



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE BIOLOGÍA



Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción: Biotecnología Alimentaria

Efecto inhibitorio de la lipasa pancreática de diversos extractos vegetales como tratamiento y prevención de la hiperlipidemia y obesidad

PRESENTA

Biol. Oliver Rafid Magaña Rodríguez

Como requisito para obtener el grado de:

maestro en ciencias biológicas

Asesor de tesis:

D. C. Patricia Ríos Chávez

Morelia, Mich. Marzo 2021



**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO DE FITOBIOQUÍMICA (B4) DE LA
FACULTAD DE BIOLOGÍA (U.M.S.N.H) BAJO LA
DIRECCIÓN DE LA D.C. PATRICIA RÍOS CHÁVEZ**



Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca brindada para la realización de mi maestría.

Quiero agradecer a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y la Facultad de Biología por permitirme tener una sólida formación en un nivel profesional y ahora en esta ocasión, en mis estudios de posgrado en el Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas.

Agradezco principalmente a mi asesora de tesis, la Dra. Patricia Ríos Chávez por apoyarme y ayudarme a crecer, sin la cual este trabajo no se habría podido llevar a cabo.

Agradezco a mis sinodales Dr. Rafael Salgado Garciglia, Dr. Daniel Godínez Hernández, Dr. Asdrúbal Aguilera Méndez ya la Dra. Berenice Yahuaca Juárez, quienes me apoyaron durante esta trayectoria con sus observaciones y valioso conocimiento.

Por último y no menos importante, agradezco a mi familia y la amistad de mis compañeros y amigos de laboratorio por el apoyo emocional que me ayudo a seguir y a cumplir mis metas.

ÍNDICE	
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Obesidad	1
1.2. Consecuencias a la salud	2
1.3. Proceso digestivo de los ácidos grasos	2
1.4. Supresión del apetito	3
1.5. Efecto en la función de adipocitos	5
1.6. Inducción de termogénesis y lipólisis	6
1.7. Lipasa pancreática	7
1.8. Orlistat	8
1.9. Plantas medicinales	8
1.10. Inhibición de la lipasa pancreática por productos naturales	9
1.11 Toxicología en las plantas	11
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo General	15
4.2. Objetivos Específicos	15
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	17
6. RESULTADOS	18
6.1. Capítulo 1: Cuantificación de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática de diversos extractos de plantas	18
Resumen	18
Abstract	19
Introducción	20
Materiales y métodos	21
Resultados y discusión	24
Conclusión	34
Literatura citada	35

6.2 . Capítulo 2. Estimación de la asimilación de los triacilglicéridos en animales tratados con extracto etanólico de hoja seca de *H. rosa-sinensis*.

39

Resumen.....	39
Abstract	40
Introducción	41
Materiales y métodos	42
Resultados y discusión.....	44
Conclusión	49
Literatura citada.....	50
6.3 Capítulo 3. Toxicidad aguda y subaguda del extracto etanólico de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>.....	56
Resumen.....	56
Abstract	57
Introducción	58
Materiales y métodos	58
Resultados y discusión.....	61
Conclusión	68
Literatura citada.....	68
7. DISCUSIÓN GENERAL	71
8. CONCLUSIÓN.....	76
9. LITERATURA CITADA	77
10. ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia experimental utilizada en el presente trabajo	16
Figura 2. Fotografía de flor y hoja de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	30
Figura 3. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de hoja seca de <i>H. rosa-sinensis</i> en la actividad de la lipasa pancreática porcina.	31
Figura 4. Cinética enzimática del Orlistat.	32
Figura 5. Cinética enzimática del extracto etanólico de hoja seca de <i>H. rosa-sinensis</i>	33
Figura 6.- Curva de tolerancia de triacilglicéridos en ratas en 4 diferentes tiempos en ratas tratadas con una mezcla de lípidos, así como 3 inhibidores de lipasa pancreática.	43
Figura 7.- Concentración de triacilglicéridos en sueros de ratas tratadas durante tres semanas con una dieta alta en grasa y dos inhibidores de lipasa pancreática (Extracto de hoja seca de <i>H.rosa-sinensis</i> y orlistat)	45
Figura 8.- Concentración de Colesterol en sueros de ratas tratadas durante tres semanas con una dieta alta en grasa y dos inhibidores de lipasa pancreática (Extracto de hoja seca de <i>H.rosa-sinensis</i> y orlistat).	47
Figura 9. Contenido de proteínas en ratas control y con tratamiento en el hígado (A) y riñón (B).	63
Figura 10. Contenido de glutatión reducido en el hígado (A) y riñón (B) de ratas control y con tratamiento	64
Figura 11. Actividad de la enzima paraoxonasa uno (PON1) en el hígado (A) y riñón (B) del grupo control y con tratamiento.	65
Figura 13. Concentración de malondialdehído (A) y 4-hidroxinonenal (B) en riñón del grupo control y con tratamiento.	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos adversos del Orlistat	8
Tabla 2. Material vegetal utilizado para la realización de extractos etanólicos.	21
Tabla 3. Porcentaje de inhibición baja de los diferentes extractos vegetales a concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400µg/mL.....	24
Tabla 4. Porcentaje de inhibición moderada de los diferentes extractos vegetales a concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400µg/mL.....	26
Tabla 5. Porcentaje de inhibición alta de los diferentes extractos vegetales a concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400µg/mL.....	27
Tabla 6. Porcentaje de inhibición muy alta de los diferentes extractos vegetales a concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400µg/mL.....	29
Tabla 7. Efecto en la concentración de triacilglicéridos en suero de 4 grupos de ratas durante 3 horas.	45
Tabla 8. Efecto en el peso en 4 grupos de ratas durante tres semanas con una dieta alta en grasas (DAG) y dos inhibidores de la lipasa pancreática (Extracto de hoja seca de <i>H.rosa-sinensis</i> y orlistat).....	47
Tabla 9. Estudio de toxicidad aguda de extractos etanólicos de hojas secas de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> en ratas Wistar.....	62
Tabla 10. Efecto de la toxicidad subaguda del extracto de hoja seca de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> sobre el peso corporal en dosis de extracto de 1000 mg/kg de peso corporal a 28 días.....	63

RESUMEN

Antecedentes: La obesidad es uno de los problemas más importantes en la actualidad y se presenta debido a la acumulación excesiva de grasas, se asocia a muchas enfermedades como algunos tipos de cáncer, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. En el presente trabajo se investigaron varios extractos vegetales como una alternativa para prevenir y combatir a la obesidad mediante la inhibición de la lipasa pancreática.

Métodos: Se recolectó material vegetal de 37 plantas para la realización de los extractos, se probó la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática *in vitro* para posteriormente utilizar la planta con mejor inhibición de lipasa en una estimación de la asimilación de triacilglicéridos en animales a diferentes dosis (62.5, 125 y 250 mg/kg) midiendo los triacilglicéridos cada hora durante 3 horas, después la estimación de asimilación de triacilglicéridos con una dieta alta en grasa durante tres semanas con la dosis con mejor respuesta en el experimento anterior, se midió el peso semanalmente y al término se tomó una muestra sanguínea para medir triacilglicéridos y colesterol. El estudio de toxicidad aguda fue con una sola dosis oral a 3 concentraciones (100, 316 y 1000 mg/kg) y se mantuvieron en observación continua durante 72 h y 12 días, por último, la prueba de toxicidad subaguda con la dosis no letal más alta encontrada en el experimento anterior y se administró vía oral diariamente durante 28 días, al final del experimento se extrajo el hígado y los riñones para determinar parámetros bioquímicos como GSH, PON 1, MDA y HNE, además de proteínas totales en cada órgano. Los animales usados en los experimentos fueron *Ratus norvegicus* cepa Wistar (n=6) (mantenidos en condiciones de bioterio); en los estudios se utilizó el orlistat como estándar positivo de inhibición.

Resultados: El extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* presentó la mejor inhibición de lipasa pancreática, por lo cual se utilizó en los posteriores experimentos; en la prueba de estimulación de asimilación de triacilglicéridos la dosis de 125 mg/kg resultó con un potencial hipolipidémica similar al orlistat, de igual manera después de 3 semanas con una dieta alta en grasa los animales tratados con orlistat y el extracto a una dosis de 125 mg/kg presentaron una disminución significativa en el peso así como en los triacilglicéridos en suero, el colesterol no resultó visiblemente alterado en ningún tratamiento; por último en las pruebas toxicológicas no se observaron cambios significativos en proteínas totales GSH, PON1, MDA y HNE tanto en hígado como en riñón.

Conclusión: Este estudio sugiere que el extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* posee un alto efecto hipolipidémico similar al orlistat, además de no presentar riesgos a la salud en dosis igual o menores a 1000 mg/kg, por lo cual podría ser usado para el tratamiento y prevención de la obesidad e hiperlipidemia.

Palabras clave: Obesidad, *Hibiscus rosa-sinensis*, Lipasa pancreática, Orlistat, Triacilglicéridos.

ABSTRACT

Background: The obesity is one of the most important problems and occurs due to the excessive accumulation of fat, and it is associated with many diseases such as some types of cancer, type 2 diabetes and cardiovascular disease. The aim of this study was to evaluate various plant extracts as an alternative to prevent and combat obesity for their effect on pancreatic lipase activity.

Methods: Plant material was collected from 37 plants to make the extracts, subsequently the degree of inhibition of pancreatic lipase *in vitro* was compared using orlistat as a control. The plant with the highest inhibitory lipase activity, was evaluate to the estimation of triacylglycerides in plasma of rats, different dose 62.5, 125 and 250 mg/kg of the extract of dry leaves of *H. rosea-sinesis* was used. Triacylglycerides were measument each hour during three hours. The determination of the lipid lowering effects of *H. rosa-sinensis* at 125 mg/kg was study in a high-fat diet in Wistar rats, during three weeks. Body weight was measured at weekly intervals. At the end of third weeks the triglycerides and cholesterol levels were also estimated. The acute toxicological test was conducted in Wistar rats. The extract of *H. rosa-sinensis* was administered in a single dose of 100, 316 and 1000 mg/kg and observed for behavioral changes and mortality. In subacute toxicity studies, Wistar rats were administered the *H. rosea-sinensis* at dose of 1000 mg/kg via oral dailly for 28 days. Rats were observed if there are any changes in their body weight, food and water intake during this period. Liver and kidney were used to determine biochemical parameters such as GSH, PON 1, MDA and HNE and total proteins.

Results: Ethanolic extract of *Hibiscus rosa-sinensis* of dry leaves, displayed the highest inhibitory activity of pancreatic lipase 71.90 % at 400 µg/mL, very similar to orlistat (70%). *H. rosa-sinensis* presented an un-competitive inhibition, unlike orlistat, which presents a mixed type of inhibition. The *H. rosa-sinensis* dry leaves extract a dose 125 mg /kg, significantly suppressed the elevation of blood triacylglyceride after oral administration of an oil emulsion, similar to orlistat. The results showed that after treatment, the *H. rosa-sinensis* extract inhibited the increase of body weight, and displayed a significant decreased in triacylglycerides and total colesterol levels in serum, compared with orlistat group but without having the side effects of this drug.

In acute and subacute toxicity, neither mortality nor any change in the behavior in rats were observed. The IC₅₀ is greater than 1000 mg/kg. No alterations had been observed in the liver and kidney. Biomarkers such as GHS, PON 1, MDA, HNE and total proteins did not showed significant changes with compared to control group.

Conclusion: This study suggests that the dry leaves extract of *H. rosa-sinensis* has a high hypolipidemic effect very similar to orlistat, additionally, is relatively safe at doses equal or less than 1000 mg / kg, which could be be used for the treatment and prevention of obesity and hyperlipidemia.

Key words: Obesity, *Hibiscus rosa-sinensis*, Pancreatic lipase, Orlistat, Triglycerides.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la obesidad es un problema que se encuentra como uno de los más importantes en todo el mundo. La obesidad y el sobrepeso pueden ser definidos como una acumulación anormal y excesiva de tejido adiposo, el cual es desencadenado por la acumulación enorme de energía y la falta del uso de esta (Bais *et al.*, 2014).

