoico, (Z, Z, Z), el cual presenta una actividad antifúngica y antibacteriana. (Krishnaveni *et al.*, 2014).

El ácido 9, 12-octadecadienoico ha demostrado que tiene actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus* (Igwe y Okwu,

2013). En otro estudio realizado se expuso que presenta un alto porcentaje de inhibición frente a la lipasa pancreática (Navarro del Hierro *et al.*, 2019).

En cuestiones biomédicas, el fitol ha demostrado efectos ansiolíticos, moduladores del metabolismo, citotóxicos, antioxidantes, inductores de la apoptosis, antinociceptivos, antiinflamatorios y antimicrobianos (Islama *et al.*, 2018).

El ácido α -linolenico (ALA) es el precursor de los ácidos grasos omega-3 de cadena más larga, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), ambos ácidos grasos esenciales. En un estudio sobre este ácido graso esencial, se obtuvieron resultados de que presenta efectos cardioprotectores, anticancerígenos, neuroprotectores, antiosteoporóticos, antiinflamatorios y antioxidantes (Kim *et al.*, 2014). Otro estudio demostró que el ALA tiene propiedades para tratar el síndrome metabólico, cáncer, inflamación, obesidad, tiene actividad antioxidante, neuro-protectoras y reguladoras de la flora intestinal (Yuan *et al.*, 2021). Asimismo, se ha demostrado que el ALA proveniente del polen de abeja de *Mimosa diplotricha* tiene una muy alta capacidad de inhibir a la lipasa pancreática *in vitro* (Arishima *et al.*, 2022).

El ácido octadecanoico, también conocido como ácido esteárico, es otro compuesto encontrado en este extracto, y ha demostrado que su ingesta no tiene influencia significativa en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Shramko *et al.*, 2020). En otros estudios se ha reportado que el consumo de ácido esteárico como suplemento no afecta a los lípidos sanguíneos ni a ninguno de los principales factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (Baer D. J. *et al.*, 2004; Mensink R.P. *et al.*, 2005).

Por último, tenemos al escualeno, el cual presenta efecto hidratante para la piel y ejerce actividades antitumorales (Huang *et al.*, 2009). En otro estudio se reveló que este compuesto no aumenta la cantidad de colesterol en el humano, a pesar de que sea un intermediario para la biosíntesis de este (Spanova, M., & Daum, G., 2011). Estudios en animales señalan que una dieta enriquecida con escualeno tiene efectos antioxidantes y cardioprotectores (Micera *et al.*, 2020).

8.2 Análisis químico de la fracción 5 (F5) y sus compuestos con actividad biológica

El β -Sitosterol fue aislado de la planta *Citrus hystrix* como inhibidor de la actividad de la lipasa pancreática (LP). Los resultados mostraron que su porcentaje de inhibición era alto, ya que mostró un 79.1% de inhibición de la LP a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. (Ishikawa *et al.*, 2009). En otro estudio lo examinaron en la planta *Eleusine indica* (Linnaeus) que es una hierba tradicional conocida por sus propiedades depurativas, febrífugas y diuréticas. Aislaron este compuesto dando como resultado un porcentaje de inhibición del $2.99 \pm 0.80\%$ frente a la lipasa pancreática porcina (LPP) (Ong *et al.*, 2016).

Otro compuesto es la amirina. Se ha demostrado que tanto la α -Amirina como la β -Amirina presentan diversas actividades farmacológicas *in vitro* e *in vivo* contra varias enfermedades, como la inflamación, las infecciones microbianas, fúngicas y víricas y las células cancerosas (Hernández-Vázquez *et al.*, 2012).

El ácido betulínico (o betulina) es un ácido triterpénico pentacíclico. Se investigaron las propiedades antiobesidad del ácido betulínico y se reportó que este compuesto inhibió la actividad de la lipasa pancreática de forma dependiente de la dosis a concentraciones de 1,5-100 μM (valor IC_{50} de 21,10 μM) e impidió la elevación de los niveles plasmáticos de triacilglicerol 2 h después de la administración oral de la emulsión lipídica a una dosis de 100 mg/kg. Además, se descubrió que el ácido betulínico puede acelerar aún más la movilización de grasas al aumentar los niveles de lipólisis en los tejidos adiposos (Junghyun Kim *et al.*, 2011).