Una de las estrategias en la prevención de la obesidad es alterando el metabolismo de los lípidos por la inhibición de la absorción de las grasas (Gholamhoseinian *et al.*, 2010). La tetrahidrolipstatina (Orlistat TM), derivado de lipstatina, obtenida de *Streptomyces toxytricini*, es el único inhibidor de la lipasa pancreática aprobado actualmente para el tratamiento de la obesidad a largo plazo. Su uso puede resultar hasta en un 10 % de pérdida de peso cuando se usa en combinación con dieta y actividad física, sin embargo, este fármaco puede ocasionar efectos adversos hepáticos (colelitiasis, hepatitis colostática e insuficiencia hepática subaguda) (Tiss *et al.*, 2001, Tiss *et al.* 2009).

Las plantas son un gran reservorio de metabolitos secundarios, muchos de estos con propiedades farmacológicas importantes por lo cual podrían ser usadas como aditivo en los alimentos para disminuir la absorción de los lípidos de la dieta. Con base en lo anteriormente expuesto, el presente trabajo de investigación propone una alternativa natural para la inhibición de la lipasa como un complemento alimenticio para el tratamiento de la obesidad.

1.1. Obesidad

La obesidad es el resultado del aumento en el consumo y acumulación de energía que necesita el cuerpo para llevar a cabo las funciones normales. Si esta energía es almacenada, los adipocitos aumentan de tamaño, produciendo la característica patológica. El crecimiento patológico de los adipocitos, sucesivamente, producen una alteración en muchos péptidos y señales nutricionales que son responsables de la enfermedad conocida como obesidad (Bray, 1999).

1.2. Consecuencias a la salud

La obesidad está estrechamente asociada con el deterioro de la salud; es un factor de riesgo en el desarrollo de diabetes tipo 2, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, enfermedad osteoarticular, varios tipos de cáncer como de colon, próstata y mama, además de apnea de sueño entre otros (Clark *et al.*, 2000; Astrup *et al.*, 2008; Mnafigui *et al.*, 2014).

1.3. Proceso digestivo de los ácidos grasos

La digestión de las grasas es un proceso complejo que se inicia en la cavidad bucal con la actividad de la enzima lipasa lingual (Hamosh y Burns, 1977), la cual actúa en el alimento masticado o bolo alimenticio en su camino hacia el estómago y dentro del mismo, ya que no es inactivada por la actividad proteolítica de la pepsina gástrica. La lipasa lingual actúa sobre los ácidos grasos de cadena corta (C4 – C10), reconociendo los que se encuentran en posición sn-3 de los triacilglicéridos, poco eficaz en sn-2 y con actividad nula sobre los sn-1 y que son solubles en el contenido gástrico, estos ácidos grasos son absorbidos por el estómago para transportarse mediante la albumina a través de la sangre casi exclusivamente al hígado por la vía porta, donde podrán ser utilizados con fin energético gracias a la beta oxidación mitocondrial (Hamosh ,1978; Bash y Babayan, 1982). Los productos restantes de la hidrólisis de la lipasa lingual; ácidos grasos libres C12 o de mayor longitud, diglicéridos sn-1 y sn-2 así como una pequeña cantidad de monoglicéridos sn-2, viajan al duodeno en donde ocurre un cambio de pH y son interceptados por las enzimas lipasa pancreática y carboxil éster hidrolasa (Carey y Hernell, 1992). La actividad hidrolítica de estas enzimas es facilitada por el jugo biliar, en particular por las sales primarias (colato). La lipasa pancreática requiere de la presencia de la colipasa la cual es una proteína activadora. La estereoespecificidad de la lipasa pancreática consta en hidrolizar específicamente las posiciones sn-1 y sn-2 de los triacilglicéridos, siendo más activa en la posición sn-1. La estereoespecificidad de la carboxil éster hidrolasa no es tan estricta pudiendo romper diglicéridos tanto posiciones sn-1, sn-2 o sn-3 pero a partir de sn-1, sn-2 o sn-2, sn-3, sin embargo, no hidroliza triacilglicéridos (Bottino *et al.*, 1967). Los monoglicéridos y ácidos

grasos insaturados son emulsificados por las sales biliares y los fosfolípidos secretados por la bilis, formando micelas que facilitan la transferencia hacia las células del epitelio intestinal para ser absorbidas (Donnet-Hughes *et al.*, 2001). En estas células los productos son reesterificados a triacilglicéridos, posteriormente, se secretan hacia la linfa a través de los quilíferos y posteriormente hacia la circulación en forma de quilomicrones (Valenzuela *et al.*, 1997). Por otro lado, los ácidos grasos saturados de cadena larga (C18 o mayores) y que ocupaban posiciones sn-1 y sn-3 de los triacilglicéridos consumidos, son difícilmente absorbidos ya que gracias a su punto de fusión (superior a 37 °C) se encuentran en estado sólido o semisólido (Graham y Sackman, 1983), por lo que estos ácidos grasos no se emulsifican ni absorben, así que se excretan en las heces (Bash y Babayan, 1982).

1.4. Supresión del apetito

La sensación de hambre y saciedad está regulada por complejas interacciones neuronales y endocrinas entre el intestino, cerebro y tejido adiposo. Un ejemplo es la grelina, una hormona que es liberada por el estomago cuando el cuerpo requiere de alimento, actuando sobre células cerebrales hipotalámicas en el sistema nervioso central (SNC) para así provocar la sensación de hambre; Al ingerir el alimento, se activa la vía aferente del nervio vago, lo que lleva a la inhibición del centro del hambre en el cerebro. También, al ingerir alimentos se induce la liberación de colecistoquinina por células epiteliales del intestino delgado, que inhibe la actividad del neuropéptido “Y” estimulante del hambre en el hipotálamo. La leptina es una hormona que induce la saciedad, es liberada por los adipocitos tras la estimulación con insulina. La leptina inhibe la actividad del neuropéptido “Y” y el neurotransmisor de ácidos grasos estimulante del hambre anandamida y a su vez activa al péptido supresor del hambre (hormona estimulante de los melanocitos α). La serotonina, noradrenalina, dopamina y los endocannabinoides también regulan el apetito y la saciedad y se sabe que la sibutramina, la cual es un fármaco antiobesogénico que ha sido retirado del mercado debido a los riesgos asociados de eventos cardiovasculares, reduce el apetito inhibiendo la recaptación de serotonina, noradrenalina y dopamina en el SNC. El rimonabant, un fármaco

antiobesogénico que se comercializó en Europa antes de su retirada debido a efectos adversos, reduce el apetito bloqueando el receptor cannabinoide 1 (Ahima y Antwi, 2008; Field *et al.*, 2010; Dietrich y Horvath, 2012; Rui, 2013).

Se han aislado compuestos de plantas que tienen usos en la medicina tradicional China con potencial como supresores del apetito por ejemplo el celastrol, compuesto triterpenoide pentacíclico que se encuentra en las raíces de la vid del dios del trueno (*Tripterygium wilfordii*), planta con usos terapéuticos en la medicina tradicional china para la artritis reumatoide y fiebre. El celastrol reduce el apetito y la ingesta de alimentos en ratones que se alimentan con una dieta alta en grasas HFD por sus siglas en inglés *High fat diet* y conducen a una reducción del peso corporal del 45 % cuando se administra por vía oral (10 mg / kg diariamente) a ratones alimentados con HFD durante 3 semanas, un efecto que fue atribuido principalmente a una mayor sensibilidad a la leptina relativa a los controles tratados con vehículo. El efecto sensibilizador a la leptina de celastrol se identificó mediante un ensayo de detección para moléculas que reducen el estrés en el retículo endoplásmico, el cual ocurre en las células cuando se acumulan proteínas mal plegadas (Liu *et al.*, 2015). Estrés y activación del retículo endoplásmico hipotalámico de la respuesta de proteína desplegada ocurre en individuos con obesidad y se cree que contribuyen a niveles bajos de la señalización del receptor de leptina y a la resistencia a la leptina, las cuales están asociadas a la obesidad (Ozcan *et al.*, 2009). La resistencia a la leptina es la falta de reducción del apetito en respuesta a la leptina y ocurre en la obesidad a pesar de los altos niveles sanguíneos de leptina (Myers *et al.* 2008). El celastrol reduce el estrés del retículo endoplásmico y activa la señalización del receptor de leptina en el hipotálamo, reduciendo así la resistencia a la leptina. En comparación con los controles exclusivos para vehículos, el celastrol también aumenta la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con una HFD (Liu *et al.*, 2015). El estrés del retículo endoplásmico ocurre en el páncreas, en las células β de pacientes con Diabetes y se ha asociado con la muerte de células β inducida por hiperglucemia e hiperlipidemia. Las propiedades antidiabéticas del celastrol podrían tener efecto

sobre el estrés del retículo endoplásmico, así como de los efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Lee y Ozcan, 2013; Allison *et al.* 2001).

El fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*) es una especia que se usa en varios países por su valor culinario y alimenticio y se ha estudiado por el efecto que tiene como inductor de la saciedad. En un estudio aleatorio cruzado en el que participaron 18 individuos aparentemente sanos, con obesidad, a los cuales se les administró en el desayuno 8 g de fibra de fenogreco, presentaron mayor sensación de saciedad en comparación con el grupo al cual se le administró el placebo (Mathern *et al.*, 2009).

Compuestos vegetales naturales como la efedrina de *Ephedra sinica* también suprime el apetito mediante la activación de receptores adrenérgicos en el hipotálamo (Wellman, 1992; Powers, 2001). Sin embargo, el uso de compuestos relacionados con las anfetaminas como la efedrina se asocia con efectos adversos graves, que incluyen adicción, síntomas psiquiátricos, taquicardia, hipertensión y problemas cardíacos (Shekelle, 2003).

1.5. Efecto en la función de adipocitos

Aunque las HFD se asocian con el aumento de peso, la obesidad y la diabetes, una cantidad normal de tejido adiposo es fundamental como fuente de energía y para regular la temperatura corporal. La grasa corporal consiste en tejido adiposo blanco (TAB), que es el sitio principal de almacenamiento de energía y tejido adiposo marrón (TAM), que contribuye a la termogénesis (Enerbäck, 2010). Un adipocito blanco posee una gran vacuola de lípidos en forma de triacilglicéridos y ésteres de colesterol, cuando existe un estado de poca o nula entrada de energía al organismo los triacilglicéridos pueden hidrolizarse por lipólisis para liberar ácidos grasos, que pueden entrar en la sangre y sufrir β -oxidación en la mayoría de los tejidos para producir energía. Comparado con niveles normales, en presencia de un exceso de lípidos, los adipocitos blancos aumentan tanto en tamaño como en número. Los adipocitos tienen importantes funciones endocrinas, como liberar hormonas y citocinas (adipocinas) que regulan los procesos homeostáticos, incluido el estado de saciedad, los niveles de energía y función inmunológica. Los adipocitos

hipertrofiados secretan más adipocinas proinflamatorias, como factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina 6 (IL 6), que los adipocitos de tamaño normal. Estas adipocinas proinflamatorias interfieren con la señalización de la insulina e inducen una inflamación crónica. La resistencia a la insulina sistémica aumenta la demanda de insulina y eventualmente puede conducir al desarrollo de diabetes si la demanda excede la capacidad de secreción de las células β pancreáticas (Waki y Tontonoz, 2007; Jung y Choi, 2014).

Los fitoquímicos pueden inhibir la proliferación y diferenciación de preadipocitos y/o inducir apoptosis en adipocitos maduros. Se ha demostrado que el Galato de epigallocatequina (EGCG) del té verde reduce la viabilidad de los preadipocitos de forma dependiente a la dosis y al tiempo en cultivo (Moon *et al.*, 2007), además el EGCG a concentraciones de 50 a 200 $\mu\text{mol/L}$ en un lapso de 12 a 24 h así como el resveratrol (componente de uvas y vino tinto) a 100 $\mu\text{mol/L}$ en 48 h inducen también apoptosis en adipocitos maduros (Lin *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Rayalam *et al.*, 2008). Otros fitoquímicos como la capsaicina (que se encuentra en los chiles picantes) y quercetina tienen propiedades antiproliferativas y proapoptóticas sobre los adipocitos. El resveratrol y la quercetina inhiben la expresión del receptor y activador proliferador del peroxisoma (RyAPP), que es el factor de transcripción principalmente responsable de activar la diferenciación de células madre mesenquimales en adipocitos (Hsu y Yen, 2007; Yang *et al.*, 2008; Siersbaek *et al.*, 2010), Yun, (2004) menciona que este efecto podría ser el principal responsable de la inhibición de la adipogénesis por estos compuestos, ya que al administrar el extracto etanólico de las raíces de ginseng a 500 mg/kg diariamente durante 8 semanas en un experimento con un modelo de HFD, se redujo el tamaño de los adipocitos blancos en un 62 % en relación con el control.

1.6. Inducción de termogénesis y lipólisis.

Muchos productos vegetales, incluida la efedrina y la cafeína, tienen efectos simpaticomiméticos y otras actividades fisiológicas que inducen la lipólisis (Powers, 2001). La acumulación de lípidos y el almacenamiento de energía también podrían reducirse por la inducción de termogénesis en el tejido adiposo marrón (TAM) y los

músculos. Los resultados sugieren que grandes cantidades metabólicamente activas de TAM están presentes en humanos (Enerbäck, 2010; Seale y Lazar, 2009). TAM está innervado por nervios simpáticos y contiene la proteína desacoplante termogénica mitocondrial de grasa marrón 1 (UCP1), que produce calor por β -oxidación de lípidos y metabolismo de la glucosa, en lugar de producir ATP. La termogénesis es normalmente activada por el frío, que estimula el receptor transitorio de canales potenciales (TRP) en las neuronas sensoriales, transmitiendo señales al cerebro e incrementando la actividad simpática. Se induce la expresión del UCP1 análogo UCP3 por hormonas tiroideas, β 3-adrenérgicos y leptina, estimulando la termogénesis en los músculos y TAM (Gong *et al.*, 1997).

Varios compuestos vegetales, incluida la capsaicina y las catequinas como EGCG (epigallocatequina galato) activan los canales TRP en las neuronas, promoviendo así la termogénesis de TAM (Saito *et al.*, 2015). En 2008 Yoon *et al.* realizaron un estudio utilizando un modelo de HFD administrando además un extracto etanólico de una variante de *Solanum tuberosum* (papa), en tratamientos de 100 a 500 mg/kg durante 6 semanas, encontrando que el extracto de papa activa la expresión de UCP3 en TAM y el hígado, reduciendo el peso corporal y la deposición de grasa, en relación con los controles que solo fueron alimentados con HFD. Además, compuestos vegetales como la berberina, un alcaloide que se encuentra en las plantas de *Berberis* spp., no solo induce la expresión de UCP1 en TAM, sino que también promueve la diferenciación de TAB en TAM, contribuyendo aún más a la termogénesis y la pérdida de peso (Zhang *et al.*, 2014)

1.7. Lipasa pancreática

La lipasa pancreática (triacilglicerol acilhidrolasa) es la enzima más importante en la digestión de los triacilglicéridos ya que se encarga de la hidrólisis de los ésteres de glicerol principalmente de ácidos grasos de cadena larga para formar diacilglicerol y ácidos grasos (Gholamhoseinian *et al.*, 2010; Lunagariya *et al.*, 2014).

1.8. Orlistat

El orlistat es un fármaco utilizado como tratamiento de la obesidad, su principal función es prevenir la absorción de lípidos consumidos en la dieta, reduciendo así la ingesta calórica (Londoño-Lemos, 2012). Este fármaco actúa en el lumen intestinal formando un enlace covalente con el sitio activo de serina de las lipasas pancreática y gástrica, al formar el enlace covalente el orlistat inhibe la hidrólisis de las grasas ingeridas evitando así la formación de ácidos grasos libres y monoglicéridos (Elangbam, 2009). El orlistat demostró que reduce en humanos la absorción de grasas en aproximadamente un 30 % (Toplak *et al.*, 2005). Los efectos adversos reportados del orlistat se enlistan en la tabla 1.

Sistema corporal	Efecto
Sistema gastrointestinal	Heces grasas / aceitosas, urgencia fecal, diarrea, flatulencias, dolor abdominal, manchado fecal, fisura anal, colelitiasis, pancreatitis, hepatitis colestática aguda, insuficiencia hepática subaguda, necrosis hepatocelular masiva, lesión hepática grave.
Sistema nervioso	Depresión, malestar, lasitud, dolor de cabeza.
Función renal	Hiperoxaluria entérica, lesión renal aguda secundaria a nefropatía aguda por oxalato, insuficiencia renal rápidamente progresiva, estreñimiento, poliuria, polidipsia, edema en la parte inferior de las piernas.
Sistema endócrino	Cetoacidosis diabética
Piel	Vasculitis cutánea, erupción liquenoide.
Genitales	Vaginitis y vulvitis

1.9. Plantas medicinales

Las plantas medicinales durante mucho tiempo han presentado un papel importante en la salud humana, desde el surgimiento del hombre hasta la actualidad se han acumulado conocimientos tradicionales de plantas medicinales; se estima que el 80 % de las personas de los países en desarrollo utilizan todavía la medicina tradicional que se deriva de las plantas aromáticas y medicinales (Castro, 2006).

Las plantas generan un gran número de productos metabólicos con importancia alimenticia, cosmética, de interés agroquímico y de gran interés farmacéutico (Karuppusamy, 2009), estos compuestos suelen ser específicos, siendo producidos por géneros o especies únicas de plantas (Shilpa *et al.*, 2010).

1.10. Inhibición de la lipasa pancreática por productos naturales

La inhibición de la lipasa pancreática mediante plantas ha sido estudiada gracias al potencial antiobesogénico, además, el incremento de productos naturales para el control de la obesidad ha aumentado el interés en encontrar inhibidores de la lipasa pancreática evitando los efectos secundarios (Seyedan *et al.*, 2015)

En 2011 se reportó la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática del extracto etanólico de rizomas de *Bergenia crassifolia*, así como de sus fracciones con hexano, cloroformo, acetato de etilo y agua, encontrando que la IC₅₀ del extracto crudo fue de 3.4 µg/mL, mientras que las diferentes fracciones con distintos solventes fueron semejantes al extracto crudo (Ivanov *et al.*, 2011).

En el mismo año se realizó un barrido de 23 extractos metanólicos de plantas usadas en la medicina tradicional de Jordán, perteneciendo estas plantas a 15 diferentes familias, dentro de las cuales se encuentran la familia *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Malvaceae*, *Fabaceae*. La actividad inhibitoria de la lipasa pancreática se midió en cuatro diferentes concentraciones de los extractos (12.5, 25, 50 y 200 µg/mL) utilizando el orlistat como control. Solamente 13 extractos presentaron una actividad inhibitoria de la lipasa pancreática con una IC₅₀ entre 107.7 y 937.5 µg/mL, tendiendo a *Malva nicaeensis* (260.7 µg/mL), *Salvia spinosa* (156.2 µg/mL),

Anthemis palestina (107.7 µg/mL) *Chrysanthemum coronarium* (286.1 µg/mL) y *Adonis palaestina* (937.5 µg/mL) (Bustanji *et al.* 2011).

Chompu *et al* en 2012 utilizando el extracto acetónico de las semillas de *Alpinia zerumbet* encontró una IC₅₀ de inhibición de la lipasa pancreática *in vitro* de 5 µg/mL. Se han hecho estudios sobre la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática en extractos etanólicos de plantas comestibles presentes en la dieta mediterránea, tales como *Amarantus retlofelxus*, *Asparagus acutifolius*, *Cichorium intybus*, *Origanum vulgare* y *Sonchus asper* entre otros, teniendo como resultados que *Amarantus retlofelxus* tiene una IC₅₀ de 8.5 mg/mL y las demás especies tienen una IC₅₀ mayor a 10 mg/mL (Conforti *et al.*, 2012).

En 2013, Teixeira *et al.* observó la capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática *in vitro* del extracto etanólico de *Passiflora nitida* a concertaciones de 1,10 y100 µg/mL, utilizando orlistat como control, encontrando una IC₅₀ de 21.2 µg/mL. Adicionalmente, realizó un estudio *in vivo* utilizando un modelo de dieta hipercalórica o dieta de cafetería en ratas, teniendo cinco grupos, un grupo con dieta estándar y cuatro grupos con una dieta de cafetería, administrando diariamente a tres de estos últimos con un inhibidor de la lipasa pancreática (orlistat) y el extracto de *P. nitida* a 2 concentraciones (50 y 100 mg/kg). Encontró que los grupos administrados con *P. nitida* tuvieron una ganancia de peso muy similar a la del orlistat además de que el grupo que solamente fue alimentado con dieta de cafetería tuvo un aumento significativamente mayor al control y los demás tratamientos, sin embargo, los grupos administrados con extracto no tuvieron una disminución en la grasa retroperitoneal, siendo muy similares al grupo con dieta de cafetería.

Por último, Ortega-Pérez (2020) administrando vía oral un extracto etanólico de hojas de *Callistemon citrinus* a una dosis de 250 mg/kg a ratas bajo una dieta hipercalórica durante 13 semanas, encontró una disminución significativa en el índice de masa corporal, ganancia de peso, índice de adiposidad, así como en el índice de Lee, lo que indica que el extracto posee un potencial antiobesogénico.

A pesar de ser extensas las listas de especies con efecto inhibitorio de la lipasa pancreática *in vitro* son pocos los seguimientos *in vivo*.

1.11 Toxicología en las plantas

La farmacología puede definirse como el estudio de las sustancias que interactúan con los sistemas vivos a través de procesos bioquímicos, sobre todo mediante la unión con moléculas reguladoras y activadoras o por inhibición de procesos corporales normales (Katzung, 2009). La farmacología se divide en tres principales áreas de estudio, farmacocinética, fármacodinámica y toxicología.

La farmacocinética es el estudio cuantitativo del comportamiento de los fármacos dentro del organismo, para conocer cómo el organismo influye en estos, ya sea en su absorción y distribución, así como en sus modificaciones (metabolismo y biotransformación) y su excreción. Por otro lado, la farmacodinámica está enfocada en las acciones que realizan los fármacos dentro del organismo (efectos bioquímicos, fisiológicos y mecanismos de acción) (Katzung, 2009; Pascuzzo, 2008).

La toxicología es el estudio de los efectos nocivos de sustancias químicas sobre los seres vivos (Ariëns *et al.*, 1978), desde células individuales hasta organismos e incluso ecosistemas complejos (Katzung, 2009). Estos efectos pueden ocurrir de maneras diferentes, con un rango que se extiende desde la muerte inmediata hasta cambios sutiles que incluso pueden pasar desapercibidos (Pascuzzo, 2008).

Se ha demostrado que muchos medicamentos comúnmente usados como el paracetamol, Tylenol o acetaminofén, que son usados por sus propiedades analgésicas y antipiréticas pueden ocasionar hepatotoxicidad por sobredosis o bien DILI por sus siglas en ingles *drug-induced liver injury* (Dash *et al.* 2007), otros medicamentos que ocasionan DILI son Captopril, Diclofenaco, Amoxicilina, Ketorolaco, entre otros (Arundel y Lewis 2007). El riñón también es un órgano gracias a su función excretora y detoxificante es susceptible a daños por xenobióticos (Foulkes y Hammond, 1975).

Se ha demostrado que muchos xenobióticos provocan un aumento en los niveles de radicales libres, moléculas o átomos que poseen un electrón desapareado o bien impar en su orbital externo y aunque normalmente se producen en las células, el hígado es más susceptible al daño debido a su función detoxificante (Gutiérrez-Salinas y Morales-Gonzales 2004). Al incrementar las especies reactivas al oxígeno (ROS) o cuando hay un desequilibrio y la oxidación excede la capacidad del sistema antioxidante se dice que hay un estrés oxidativo el cual provoca la lipoperoxidación y daños oxidativos al DNA (Yoshikawa y Naito 2002). Es por esto que es necesario tener marcadores que permitan determinar si el fármaco es o no tóxico, en este caso los productos del estrés oxidativo como el malondialdehído (MDA) e hidroxi-alequenas, moléculas como el glutatión y enzimas como la paraoxanasa 1 (PON 1) permiten observar si hay daños o estrés oxidativo gracias a xenobióticos como fármacos o extractos vegetales (López-Mejía, 2018).

Las células cuentan con una serie de mecanismos enzimáticos de defensa, tales como: la enzima superóxido dismutasa, la catalasa y la enzima glutatión peroxidasa y sistemas de naturaleza no enzimática como el glutatión reducido, así como los compuestos antioxidantes que provienen de la dieta como la vitamina C y vitamina E presentes en el propio organismo (Bhattacharyya *et al.*, 2014). El glutatión (GSH) es un antioxidante que participa en la reducción de ROS e inactivación de xenobióticos, controla la permeabilidad de la membrana y el transporte de aminoácidos, funciona como coenzima, interviene en el proceso de apoptosis y síntesis de proteínas, ADN y ARN, además de regular la formación y el mantenimiento de la forma activa de ciertas enzimas (Lu, 1999; Martínez-Sarrasague *et al.*, 2006).