8.3 Análisis químico de la sub-fracción 5 A (F5-A) y sus compuestos con actividad biológica

El ácido ursólico ha presentado reportes sobre su capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática, dando como resultado que este terpeno posee dicha capacidad inhibitoria (Lunagariya *et al.*, 2014). Aunado a esto, en otro artículo se estudió cómo inhibe este compuesto a la lipasa pancreática, demostrando que ocurre una inhibición de tipo competitiva, esto quiere decir que el compuesto, como sustrato falso, se une al sitio activo de la enzima, impidiendo que el sustrato verdadero se

una a la LP, dando como resultado el que no se formen productos (Wenjing Jiang *et al.*, 2023).

En otro estudio examinaron el compuesto conocido como estigmasterol en la planta *Eleusine indica* (Linnaeus) que es una hierba tradicional conocida por sus propiedades depurativas, febrífugas y diuréticas. Aislaron este compuesto dando como resultado un porcentaje de inhibición del $2.66 \pm 0.80\%$ frente a la lipasa pancreática porcina (LPP) (Ong *et al.*, 2016).

9. CONCLUSIÓN

Este es el primer reporte de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática sobre el extracto hexánico de las hojas secas de *Hibiscus rosa-sinensis*. Asimismo, se encontró que la fracción 5 (F5) aislada a partir de este tipo de extracto, presentó un alto porcentaje de inhibición de la enzima con un 98%. Esta fracción se constituye por diferentes compuestos, tales como alcoholes cíclicos, triterpenos, ácidos grasos e hidrocarburos, de los cuales, el ácido palmítico, el ácido α -Linolenico, el ácido 9,12-octadecadienoico, el β -Sitosterol y el fitol han tenido reportes en la bibliografía con actividad supresora de la lipasa pancreática. No obstante, no se han descrito los mecanismos por los cuales estos compuestos ejercen esa propiedad. Lo que justifica una mayor investigación. Sin embargo, algunos de ellos presentan el tipo de inhibición competitiva, que consiste en que estos fitocompuestos se unen a la lipasa e impiden la hidrólisis de los TAG para generar sus productos finales (ácidos grasos libres), mientras que otros la de tipo mixta, que quiere decir que estos metabolitos se pueden unir tanto a la enzima sola como al complejo enzima-sustrato.

10. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.

Con base en los resultados del presente trabajo de tesis se sugiere lo siguiente:

- 1) Continuar este estudio con el aislamiento y purificación del compuesto o compuestos presentes en la sub-fracción 5 A (F5-A) que tienen esa alta capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática. Esto con la finalidad de poder conocer la identidad del compuesto y características.

2) Realizar un estudio sobre toxicidad del compuesto o compuestos que inhiben a la lipasa pancreática presentes en las hojas de esta planta y llevarlo a un modelo murino empleando un mayor número de individuos en dicho estudio, además de hacer una comparación en poblaciones de machos y hembras en el mismo rango de peso y edad para poder conocer los efectos secundarios de esos metabolitos y su influencia en ambos sexos de la misma especie. Una posible aplicación de esta información sería el desarrollo de un producto natural patentado como alternativa a los tratamientos tradicionales para tratar el sobrepeso y la obesidad.