El daño a los lípidos membranales es ocasionado cuando los radicales libres hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) actúan en la membrana, arrebatando átomos de hidrógeno de los fosfolípidos, inactivándose el radical hidroxilo formando agua y formando un radical lipídico ($\text{R}\cdot$), este después de sufrir un arreglo molecular a un dieno conjugado, puede reaccionar con el oxígeno, originando así un radical peroxilo ($\text{R-OO}\cdot$), que a su vez puede reaccionar con otros ácidos grasos membranales transformándose en

hidroxiperoxido (R-OOH), que en presencia de complejos metálicos se descompone en más radicales como el hidroxilo esparciendo la peroxidación, este proceso se conoce como lipoperoxidación, el cual provoca daños graves, incluso la destrucción de las membranas lipídicas si no hay procesos inhibitorios que la frenen (Halliwell, 1991; Nikki *et al.*,1991).

Como productos de la lipoperoxidación se encuentran los aldehídos, siendo el MDA uno de los más estudiados ya que puede generar daños a moléculas como el DNA (Halliwell, 1991). Además de los MDA, se forman compuestos como el hidroxinonenal (HNE), que de igual manera reaccionan con el DNA, inhibiendo la síntesis de proteínas y la síntesis de RNA, inhabilitando también la reparación del DNA y disminuyendo además la capacidad protectora de la célula uniéndose al glutatión (Benedetti, 1980).

La PON1 fue primeramente conocida por su actividad protectora sobre la toxicidad de los componentes de los organofosfatos (por hidrolizar el paraxón) y su función arilesterasa (hidrolizando el fenilacetato y 4-nitrofenilacetato) (Dantoine *et al.*, 1998).

Es sintetiza en el hígado, es una glicoproteína dependiente del calcio y presenta varias actividades: paraoxanasa, arilesterasa, lactonasa (hidroliza lactonas aromáticas y alifáticas, además de catalizar la reacción reversa de lactonización de ácidos hidroxí-carboxílicos), además inhibe la oxidación lipídica (Nus *et al*, 2008).

La actividad de la PON1 se encuentra disminuida en pacientes con cirrosis y hepatitis crónica (por su síntesis en el hígado) y es empleada como marcador del daño hepático (Ferré *et al.*, 2002).

Los estudios experimentales realizados en animales han proporcionado un apoyo adicional a los estudios *in vitro* que indican que la función fisiológica PON1 es hidrolizar los lípidos oxidados, siendo considerada como una enzima antioxidante, se ha demostrado que el 4-hidroxi-2-nonenal, el cual es un producto final en la lipoperoxidación, estimula la producción de MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) el cual está involucrado en gran medida en la reacción inflamatoria, ya que esta regula la migración de los monocitos en los tejidos y su posterior diferenciación en macrófagos. Las LDL (Lipoproteínas de baja densidad) oxidados

contribuyen al proceso inflamatorio por inducir la producción de MPC-1 mientras que las HDL (Lipoproteínas de alta densidad) tienen función antiinflamatoria y antioxidante, la PON1 al inhibir la oxidación de LDL merma la producción de MPC-1 dándole la atribución de enzima antiinflamatoria (Stancu, 2015).

2. JUSTIFICACIÓN

En virtud del gran incremento en obesidad de la población mexicana conllevando a otras enfermedades; ya que los fármacos actuales usados en contra de la obesidad poseen efectos adversos de suma importancia es necesario encontrar alternativas naturales como extractos vegetales capaces de prevenir o disminuir la hiperlipidemia y la obesidad sin los efectos adversos de los fármacos actualmente usados, por lo cual determinar la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática en diversas plantas ayudará a encontrar especies con potencial para combatir la hiperlipidemia y la obesidad.

3. HIPÓTESIS

Existen extractos vegetales con capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática con potencial para el uso y prevención contra la hiperlipidemia y obesidad.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar en extractos de diversas plantas la capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática, así como su efecto hipolipidémico y toxicológico para su uso contra la obesidad.

4.2. Objetivos Específicos

- 1.- Cuantificar la actividad inhibitoria de diversos extractos de plantas sobre la lipasa pancreática.
- 2.- Determinar el efecto del extracto de la planta de mayor actividad antilipasa pancreática sobre las concentraciones de triacilglicéridos y colesterol en el suero de ratas.
- 3.- Evaluar la toxicidad aguda y subaguda del extracto etanólico de la planta que tenga la mayor actividad inhibitoria de la lipasa pancreática.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para la realización del presente trabajo se comenzó por la recolección del material vegetal, así como su preparación (lavado y secado a temperatura ambiente si lo requería) para la elaboración de extractos etanólicos, posteriormente se realizó la prueba de inhibición de la lipasa pancreática *in vitro*. El extracto con mayor capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática fue utilizado para las demás pruebas en animales como la estimación de la asimilación de los triacilglicéridos y colesterol, estimación de la asimilación de los triacilglicéridos con una dieta alta en grasa durante 3 semanas, así como estudios de toxicidad (Figura 1).

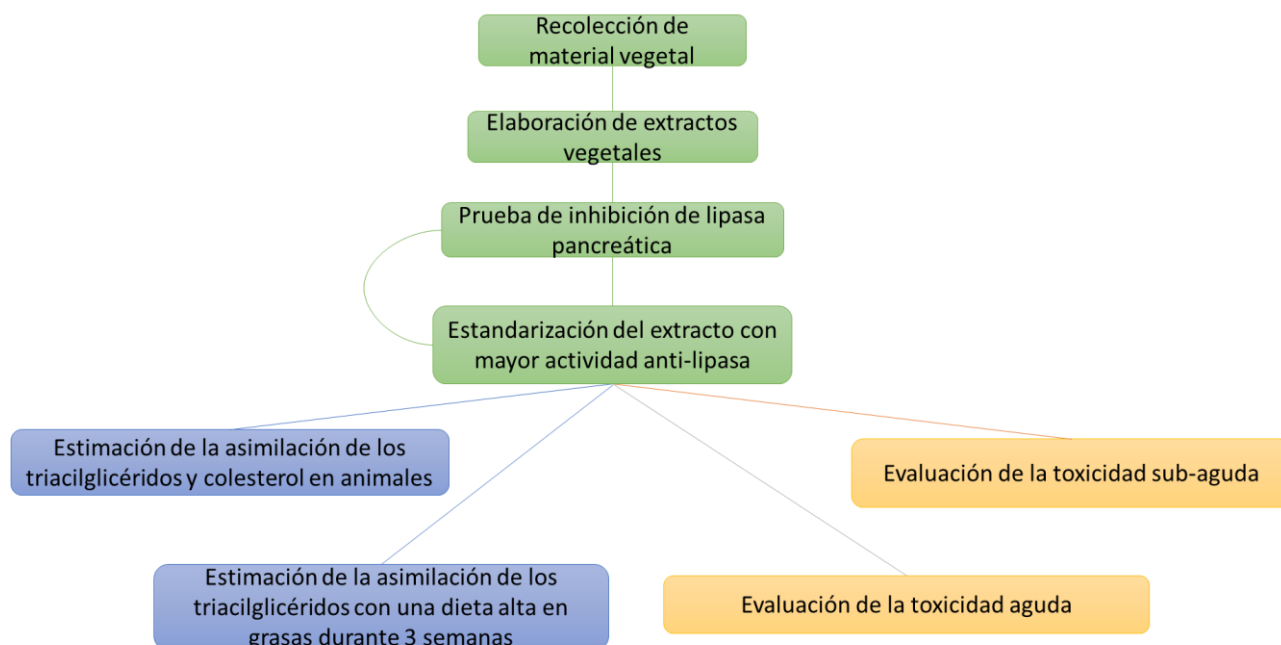


Figura 1. Estrategia experimental utilizada en el presente trabajo.

6. RESULTADOS

6.1. Capítulo 1: Cuantificar la actividad inhibitoria de diversos extractos de plantas sobre la lipasa pancreática

Resumen

El encontrar plantas que presente una actividad para disminuir la digestión de los lípidos provenientes de la dieta es una de las opciones para combatir la obesidad. Por lo anterior, evaluar extractos etanólicos de 37 plantas, algunas de uso comestibles, medicinal o que pertenecen a alguna familia que presenta actividad inhibitoria de la lipasa pancreática es importante. El grado de inhibición de la lipasa pancreática *in vitro* se comparó utilizando orlistat como control. Los resultados obtenidos mostraron que 9 extractos presentaron un porcentaje bajo de inhibición de la actividad lipasa <41%, 9 extractos con porcentaje moderado de inhibición del 41-50 %, 8 extractos en el rango alto de inhibición 51-60 % y 11 extractos con una inhibición muy alta de lipasa ≥ 61 %. Siendo el extracto etanólico de hoja seca de *Hibiscus rosa-sinensis* a una concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$, el que presento mayor actividad inhibitoria de la lipasa pancreática con un 71.90 %, muy similar a la del orlistat (70 %). Al realizar la cinética enzimática de *H. rosa-sinensis* se encontró que tiene una inhibición un-competitiva esto es que el extracto puede inhibir tanto a la enzima como al complejo enzima sustrato, a diferencia del orlistat que presente un tipo de inhibición mixta.

Palabras clave: Lipasa pancreática, *Hibiscus rosa-sinensis*, orlistat, cinética enzimática

Abstract

One of the options to combat obesity is finding plants that have a strong activity to reduce the digestion of lipids from the diets. The main of this study is evaluating 37 ethanolic extracts of plants, some edible, medicinal or belonging to a family that have the inhibitory activity of pancreatic lipase, to found a new anti-obesity agent. The degree of inhibition of pancreatic lipase in vitro was compared using orlistat as a control. Results revealed that 9 plants had a low percentage of inhibition of lipase activity <41%, 9 extracts with a moderate percentage of inhibition of 41-50%, 8 extracts in the high inhibition range 51-60% and 11 extracts with the highest percentage of lipase inhibition $\geq 61\%$.

Ethanolic extract of *Hibiscus rosa-sinensis* of dry leaf, displayed the highest inhibitory activity of pancreatic lipase 71.90 % at 400 $\mu\text{g/mL}$, very similar to orlistat (70%). When performing the enzymatic kinetics of H. rosa-sinensis, it was found that it has un-competitive inhibition, that is, the extract can inhibit both the enzyme and the substrate enzyme complex, unlike orlistat, which presents a mixed type of inhibition (70%).

Keywords: Pancreatic lipase, *Hibiscus rosa sinensis*, orlistat, enzymatic kynetic

Introducción

Uno de los problemas que se presenta en este siglo XXI es la obesidad ya que esta enfermedad no solo es exclusiva de un sexo o raza, sino que se encuentra en todas las personas sin importar la edad. Son diversas las enfermedades relacionadas a la obesidad entre las más importantes están la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión las enfermedades coronarias y complicaciones respiratorias (Jaradt *et al.*, 2017). Para la absorción de los triacilglicéridos de la dieta se necesita la presencia de tres enzimas: lipasa gástrica, lipasa pancreática y colipasa, si estas fueran inhibidas habría una disminución en el incremento de los lípidos en sangre y esto sería una manera de contrarrestar la hiperlipidemia (Sharma *et al.*, 2005). Hasta la fecha, en el mercado solo existe una droga utilizada para inhibir la actividad de la lipasa pancreática el orlistat, sin embargo, debido a los efectos secundarios que genera, no es placentera para ser usada. El control del metabolismo de los lípidos es una manera de controlar la obesidad, los fitoquímicos encontrados en las plantas son una alternativa para sustituir las drogas sintéticas utilizadas contra la obesidad.

Existen varios reportes donde se muestra la búsqueda de productos naturales con actividad inhibitoria de la lipasa pancreática (Ado *et al.*, 2013). En el presente capítulo se hará una selección de plantas de fácil adquisición para examinar si el extracto etanólico de estas, presenta actividad inhibitoria de la lipasa pancreática para poder ser usada para disminuir la asimilación de la grasa y y con ello evitar la obesidad

Materiales y métodos

En la Tabla 2 se presentan el total de las plantas recolectadas y que fueron analizadas en el presente estudio. Cabe destacar que de algunas de las especies no hay reportes de inhibición de la lipasa pancreática, sin embargo, miembros de sus respectivas familias o géneros están reportadas como inhibidores de la lipasa pancreática. Mientras que otras especies se contemplaron para comparar con estudios realizados en esas especies.