11. REFERENCIAS

- Acosta de la Luz, Lérida. (2003). Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(1) 0-0
- Ado, M. A., Abas, F., Mohammed, A. S., & Ghazali, H. M. (2013). Anti-and pro-lipase activity of selected medicinal, herbal and aquatic plants, and structure elucidation of an anti-lipase compound. *Molecules*, 18(12), 14651-14669.
- Agarwal S, Prakash R. (2013). Essential oil composition of solvent extract of *Hibiscus rosa sinensis*. *Oriental Journal of Chemistry*. 29(2):813-814.
- Amtaghri, S., Qabouche, A., Slaoui, M., & Eddouks, M. (2024). A comprehensive overview of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Its ethnobotanical uses, phytochemistry, therapeutic uses, pharmacological activities, and toxicology. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 24(1), 86-115.
- Aparna, V., Dileep, K. V., Mandal, P. K., Karthe, P., Sadasivan, C., & Haridas, M. (2012). Anti-inflammatory property of n-hexadecanoic acid: structural evidence and kinetic assessment. *Chemical biology & drug design*, 80(3), 434-439.
- Arishima, T., Tachibana, N., Kojima, M., Takamatsu, K., & Imaizumi, K. (2009). Screening of resistant triacylglycerols to the pancreatic lipase and their potentialities as a digestive retardant. *Journal of Food Lipids*, 16(1), 72-88.
- Al-Snafi, A. E. (2018). Chemical constituents, pharmacological effects and therapeutic importance of *Hibiscus rosa-sinensis* A review. *Journal of Pharmacy*, 8(7), 101-119.
- Baer, D. J., Judd, J. T., Clevidence, B. A., & Tracy, R. P. (2004). Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *The American journal of clinical nutrition*, 79(6), 969-973.

- Bucholz, T., Melzig, M. F. (2015). Medicinal plants traditionally used for treatment of obesity and diabetes mellitus – screening for pancreatic lipase and α -Amylase inhibition. *Phytotherapy Research*, 30(2), 260-266.
- Castillo Celis, M. A., & Rojas Clavijo, B. K. (2018). Revisión sistemática: inhibidores de la Lipasa pancreática como alternativa de tratamiento frente a la obesidad. Tesis de licenciatura.
- Carvalho, C. E. D., Mancini, D. T., Pereira, C. A., & Thomasi, S. S. (2022). Inhibition of digestive enzymes (α -amylase, α glucosidase, lipase, trypsin) by aqueous *Hibiscus sabdariffa* L.(Malvaceae) extract.
- Contreras, Jesús y Mabel Gracia. (2005). *Alimentación y cultura: Perspectivas antropológicas*. Barcelona: Ed. Ariel, 105.
- Christ, A., Lauterbach, M., & Latz, E. (2019). Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity*, 51(5), 794–811.
- Del Hierro, J. N., Gutiérrez-Docio, A., Otero, P., Reglero, G., & Martin, D. (2020). Characterization, antioxidant activity, and inhibitory effect on pancreatic lipase of extracts from the edible insects *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor*. *Food chemistry*, 309, 125742.
- Fernández-Travieso, J. C. (2016). Incidencia actual de la obesidad en las enfermedades cardiovasculares *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 47, núm. 1, enero-mayo, pp. 1-12 Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba
- Gehan F. Abdel Raouf. (2022). Anti-obesity potential of natural products. *Egypt. J. Chem.* Vol. 65, No. 10 pp. 329 - 358 Pharmacognosy Department, Pharmaceutical and Drug Research Industries Institute, National Research Centre, Dokki, Giza 12622, Egypt
- Gotthardt, J. D., & Bello, N. T. (2016). Can we win the war on obesity with pharmacotherapy? *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9(10), 1289–1297.
- Heikki, R. (2001). Metabolism of squalene in triglyceride-rich lipoproteins in humans.
- Hernández-Vázquez, L., Palazón Barandela, J., & Navarro-Ocaña, A. (2012). The pentacyclic triterpenes α , β -amyryns: A review of sources and biological