Tabla 2. Material vegetal utilizado para la realización de extractos etanólicos.		
Nombre científico	Familia	Órgano utilizado
<i>Amorphophallus konjac</i>	<i>Araceae</i>	Rizoma fresco y seco
<i>Annana comosus</i>	<i>Bromeliaceae</i>	Fruto
<i>Annona muricata</i>	<i>Annonaceae</i>	Hoja
<i>Byrsonima crassifolia</i>	<i>Malpighiaceae</i>	Fruto
<i>Callistemon citrinus</i>	<i>Myrtaceae</i>	Hoja
<i>Capsicum sp.</i>	<i>Solanaceae</i>	Hoja
<i>Carica papaya</i>	<i>Caricaceae</i>	Semilla
<i>Cucumis melo</i>	<i>Curcubitaceae</i>	Semilla
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Curcubitaceae</i>	Cáscara
<i>Fragaria sp.</i>	<i>Rosaceae</i>	Fruto, Sépalos
<i>Heidichium coronarium</i>	<i>Zingiberaceae</i>	Rizoma
<i>Heliopsis longipes</i>	<i>Asteraceae</i>	Raíz
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	<i>Malvaceae</i>	Hoja fresca y seca
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	<i>Malvaceae</i>	Hoja
<i>Lavandula sp.</i>	<i>Lamiaceae</i>	Hoja fresca y seca
<i>Vaccinium corymbosum</i>	<i>Ericaceae</i>	Fruto
<i>Morus sp.</i>	<i>Moraceae</i>	Hoja fresca y seca
<i>Nelumbo nucifera</i>	<i>Nelumbonaceae</i>	Hoja fresca
<i>Opuntia sp.</i>	<i>Cactaceae</i>	Cladodio

<i>Passiflora</i> sp.	<i>Passifloraceae</i>	Hoja fresca
<i>Pistia stratiotes</i>	<i>Araceae</i>	Hoja seca
<i>Rubus</i> sp.	<i>Rosaceae</i>	Fruto
<i>Salvia hispánica</i>	<i>Lamiaceae</i>	Semilla
<i>Solanum melongena</i>	<i>Solanaceae</i>	Hoja
<i>Spinacia oleracea</i>	<i>Amaranthaceae</i>	Fruto
<i>Syzygium jambos</i>	<i>Myrtaceae</i>	Hoja
<i>Tamarindus indica</i>	<i>Fabaceae</i>	Hoja fresca y seca
<i>Tigridia pavonia</i>	<i>Iridaceae</i>	Fruto
<i>Vitis</i> sp.	<i>Vitaceae</i>	Bulbo

Método de extracción

Una vez recolectadas las plantas, se procedió a seleccionar las partes deseadas. Para la preparación de los extractos se trituro el material y se pesaron 3 gramos de cada especie y se colocaron en un matraz con etanol al 98 % [1:10^{W/v}]. Se dejaron macerar a 4°C por 7 días. Después se llevaron a sequedad con ayuda de un rota vapor con bomba de vacío y el residuo se resuspendió en DMSO al 1 % para tener una concentración de 1mg/mL.

Determinación de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática

Los extractos de las plantas obtenidos a una concentración de 1mg/mL se diluyeron en DMSO al 1 % a concentraciones de: 50, 100, 200,300 y 400 µg/mL para realizar una curva de inhibición. A 0.2 mL de las diferentes concentraciones se les añadió 0.1 mL de una solución de lipasa pancreática (1 mg/mL) y 1 mL de buffer Tris-HCl pH 7.4 y se incubaron durante 15 min a 37°C, transcurriendo ese tiempo se añadió 0.1 mL de una solución de p-nitrofenil-butilato, nuevamente se incubaron por espacio de 30 min a 37°C, transcurrido ese tiempo se leyeron las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm para obtener la absorbancia. Se utilizó orlistat como control positivo (Jaradat *et al.*, 2017).

Resultados y discusión

Cuantificación de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática de diversos extractos de plantas.

De los materiales de las plantas analizadas, se obtuvieron 37 extractos vegetales los cuales se sometieron a la prueba de inhibición de la lipasa pancreática *in vitro*, los resultados se agruparon en rangos según su efectividad de inhibición, encontrando que a concentración de 400 µg/mL, 9 extractos tuvieron un porcentaje bajo de inhibición de la actividad lipasa <41 % (Tabla 3), 9 extractos con porcentaje moderado de inhibición del 41-50 % (Tabla 4), 8 extractos en el rango alto de inhibición 51-60 % (Tabla 5) y 11 extractos con una inhibición muy alta de lipasa ≥ 61 % (Tabla 6).

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de los diferentes extractos vegetales con baja inhibición a concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400 µg/mL

Planta	Familia	Órgano	Concentración [µg/mL]	% Inhibición	IC ₃₀ [µg/mL]
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Curcubitaceae</i>	Cáscara	50	10.72 ± 0.91	374.58
			100	18.84 ± 2.89	
			200	22.86 ± 0.16	
			300	25.65 ± 0.40	
			400	31.51 ± 3.20	
<i>Heliopsis longipes</i>	<i>Asteraceae</i>	Raíz	50	27.25 ± 0.22	76.24
			100	32.49 ± 0.12	
			200	36.81 ± 3.24	
			300	37.39 ± 3.07	
			400	32.83 ± 12.30	
<i>Nelumbo nucifera</i>	<i>Nelumbonaceae</i>	Hoja fresca	50	24.26 ± 0.81	91.72
			100	31.14 ± 0.66	
			200	32.86 ± 0.69	
			300	34.58 ± 0.60	
			400	40.93 ± 3.50	
<i>Rubus sp.</i>	<i>Rosaceae</i>	Fruto	50	27.46 ± 0.17	142.48
			100	28.97 ± 0.61	
			200	31.58 ± 2.51	

			300	33.37 ± 2.16	
			400	34.76 ± 1.08	
<i>Salvia hispánica</i>	<i>Lamiaceae</i>	Hoja	50	40.95 ± 0.44	36.63
			100	46.03 ± 2.88	
			200	39.29 ± 2.45	
			300	40.97 ± 3.75	
			400	38.03 ± 2.40	
<i>Solanum melongena</i>	<i>Solanaceae</i>	Fruto	50	34.84 ± 1.48	43.50
			100	37.03 ± 1.47	
			200	36.35 ± 1.84	
			300	38.65 ± 0.95	
			400	38.62 ± 1.09	
<i>Tamarindus indica</i>	<i>Fabaceae</i>	Fruto	50	22.81 ± 0.13	154.91
			100	26.74 ± 1.03	
			200	33.09 ± 0.07	
			300	34.97 ± 1.28	
			400	36.97 ± 1.75	
<i>Vaccinium corymbosum</i>	<i>Ericaceae</i>	Fruto	50	27.05 ± 0.08	167.03
			100	28.13 ± 0.18	
			200	30.92 ± 1.30	
			300	31.48 ± 0.67	
			400	37.57 ± 0.81	
<i>Vitis sp.</i>	<i>Vitaceae</i>	Hoja fresca	50	24.05 ± 0.81	273.95
			100	25.58 ± 0.54	
			200	27.87 ± 0.85	
			300	30.75 ± 1.62	
			400	39.76 ± 0.98	
Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3); concentración inhibitoria al 30 %					

Cabe mencionar que de las especies seleccionadas en este trabajo no se posee cuantiosa información sobre su actividad antilipasa. Sin embargo, Buchholz y Melzig (2015) reportaron que los extractos metanólico y acuoso de frutos de *T. indica* tuvieron una actividad inhibitoria de la lipasa del 98 %, mientras que los extractos metanólico y acuoso de semillas de *V. vinífera* presentaron un 100 % y 58 % de inhibición de la lipasa, es importante señalar que la concentración de estos extractos fue de 2.5 mg/mL, lo que difiere con lo encontrado en este trabajo ya que incluso al

ser la misma especie, la concentración de metabolitos varía de un órgano a otro, además de que la concentración máxima en este trabajo fue de 400 µg/mL.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de los diferentes extractos vegetales con moderada inhibición a concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400 µg/mL						
Planta	Familia	Órgano	Concentración [µg/mL]	%Inhibición	IC₃₀ [µg/mL]	
<i>Amorphophallus konjac</i>	<i>Araceae</i>	Rizoma fresco	50	26.54 ± 2.01	80.46	
			100	32.22 ± 0.22		
			200	36.08 ± 0.94		
			300	39.89 ± 1.05		
			400	43.53 ± 0.92		
<i>Fragaria vesca.</i>	<i>Rosaceae</i>	Sépalo	50	32.24 ± 0.21	46.52	
			100	39.70 ± 1.48		
			200	42.91 ± 0.84		
			300	45.90 ± 0.52		
			400	47.66 ± 0.07		
<i>Heidichium coronarium</i>	<i>Zingiberaceae</i>	Rizoma	50	30.51 ± 0.73	49.16	
			100	31.67 ± 0.94		
			200	32.46 ± 0.64		
			300	35.41 ± 0.59		
			400	47.90 ± 1.28		
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	<i>Malvaceae</i>	Hoja fresca	50	24.63 ± 1.84	85.38	
			100	32.22 ± 3.83		
			200	37.02 ± 3.57		
			300	39.88 ± 2.51		
			400	47.53 ± 0.86		
<i>Lavandula</i>	<i>Lamiaceae</i>	Hoja seca	50	27.05 ± 0.51	158.46	
			100	28.84 ± 0.84		
			200	31.13 ± 0.25		
			300	37.22 ± 0.54		
			400	47.49 ± 1.38		
<i>Opuntia sp.</i>	<i>Cactaceae</i>	Cladodio	50	44.33 ± 2.43	33.83	
			100	46.69 ± 1.48		
			200	46.43 ± 0.33		
				300	46.61 ± 0.42	
				400	46.58 ± 0.69	

<i>Pisttia stratiotes</i>	<i>Araceae</i>	Hoja seca	50	44.02 ± 1.80	34.08
			100	41.33 ± 1.77	
			200	45.41 ± 1.44	
			300	45.56 ± 2.88	
			400	44.15 ± 1.81	
<i>Tigridia pavonia</i>	<i>Iridaceae</i>	Bulbo	50	41.50 ± 0.46	3614
			100	44.49 ± 0.47	
			200	45.29 ± 0.36	
			300	45.89 ± 0.80	
			400	44.83 ± 1.64	
<i>Vitis sp.</i>	<i>Vitaceae</i>	Hoja seca	50	23.17 ± 0.34	83.03
			100	33.51 ± 1.06	
			200	36.63 ± 0.09	
			300	39.80 ± 0.75	
			400	45.48 ± 3.55	
Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3); concentración inhibitoria al 30 %					

En 2010 Zheng *et. al.*, encontraron que el extracto metanólico de *Morus alba* a una concentración de 200 µg/mL posee una inhibición de lipasa pancreática del 16.4 %, en el presente estudio se encontró una inhibición de 50 % para el extracto etanólico en hoja fresca y 41 % en el extracto etanólico de hoja seca de *Morus sp.* Lo anterior sugiere que, los compuestos inhibitorios de este género podrían tener polaridad y ser más afines a dilución en solventes polares.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de los diferentes extractos vegetales con alta inhibición a concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400 µg/mL					
Planta	Familia	Órgano	Concentración [µg/mL]	% Inhibición	IC ₃₀ [µg/mL]
<i>Annona muricata</i>	<i>Annonaceae</i>	Hoja	50	26.02 ± 2.61	97.05
			100	30.25 ± 1.06	
			200	40.30 ± 1.01	
			300	48.04 ± 1.68	
			400	56.61 ± 1.81	
<i>Callistemon citrinus</i>	<i>Myrtaceae</i>	Hoja	50	37.90 ± 0.33	39.58
			100	37.88 ± 0.15	
			200	37.95 ± 0.15	