- activities. *Chapter 23 in: Rao, Venketeshwer. 2012. Phytochemicals: A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. IntechOpen. ISBN: 978-953-51-4317-8. DOI: 10.5772/1387 pp: 487-502.*
- Huang, Z. R., Lin, Y. K., & Fang, J. Y. (2009). Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, *14*(1), 540-554.
- Iftikhar, N., Hussain, A. I., Chatha, S. A. S., Sultana, N., & Rathore, H. A. (2022). Effects of polyphenol-rich traditional herbal teas on obesity and oxidative stress in rats fed a high-fat–sugar diet. *Food science & nutrition*, *10*(3), 698-711.
- Igwe, O. U., & Okwu, D. E. (2013). GC-MS evaluation of bioactive compounds and antibacterial activity of the oil fraction from the seeds of *Brachystegia eurycoma* (HARMS). *Asian Journal of Plant Science and Research*, *3*(2), 47-54.
- Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., ... & Atanasov, A. G. (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food and chemical toxicology*, *121*, 82-94.
- Jaradat N, Naser A, Zaghal E.Z. (2017). Anti-lipase activity for *Portulaca oleracea*, *Urtica urens*, *Brassica napus* and *Lathyrus hierosolymitanus* wild plants from Palestine. *Marmara Pharm. J.* *21*(4), 828-836.
- Jadhav, V. M., Thorat, R. M., Kadam, V. J., & Sathe, N. S. (2009). Hibiscus rosa sinensis Linn–“Rudrapuspa”: a review. *J Pharm Res*, *2*(7), 1168-73.
- Jadhav, V. M., Thorat, R. M., Kadam, V. J., & Sathe, N. S. (2009). Traditional medicinal uses of Hibiscus rosa-sinensis. *J Pharm Res*, *2*(8), 1220-1222.
- Jena, J., Maurya, N., Rai, J. K., Yadav, V., Rai, S., & Rai, S. (2023). Evaluation on pharmacognostical and phytochemical parameters of Hibiscus rosa sinensis L.–leaf. *YMER Digital*; Vol 22; 228-240
- Jeffery T.D, Richardson M.L. (2021). A review of the effectiveness of *Hibiscus* for treatment of metabolic syndrome. *Journal of Ethnopharmacology*. 270:113762.

- Jiang, W., Huang, Q., Meng, X., Rehman, R. U., Qian, K., Yang, X., ... & Wang, H. (2023). Ursolic Acid Inhibited Cholesterol Esterase and Pancreatic Lipase Activities and Decreased Micellar Cholesterol Solubility In Vitro. *Journal of Food Biochemistry*, 2023.
- Kim, J., Lee, Y. S., Kim, C. S., & Kim, J. S. (2012). Betulinic acid has an inhibitory effect on pancreatic lipase and induces adipocyte lipolysis. *Phytotherapy Research*, 26(7), 1103-1106.
- Kim, S. K., & Karadeniz, F. (2012). Biological importance and applications of squalene and squalane. *Advances in food and nutrition research*, 65, 223-233.
- Khongkarat, P., Traiyasut, P., Phuwapraisirisan, P., & Chanchao, C. (2022). First report of fatty acids in Mimosadiplotricha bee pollen with in vitro lipase inhibitory activity. *PeerJ*, 10, e12722.
- Krishnamurthy, Z. M. R., Ali, I., Dayoob, M., Hussein, S., & Khan, N. (2020). Hibiscus sabdariffa extract as anti-aging supplement through its antioxidant and anti-obesity activities. *Biomedical Research and Therapy*, 7(1), 3572-3578.
- Kumar L, Chakraborty G, Singh V, Mazumder A. (2012). *Hibiscus rosa sinensis*: A review on divine herb. *Journal of Advances in Pharmacy and Healthcare Research*. 2(4): 9-18.
- Mensink, R.P. Effects of stearic acid on plasma lipid and lipoproteins in humans. *Lipids* 40, 1201–1205
- Mukul Kumar, Deepika Kaushik, Jasjit Kaur, Charalampos Proestos, Fatih Oz, Emel Oz, Prerna Gupta, Priyanka Kundu, Anmol Kaur, Anisha Anisha and Ritika Ritika. (2022). A critical review on obesity: herbal approach, bioactive compounds, and their mechanism. *Appl. Sci*, 12, 8342.
- Li X, Morita S, Yamada H, Koga K, Ota W, Furuta T, Yamatsu A. (2022). Free linoleic acid and oleic acid reduce fat digestion and absorption in vivo as potent pancreatic lipase inhibitors derived from sesame meal. *Molecules*., 27,4910.
- Li, X., Zhang, Y., Wang, S., Shi, C., Wang, S., Wang, X., & Lü, X. (2022). A review on the potential use of natural products in overweight and obesity. *Phytotherapy Research*, 36(5), 1990-2015.