			300	44.03 ± 1.36	
			400	50.60 ± 0.85	
<i>Cucumis melo</i>	<i>Curcubitaeeae</i>	Semilla	50	42.01 ± 0.01	35.71
			100	50.50 ± 0.71	
			200	53.84 ± 1.19	
			300	55.40 ± 0.56	
			400	57.09 ± 0.13	
<i>Morus sp.</i>	<i>Moraceae</i>	Hoja fresca	50	43.92 ± 0.69	34.15
			100	46.22 ± 0.24	
			200	50.30 ± 0.02	
			300	52.09 ± 0.04	
			400	54.61 ± 0.83	
<i>Morus sp.</i>	<i>Moraceae</i>	Hoja seca	50	31.67 ± 4.17	47.36
			100	37.35 ± 2.81	
			200	40.39 ± 1.03	
			300	46.42 ± 0.68	
			400	50.48 ± 0.38	
<i>Salvia hispánica</i>	<i>Lamiaceae</i>	Semilla	50	37.85 ± 4.02	39.63
			100	39.82 ± 3.87	
			200	45.20 ± 3.09	
			300	50.21 ± 1.10	
			400	52.82 ± 0.19	
<i>Spinacia oleracea</i>	<i>Amaranthaceae</i>	Hoja	50	43.42 ± 2.04	34.55
			100	52.92 ± 1.60	
			200	53.84 ± 1.75	
			300	55.74 ± 2.08	
			400	56.98 ± 2.30	
<i>Syzygium jambos</i>	<i>Myrtaceae</i>	Hoja fresca	50	27.40 ± 1.17	60.73
			100	39.52 ± 2.84	
			200	45.94 ± 1.06	
			300	54.68 ± 0.32	
			400	56.59 ± 0.56	
Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3); concentración inhibitoria al 30 %					

En 2011 Bustanji *et al.* realizaron un barrido de 23 plantas medicinales colectadas en Jordán, las cuales pertenecen a 15 familias, teniendo los extractos metanólicos probaron la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática y encontraron casos como en miembros de la familia *Asteraceae* en la cual no todos los miembros analizados

presentaron actividad inhibitoria de la lipasa pancreática, siendo *Chrysanthemum coronarium* y *Anthemis palestina* inhibidores y otros miembros de la misma familia como *Achillea biebersteinii* y *Calendula arvensis* no presentaron inhibición, además, otros casos como el género *Reseda* del cual se probaron dos especies *Reseda alba* y *Reseda lutea* muestra que la actividad inhibitoria puede variar incluso dentro de un mismo género ya que *Reseda alba* demostró ser capaz de inhibir la lipasa pancreática mientras que *Reseda lutea* no posee dicha actividad. Por último, en 2015 Dechakhamphu y Wongchum cuantificaron la actividad inhibitoria de lipasa pancreática del extracto etanólico de hoja seca de *Syzygium gratum* encontrando un porcentaje de inhibición de 34.93 % a una concentración de 100 µg/mL lo que indica una estimulación en la actividad enzimática de la lipasa, sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación en relación a esta planta fueron distintos ya que en el extracto etanólico de hojas secas de *Syzygium jambos* se obtuvo una acción inhibitoria del 41.5 % a una concentración de 100 µg/mL y una inhibición del 69.3 % a una concentración de 400 µg/mL.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de los diferentes extractos vegetales con muy alta inhibición a concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400µg/mL

Planta	Familia	Órgano	Concentración [µg/mL]	%Inhibición	IC ₃₀ [µg/mL]
<i>Amorphophallus konjac</i>	<i>Araceae</i>	Rizoma seco	50	40.45 ± 1.96	37.08
			100	46.95 ± 1.00	
			200	55.27 ± 1.00	
			300	59.39 ± 1.44	
			400	60.32 ± 1.44	
<i>Annana comosus</i>	<i>Annanaceae</i>	Fruto	50	63.24 ± 0.27	23.72
			100	59.31 ± 5.31	
			200	62.26 ± 2.48	
			300	63.77 ± 1.89	
			400	62.39 ± 2.86	
<i>Byrsonima crassifolia</i>	<i>Malpighiaceae</i>	Fruto	50	44.17 ± 0.25	33.96
			100	49.23 ± 0.32	
			200	49.30 ± 0.42	
			300	52.47 ± 0.66	

			400	62.08 ± 0.11	
<i>Capsicum sp.</i>	<i>Solanaceae</i>	Hoja	50	28.33 ± 0.47	60.77
			100	36.08 ± 0.11	
			200	44.72 ± 0.40	
			300	53.87 ± 1.22	
			400	61.59 ± 0.84	
<i>Carica papaya</i>	<i>Caricaceae</i>	Semilla	50	56.01 ± 0.02	26.78
			100	57.34 ± 0.48	
			200	60.31 ± 1.85	
			300	61.59 ± 0.38	
			400	64.03 ± 0.05	
<i>Fragaria sp.</i>	<i>Rosaceae</i>	Fruto	50	55.12 ± 0.17	27.21
			100	57.03 ± 0.04	
			200	59.11 ± 0.16	
			300	59.50 ± 0.70	
			400	67.61 ± 0.86	
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	<i>Malvaceae</i>	Hoja seca	50	46.15 ± 0.19	32.50
			100	54.23 ± 0.74	
			200	64.98 ± 1.22	
			300	69.84 ± 0.99	
			400	71.90 ± 0.64	
<i>Hibiscus sabdariffa var. rubra</i>	<i>Malvaceae</i>	Hoja	50	55.89 ± 0.33	26.84
			100	62.46 ± 2.15	
			200	65.21 ± 1.35	
			300	63.70 ± 1.53	
			400	63.77 ± 3.70	
<i>Lavandula</i>	<i>Lamiaceae</i>	Hoja fresca	50	53.99 ± 1.73	27.78
			100	54.51 ± 1.25	
			200	56.81 ± 2.07	
			300	59.31 ± 0.17	
			400	62.43 ± 0.11	
<i>Passiflora sp.</i>	<i>Passifloraceae</i>	Hoja fresca	50	45.40 ± 0.59	33.04
			100	50.57 ± 0.14	
			200	55.25 ± 0.17	
			300	60.12 ± 1.04	
			400	67.78 ± 0.41	
<i>Syzygium jambos</i>	<i>Myrtaceae</i>	Hoja seca	50	31.58 ± 0.49	47.50
			100	42.76 ± 0.34	
			200	49.48 ± 2.10	

			300	60.86 ± 0.99	
			400	69.42 ± 0.16	
Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3); concentración inhibitoria al 30 %.					

Finalmente, el extracto etanólico de hoja seca de *Hibiscus rosa-sinensis* a una concentración de 400 µg/mL (Figura 2 y 3) fue el que presento mayor actividad inhibitoria de la lipasa pancreática con un 71.90 %, siendo muy semejante al control orlistat el cual posee un 70 % de inhibición.



Figura 2. Fotografía de flor y hoja de *Hibiscus rosa-sinensis*.

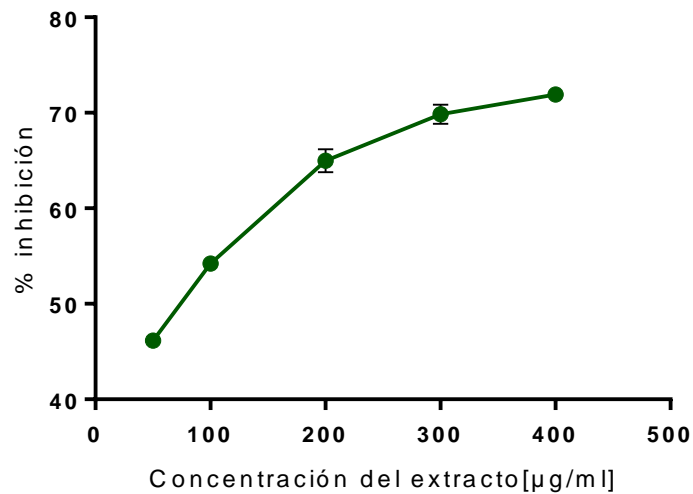


Figura 3. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de hoja seca de *H. rosa-sinensis* en la actividad de la lipasa pancreática porcina.

Los trabajos anteriormente mencionados en conjunto con los obtenidos en este trabajo indican que los metabolitos presentes en las plantas que poseen la capacidad de inhibir la lipasa pancreática no están distribuidos uniformemente en las familias o géneros, teniendo grupos taxonómicos con mayor número de especies inhibitorias de la lipasa pancreática o grupos taxonómicos que varían en esta cualidad.

Es importante mencionar que la investigación realizada sobre *H. rosa-sinensis* en esta tesis (Figura 2) es el primer reporte sobre la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática. Dentro del género *Hibiscus* existe un reporte realizado por Buchholz y Melzig en 2015, donde se muestra que el extracto metanólico y acuoso de flores de *H. sabdariffa* poseen una actividad inhibitoria de la lipasa pancreática del 100 % a una concentración de 2.5 mg/mL, sin embargo, en este trabajo se obtuvo un porcentaje de inhibición del 70 % a una concentración de 400 µg/mL.

Kumar *et. al.*, en 2009 utilizando extracto etanólico de raíz de *H. rosa-sinensis* observó una actividad hipolipidémica, al tratar ratas adultas macho de Charles Foster con una dieta alta en grasas obteniendo niveles bajos de colesterol,

fosfolípidos y triacilglicéridos a diferencia del grupo tratado solamente con la dieta alta en grasas. Este resultado aunado al obtenido en este trabajo apoya la posibilidad de utilizar esta planta como una opción para el tratamiento de la obesidad.

En este trabajo se realizaron además estudios de cinética enzimática del extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* para comparar si el tipo de inhibición es semejante al del orlistat. Los resultados demuestran que el orlistat es un inhibidor mixto esto significa que este inhibidor puede estar actuando tanto en el complejo enzima sustrato, así como uniéndose a la enzima libre (Figura 4).

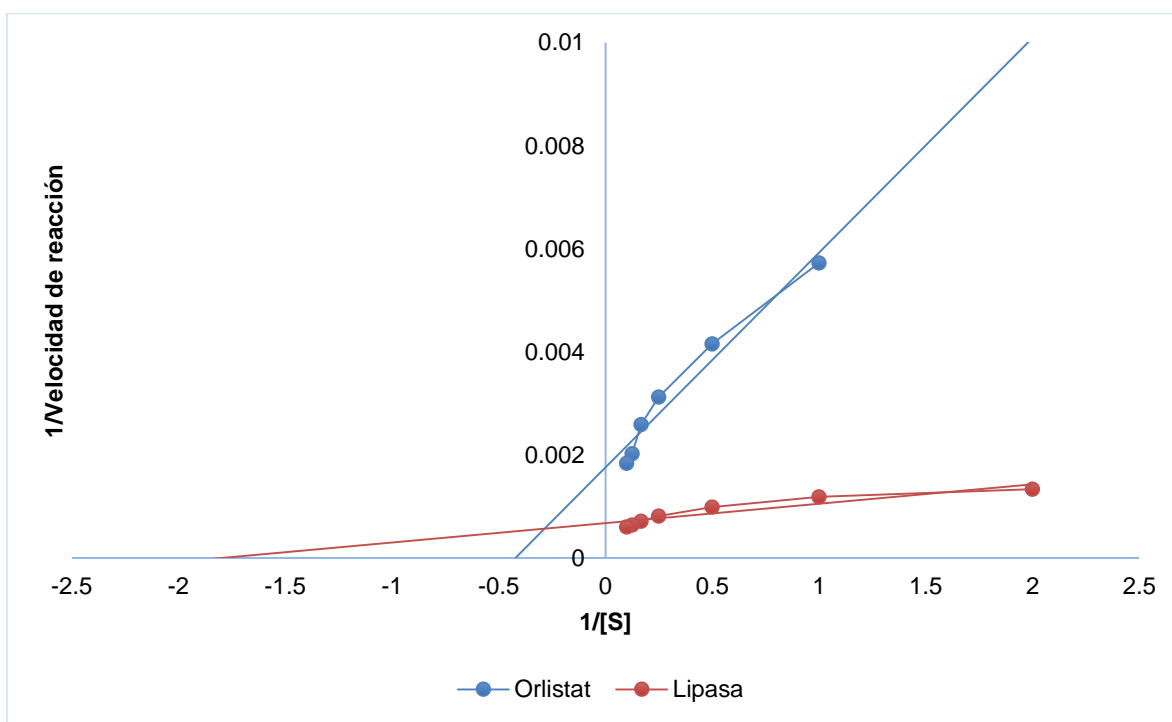


Figura 4. Cinética enzimática del orlistat.

Sin embargo, el extracto de *H. rosa-sinensis* tuvo un comportamiento como un inhibidor uncompetitivo (Figura 5) indicando que él o la mezcla de compuestos que tienen la capacidad de inhibir a la lipasa pancreática se une solamente al complejo enzima sustrato.

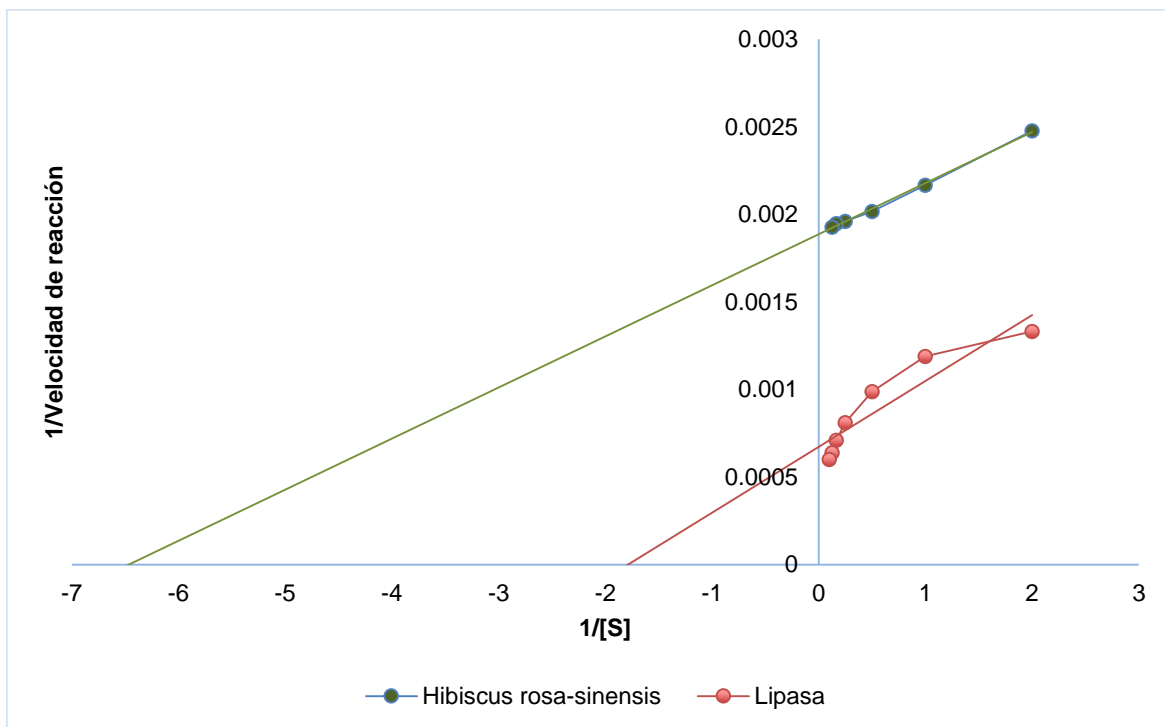


Figura 5. Cinética enzimática del extracto etanólico de hoja seca de *H. rosa-sinensis*.

Conclusión

Se encontró actividad inhibitoria de la lipasa pancreática en los extractos vegetales analizados. El extracto que presento el más alto porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática fue el de hojas secas de *H. rosa-sinensis* (72 % de inhibición a una concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$), siendo similar a la actividad del orlistat (70 % de inhibición de la enzima). Este resultado permitirá continuar con la investigación del extracto para la estimación de la asimilación de los triacilglicéridos y colesterol en animales.

Literatura citada

- Ado, M.A., Abas, F., Mohammed, A.S., Ghazali, M.G. 2013. Anti and pro-lipase activity of selected medicinal, herbal and aquatic plants, and structure elucidation of an anti-lipase compound. *Molecules*, 18 14651-14669.
- Astrup, A., Dyerberg, J., Selleck, M., Stender, S. 2008. Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obesity Reviews*, 9(s1), 48–52.
- Bais, S., Singh, G.S. y Sharma, R. 2014 Antiobesity and Hypolipidemic Activity of *Moringa oleífera* leaves against High Fat Diet-Induced Obesity in Rats. *Hindawi pub. Corp. Advances in biology*. Vol. 2014, Article ID 162914, 9 pages.
- Bash, A.C, Babayan, B K. 1982. Medium-chain triglycerides: An update. *Am. J Clin Nutr*, 36: 950-962.
- Bottino, N R, Vandenburg, G A, Reiser R. 1967. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. *Lipids*; 2: 489-493.
- Bray, G. A. 1999. Etiology and pathogenesis of obesity. *Clinical Cornerstone*, 2(3), 1–15.
- Buchholz, 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. doi:10.1002/ptr.5525
- Bustanji, Y., Mohammad, M., Hudaib, M. 2011. "Screening of some medicinal plants for their pancreatic lipase inhibitory potential," *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 4, no. 2, pp. 81–88
- Castro, I. 2006. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Rev Cubana Plant Med*. 2006; 11 (2).

- Carey M., Hernell, O. 1992. Digestion and absorption of fats. *Semin Gastrointest Dis*; 4: 189-208.
- Clark, J. M., Brancati, F. L. 2000. The challenge of obesity-related chronic diseases. *Journal of General Internal Medicine*, 15(11), 828–829.
- Dechakhamphu, A., Wongchum, N. 2015. Screening for anti-pancreatic lipase properties of 28 traditional Thai medicinal herbs. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(12), 1042–1045.
- Donnet-Hughes, A, Schiffrin, E. J., Turini, M E. 2001. The intestinal mucosa as a target for dietary polyunsaturated fatty acids. *Lipids*; 36: 1043-1052.
- Elangbam, C. S. 2009. Review Paper: Current Strategies in the Development of Anti-obesity Drugs and Their Safety Concerns. *Veterinary Pathology*, 46(1), 10–24.
- Filippatos, T. D., Derdemezis, C. S., Gazi, I. F., Nakou, E. S., Mikhailidis, D. P., Elisaf, M. S. 2008. Orlistat-Associated Adverse Effects and Drug Interactions. *Drug Safety*, 31(1), 53–65.
- Gholamhoseinian, A., Shahouzehi, B., Sharifi-far, F. 2010. Inhibitory Effect of Some Plant Extracts on Pancreatic Lipase. *International Journal of Pharmacology*, 6: 18-24.
- Graham D. Y, Sackman J. W. 1983. Solubility of calcium soaps of long-chain fatty acids in simulated intestinal environment. *Dig Dis Sci*; 28: 733-736.
- Hamosh M. 1978. Rat lingual lipase. Factors affecting enzyme activity and secretion. *Am J Physiol*; 235: E416-E421.
- Hamosh M., Burns W. 1977. Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). *Lab Invest*; 37: 603-606.
- Jaradt, 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 Pharmaceutical Journal*. 21(4), 828-836

- Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Jour. Med. Plant. Res.* Vol. 3(13), pp. 1222-1239.
- Kim, J., Jang, D.S., Kim, H., Kim, J.S. 2009. Anti-lipase and lipolytic activities of ursolic acid isolated from the roots of *Actinidia argute*. *Archives of Pharmacal Research.* 32(7), 983-987.
- Kumar, V, Singh P., Chander R., Mahdi F., Singh S., Singh R., Khanna A.K., Saxena J.K, Mahdi A.A., Singh V.K. 2009. Hypolipidemic activity of *Hibiscus rosa sinensis* root in rats. *Indian J Biochem Biophys.* 46(6):507-10
- Linagariya, N.A., Patel, N.R., Jagtap, C.S., Bhutani K.K. 2014. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *EXCLI journal;* 13:897-921.
- Londoño-Lemos, M.E. 2012. Tratamiento farmacológico contra la obesidad. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.,* Vol. 41 (2), 217-261.
- Mnafgui K., Derbali A., Sayadi S., Gharsallah N., Elfeki A, Allouche N. 2014. Anti-obesity and cardioprotective effects of cinnamic acid in high fat diet-induced obese rats. *J Food Sci Technol.*
- Rodbell, M. 1964. Metabolism of isolated fat cells: I Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *Journal of Biology Chemistry.* 339, 375-380.
- Sharma, N., Sharma, V.K., Seo, S-Y. 2005. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *Journal of Ethnopharmacology.* 97,453-456.
- Shilpa K., K. Varun., B. S. Lakshmi. 2010. An alternative method of natural drug production: Elcting secondary metabolite production using plant cell culture. *J. Plant Sci.,* 5(3): 222- 247.
- Tiss, A., Lengsfeld, H., Carrière, F., Verger, R. 2009. Inhibition of human pancreatic lipase by tetrahydrolipstatin: Further kinetic studies showing its reversibility. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* 58(1-4), 41–47.

- Tiss, A., Ransac, S., Lengufeld, H., Hadvary, P., Cagna, A., Verger, R. 2001. Surface behaviour of bile salts and tetrahydrolipstatin at air/water and oil/water interfaces. *Chemistry and Physics of Lipids* 111. 73–85.
- Toplak, H., Ziegler, O., Keller, U., Hamann, A., Godin, C., Wittert, G., Van Gaal, L. 2005. X-PERT: weight reduction with orlistat in obese subjects receiving a mildly or moderately reduced-energy diet. Early response to treatment predicts weight maintenance. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 7(6), 699–708.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., Nieto, S. 1997. Digestión, absorción y transporte de los ácidos grasos: Una perspectiva diferente en la interpretación de sus efectos nutricionales. *Aceites y Grasas*; IX: 582-588.
- Zheng, C.-D., Duan, Y.-Q., Gao, J.-M., Ruan, Z.-G. 2010. Screening for Anti-lipase Properties of 37 Traditional Chinese Medicinal Herbs. *Journal of the Chinese Medical Association*, 73(6), 319–324.

6.2. Capítulo 2. Estimación de la asimilación de los triacilglicéridos en animales tratados con extracto etanólico de hoja seca de *H. rosa-sinensis*

Resumen

En el presente estudio se realizó la estimación de los triacilglicéridos en plasma de ratas, se hicieron cinco grupos, el primer grupo fue el control negativo y cuatro grupos que se les administro vía oral una emulsión lipídica, a los grupos 2, 3 y 4 se les administró el extracto de hoja seca de *Hibiscus rosa-sinensis* a una concentración de 62.5, 125 y 250 mg/kg respectivamente y el 5 grupo administrado con orlistat (50 mg/kg) como control positivo, posteriormente se midió el contenido de triacilglicéridos en la sangre durante 3 horas. Otro estudio que se realizó fue utilizando una dieta rica en grasas (HFD) durante tres semanas, se formaron 4 grupos: el primero, grupo control alimentado con dieta estándar, los grupos 1, 2, 3 se alimentaron con la HFD, además al grupo 2 se le administró diariamente por vía oral *H. rosa-sinensis* (125mg/kg) y al grupo 6 orlistat (50 mg/kg) el grupo 4 se alimento con dieta estándar , los parámetros que se tomaron fueron los niveles de triacilglicéridos y colesterol en suero, así como el peso final de los individuos. El extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* a una concentración de 125 mg/kg previno la elevación de los niveles de triacilglicéridos después de 2 horas de la administración de la emulsión lipídica, semejante al orlistat. Los resultados de la administración de la HFD durante 3 semanas mostraron que los triacilglicéridos y el colesterol en suero, así como el peso total de los individuos administrados por *H. rosa-sinensis* mantuvo los niveles de triacilglicéridos semejantes al control evitando la hiperlipidemia, además de controlar el aumento de peso, sin tener los efectos secundarios del orlistat. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio de la absorción de los lípidos del extracto del *H. rosa sinensis* sería a través de la inhibición de la actividad de la lipasa pancreática.

Palabras claves: Triacilglicéridos, Hiperlipidemia, Dieta alta en grasas, Orlistat, *Hibiscus rosa-sinensis*.