- Lim, S. Y., Steiner, J. M., & Cridge, H. (2022). Lipases: it's not just pancreatic lipase!. *American Journal of Veterinary Research*, 83(8).
- Lunagariya, N. A., Patel, N. K., Jagtap, S. C., & Bhutani, K. K. (2014). Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *EXCLI journal*, 13, 897.
- Magaña-Rodríguez, O.R. (2021). Efecto inhibitorio de la lipasa pancreática de diversos extractos vegetales como tratamiento y prevención de la hiperlipidemia. Tesis de Maestría, PIMCB. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Mamun, A., Islam, S., Alam, A. K., Rahman, M. A. A., & Rashid, M. (2013). Effects of ethanolic extract of *Hibiscus rosa-sinensis* leaves on alloxan-induced diabetes with dyslipidemia in rats. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 16(1), 27-31.
- Manna, P., & Jain, S. K. (2015). Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metabolic syndrome and related disorders*, 13(10), 423-444.
- Mhatre, S., Bhagit, A., & Yadav, R. P. (2017). *In vitro* studies of some edible spices on pancreatic lipase inhibitory activity. *Indian Drugs*, 54(2).
- Micera, M., Botto, A., Geddo, F., Antoniotti, S., Bertea, C. M., Levi, R., ... & Querio, G. (2020). Squalene: More than a step toward sterols. *Antioxidants*, 9(8), 688.
- Mnafgui, K., Derbali, A., Sayadi, S., Gharsallah, N., Elfeki, A., Allouche, N. 2015. Anti-obesity and cardioprotective effects of cinnamic acid in high fat diet-induced obese rats. *Journal of food science and technology*. 52(7): 4369-4377.
- Missoum, A. (2018). An update review on *Hibiscus rosa sinensis* phytochemistry and medicinal uses. *Journal of ayurvedic and herbal medicine*, 4(3), 135-146.
- Moqbel F.S, Naik P.K, Habeed M.N, Selvaraj S. (2011). Antidiabetic properties of *Hibiscus rosa sinensis* L leaf extract fractions on non-obese diabetic (NOD) mouse. *Indian Journal Exp Biol*. 49:24-29.
- Nwibo, D. D., Eze, M. I., & Okonkwo, T. M. (2016). Effects of *Hibiscus rosa-sinensis* leaf products on haematological indices, lipid profile and hepatic parameters

- of hyperlipidemic rat. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 10(12), 223-229.
- Nylen, K., Likhodii, S., & Burnham, W. M. (2009). The ketogenic diet: proposed mechanisms of action. *Neurotherapeutics*, 6(2), 402-405.
- Olayiwola, M. O., Ajayi, O. S., Balogun, O. S., Olawuni, I. J., Adeyemo, S. M., & October, N. (2021). Isolation, Identification and Biological Activities of the Constituents of Hibiscus rosa-sinensis Leaf Extract. *Ife Journal of Science and Technology*, 5(1), 33-48.
- Ong, S. L., Mah, S. H., & Lai, H. Y. (2016). Porcine pancreatic lipase inhibitory agent isolated from medicinal herb and inhibition kinetics of extracts from *Eleusine indica* (L.) Gaertner. *Journal of Pharmaceutics*, 2016.
- Pérez-Gil Romo, Sara Elena *et al.* (2022). «Obesidad en México: un acercamiento a la mirada social en los últimos 16 años.» *Interdisciplina* 10, n° 26: 91-117.
- Priya, K., & Sharma, H. P. (2021). Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of Hibiscus rosa sinensis. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 9(1), 21-26.
- Ross, I.A. (2003). Hibiscus rosa-sinensis. In: Medicinal Plants of the World. Humana Press, Totowa, NJ.
- Ríos-Chávez P, Perez-Gonzalez J, Salgado-Garciglia R, Ramírez Chávez E, Molina-Torres J, Martínez-Trujillo M, Carreon-Abud Y. Antibacterial and cytotoxicity activities and phytochemical analysis of three ornamental plants grown in Mexico. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 2019. 91(2): e20180468 pag 1-13.
- Sable, P. D., Kadam, K. A., Gangurde, H., Chavan, P. S., & Ingle, P. D. (2023). Medicinal and pharmacological action of various herbs on Diabetes mellitus: A review. *Journal of Pharmacy*, 13(3), 1-9.
- Savale, A. R., & Sonavne, I. K. (2022). The Review on Medicinal Uses of Hibiscus Flower.
- Sachdewa, A., Nigam, R., Khemani, L.D. (2001). Hypoglycemic effect of *Hibiscus rosa sinensis* L. leaf extract in glucose and streptozotocin induced hyperglycemic rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 39, 284–286.

- Senyilmaz-Tiebe, D., Pfaff, D. H., Virtue, S., Schwarz, K. V., Fleming, T., Altamura, S., ... & Teleanu, A. A. (2018). Dietary stearic acid regulates mitochondria in vivo in humans. *Nature communications*, 9(1), 1-10.
- Sinclair, A. J., Attar-Bashi, N. M., & Li, D. (2002). What is the role of α -linolenic acid for mammals? *Lipids*, 37(12), 1113-1123.
- Singh, M., Thrimawithana, T., Shukla, R., & Adhikari, B. (2020). Managing obesity through natural polyphenols: A review. *Future Foods*, 1, 100002.
- Song, D., Cheng, L., Zhang, X., Wu, Z., & Zheng, X. (2019). The modulatory effect and the mechanism of flavonoids on obesity. *Journal of Food Biochemistry*, 43(8), e12954.
- Sharma, Y., & Sharma, R. (2023). HIBISCUS ROSA-SINENSIS: A BOTANICAL MARVEL WITH MULTIFARIOUS PHYSIOLOGICAL ACTIVITIES.
- Shramko, V. S., Polonskaya, Y. V., Kashtanova, E. V., Stakhneva, E. M., & Ragino, Y. I. (2020). The short overview on the relevance of fatty acids for human cardiovascular disorders. *Biomolecules*, 10(8), 1127.
- Spanova, M., & Daum, G. (2011). Squalene—biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. *European journal of lipid science and technology*, 113(11), 1299-1320.
- Statovci D, Aguilera M, MacSharry J and Melgar S. (2017). The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. *Front. Immunol.*
- Takic, M., Pokimica, B., Petrovic-Oggiano, G., & Popovic, T. (2022). Effects of dietary α -linolenic acid treatment and the efficiency of its conversion to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in obesity and related diseases. *Molecules*, 27(14), 4471.
- Qi, X. (2018). Review of the clinical effect of orlistat. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 301, p. 012063). IOP Publishing.
- Vaca Navarrete, L. A. (2020). Paciente de sexo femenino de 40 años con sobrepeso y dislipidemia mixta. Tesis de licenciatura. Licenciatura en Nutrición y Dietética, Escuela de Salud y Bienestar, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador.

Watanabe, D., Kerakawati, R., Morita, T., Nakamura, T., Ueno, K., Kumamoto, T., ... & Chaichantipyuth, C. (2009). Isolation of β -sitosterol and digalactopyranosyl-diacylglyceride from *Citrus hystrix*, a Thai traditional herb, as pancreatic lipase inhibitors. *Heterocycles*, 78(6), 1497-1505.

Yuan, Q., Xie, F., Huang, W., Hu, M., Yan, Q., Chen, Z., ... & Liu, L. (2022). The review of alpha-linolenic acid: Sources, metabolism, and pharmacology. *Phytotherapy Research*, 36(1), 164-188.

Zhang, R., Xing, D., & Wang, C. (2021). Pancreatic Triglyceride Lipase Inhibitors Derived from Natural Products: How To Dig into the Truth.

Sitios web:

Organización Mundial de la salud. 2021. Obesidad y sobrepeso. Sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
Último acceso: 8 de noviembre de 2023.

Mayo Clinic. 2024. Pruebas y procedimientos, cirugía bariátrica. Sitio web: <https://www.mayoclinic.org/es/tests-procedures/bariatric-surgery/about/pac-20394258> Último acceso 16 de enero de 2024.