Abstract

In the aim of this study was evaluate the estimation of triacylglycerides in plasma of rats. Thirty male Wistar rats were divided into five groups: 1 group control, and four groups were administered orally a lipid emulsion, groups 2,3 and 4 were administered the dry leaf extract of *Hibiscus rosa-sinensis* at a concentration of 62.5, 125, and 250 mg/kg respectively and the 5th group with orlistat (50 mg/kg) as a positive control, subsequently the triacylglycerides levels were measumered during 3 hours. The determination of the lipid lowering effects of an ethanolic extrac of leaves of *H. rosa-sinensis*. Three groups of male Wistar rats were fed with a high fat diet for a 3-weeks period: 1 group with high fat diet (HFD) cointaining vegetable fat (37%) only, HFD supplemented with orally daily dose of *H. rosa-sinensis* (125mg/kg), and HFD supplemented with orally daily dose of orlistat group (50mg/kg), 4 group normal diet (pellet chow). Body weight was measured at weekly intervals. At the end of third weeks the triglycerides and cholesterol levels were also estimated.

The *H. rosa-sinensis* dried leaves extract a dose 125 mg /kg, significantly suppressed the elevation of blood triacylglyceride after oral administration of an oil emulsion, similar to orlistat. The results showed that after treatment, the *H. rosa-sinensis* extract inhibited the increase in the body weight, and displayed a significant decreased in triacylglycerides and total colesterol levels in serum, compared with orlistat group but without having the side effects of this drug. These results suggest that the inhibitory effect of *H. rosa-sinensis* extract, over the gain weght, might be to the inhibition of lipid absorption through the inhibition of pancreatic lipase activity.

Keywords: Triacylglycerides, Hyperlipidemia, High fat diet, Orlistat, *Hibiscus rosa-sinensis*.

Introducción

Los lípidos son un componente encontrado en gran proporción en la llamada “Dieta americana”, aproximadamente esta dieta consta de un 35 % de calorías totales dadas por los lípidos, principalmente por los triacilglicéridos, además de que este tipo de dietas provocan hiperlipidemia en el suero, promueven el sobrepeso y la obesidad y a su vez estos padecimientos pueden derivarse a otras enfermedades (Hennink y Maljaars, 2013). Se ha comprobado que productos naturales pueden tener efectos hipolipidémicos, así como en la regulación de la β oxidación cuando existe una dieta alta en grasas u obesidad (Moriyama, 2018).

Hibiscus rosa-sinensis L. (Figura 2) también conocida como tulipán u obelisco es una planta perteneciente a la familia *Malvaceae* originaria de china, es un arbusto de 1 a 4 m de alto con hojas esparcidamente pubescentes o glabras de 5 a 12 cm de longitud, ovadas o lanceoladas aserradas y concoloras. En México esta planta es probablemente una de las más utilizadas como planta ornamental gracias a sus vistosas flores; sin embargo, en este país no se le conoce un uso medicinal (Fryxell, 1992).

En países como la india se ha utilizado como planta medicinal, ya que sus hojas tienen efectos antipiréticos, además sus flores se utilizan para enfermedades cardiacas, presentando también efectos antitumorales (Chatterjee y Pakrashi, 1992; Serrame y Lim-Sylianco, 1995; Sharma, 1994). Además, se ha reportado una actividad hipoglucémica e hipolipidémica en ratas, gracias al extracto de hojas de esta planta (Sachdewa y Khemani, 1999; Sachdewa *et al.*, 2001).

Hibiscus sabdariffa perteneciente a la familia *Malvaceae* ha mostrado ser un buen agente hipolipidémico en suero, reduciendo significativamente los niveles de triacilglicéridos y otros componentes como colesterol, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), en el suero de ratas con una dieta alta en grasas o en ratas hiperlipidémicas, dicho efecto se atribuye a los fenoles presentes en esta planta, por lo cual se han probado diversos órganos de esta, así como diferentes fracciones de estos extractos, teniendo resultados

positivos tal como lo reportan (Yang M. *et al.* 2010; Su *etal.*2018; Farrombi y Ige , 2007; Sandeep G., *et al.* 2010).

En este capítulo se presenta el efecto del extracto etanólico de hoja seca de *H. rosa-sinensis* sobre los triacilglicéridos en sangre en una prueba de tolerancia de triacilglicéridos, así como el efecto del extracto sobre algunos parámetros séricos y morfométricos en una dieta alta en grasas en ratas Wistar.

Materiales y métodos

Animales.

Se utilizarón ratas blancas de la cepa Wistar, todos machos, criados y mantenidos en condiciones estándar: 12 h de luz/12 h oscuridad, humedad relativa 60-70 %, temperatura promedio de 20°C, con libre acceso a comida y agua. En todos los tratamientos se emplearán adultos jóvenes de entre 2 y 3 meses de edad con un peso entre los 200 y los 300 g. Los animales serán mantenidos en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La atención de los animales 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).

Estimación de la asimilación de los triacilglicéridos en animales

Se basa en el procedimiento propuesto por Kim *et al.*, (2009). Se hicieron cinco grupos con ratas Wistar de 6 semanas de edad, con un peso aproximado de 200 a 250 g se dejaron una noche sin alimento, a todos los grupos se les administró vía oral 3 mL de una emulsión lipídica 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 .9 %); al grupo 2 se le administró 50 mg/kg de orlistat; A los grupos 3, 4 y 5 se les administró 250, 125 y 65.2 mg/kg de peso del extracto que mostró la mayor actividad antilipasa respectivamente. Después 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, se obtuvo el plasma para determinar el contenido de triacilglicéridos utilizando pruebas reactivas de triacilglicéridos y el sistema de diagnóstico inmediato de la marca Roche®.

Estimación de la asimilación de los triacilglicéridos en animales con una dieta alta en grasas durante 3 semanas.

Se utilizó una dieta alta en grasas sugerida por García-Berumen *et al.*, (2019), posteriormente modificada por Ortega-Pérez (2020), estructurada para elevar el nivel de triacilglicéridos. La dieta con la que se alimentaron las ratas constó de un 63 % de alimento estándar Rodent diet y 37 % de margarina comercial, las ratas se alimentaron durante tres semanas con esta dieta.

Los animales se dividieron en 4 grupos con una n=6: Grupo control (alimentado con dieta estándar), Grupo DAG (dieta alta en grasa), Grupo DAG administrado con orlistat a una concentración de 50 mg/kg y Grupo DAG administrado con extracto de hoja seca de *Hibiscus rosa-sinensis* a una concentración de 125 mg/kg. Todos los grupos tuvieron acceso al alimento correspondiente y agua *ad libitum*. Cada semana se midió el peso de los animales. El colesterol y los triacilglicéridos se midieron después del sacrificio tomando sangre para posteriormente obtener el plasma y determinar el contenido de colesterol y triacilglicéridos (mg/dL) utilizando kits de la marca Spinreact.

Análisis estadístico

La muestra completa (n=6) se incluyó en los tratamientos y los valores se expresaron como media \pm error estándar (SEM). Los datos se analizaron utilizando JMP® 8.0 mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y para determinar las diferencias estadísticas en los parámetros bioquímicos (colesterol, triacilglicéridos) y peso para la prueba de tolerancia de triacilglicéridos se utilizó la prueba post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples entre el control y los

grupos experimentales. Para los triacilglicéridos en la prueba de tolerancia aguda se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró que los valores eran indicativos de significancia estadística $*P \leq 0.05$. Los gráficos se realizaron en el software GraphPad Prism versión 8.0 y Excel 2016.

Resultados y discusión

La prueba de tolerancia de triacilglicéridos (Figura 6, Tabla 7) muestra que durante la segunda hora después de la ingesta de lípidos hay una mayor cantidad de triacilglicéridos en sangre, así, pudiendo observar una significativa reducción en la concentración de triacilglicéridos en sangre cuando se administra el extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* a una concentración de 125 mg/kg y con el orlistat a una dosis de 50 mg/kg, indicando una reducción en la absorción de grasas en un 62 % y 65 % respectivamente; las dosis de *H. rosa-sinensis* a una concentración de 250 y 65.2 mg/kg no mostraron diferencias significativas en el grupo DGA tratado solo con la mezcla, reduciendo su nivel en un 9.7 % con la dosis más alta, esto se puede deber a la cantidad de ácidos grasos presentes en el extracto, tal como lo demostró Rios-Chavez *et al.*, (2019) donde encontraron que el extracto de hoja de *H. rosa-sinensis* contiene un 21.72 % de ácidos grasos.

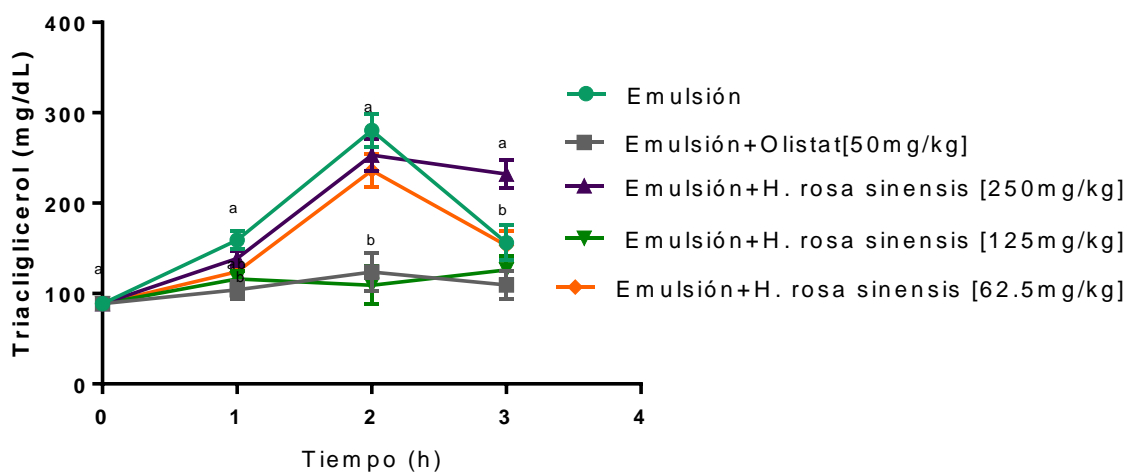


Figura 6.- Curva de tolerancia de triacilglicéridos en 4 diferentes tiempos en ratas tratadas con una mezcla de lípidos y 3 inhibidores de lipasa pancreática.

Tabla 7. Efecto en la concentración de triacilglicéridos (mg/dL) en suero de 4 grupos de ratas durante 3 horas

Tratamiento /Tiempo	T0	T1	T2	T3
Aceite	88.85 ± 5.87 a	159.33 ± 9.73 a	280.5 ± 18.26 a	156.50 ± 9.35 b
Orlistat	88.85 ± 5.87 a	104.00 ± 9.73b	123.67 ± 21.08 b	109.66 ± 15.79 b
<i>H. rosa-sinensis</i> [250mg/kg]	88.85 ± 5.87 a	138.75 ± 8.42 a	253 ± 18.26 a	232.33 ± 15.79 a
<i>H. rosa-sinensis</i> [125 mg/kg]	88.85 ± 5.87 a	116 ± 8.42 b	109 ± 21.08 b	126.00 ± 15.79 b
<i>H. rosa-sinensis</i> [62.5 mg/kg]	88.85 ± 5.87 a	124.00 ± 25.00ab	236.00 ± 18.26a	153.00 ± 15.79.00a

La diferencia estadística entre los tratamientos se determinó usando la prueba ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Valores estadísticamente diferentes (a, b, c) entre grupos ($P \leq 0.05$), n=6.

Con relación al peso y los niveles de triacilglicéridos en el suero, a pesar de tener solamente tres semanas de estar bajo una dieta con un suplemento de 37 % de margarina, se presentó un aumento significativo en el peso y en los triacilglicéridos del 20 % y 195 % respectivamente en el grupo tratado con una dieta alta en grasas en comparación con el grupo con dieta estándar (Tabla 8, Figura 7), resultado similar al reportado por Anai *et al.*, (1999), donde muestran que bajo una dieta con un 58 % de manteca durante 6 semanas, hubo un incremento significativo en los niveles de triacilglicéridos en el suero. Y al reportado por Kumar y Gaur (2017) donde administraron una dieta rica en grasa animal durante 6 semanas y las ratas Wistar tuvieron un incremento del peso, así como los valores del perfil lipídico. Con relación al grupo con una dieta alta en grasas más el orlistat y el grupo con una dieta alta en grasa y el extracto de hojas secas de *H. rosa-sinensis*, presentaron un peso y niveles de triacilglicéridos muy similares al grupo con dieta estándar. Estos datos muestran que *H. rosa-sinensis* tiene un efecto similar al orlistat en cuanto la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática previniendo la obesidad y la

hiperlipidemia; sin embargo, no incrementó la excreción de grasas en las heces como lo hace el orlistat (Kim *et al.*, 2009).

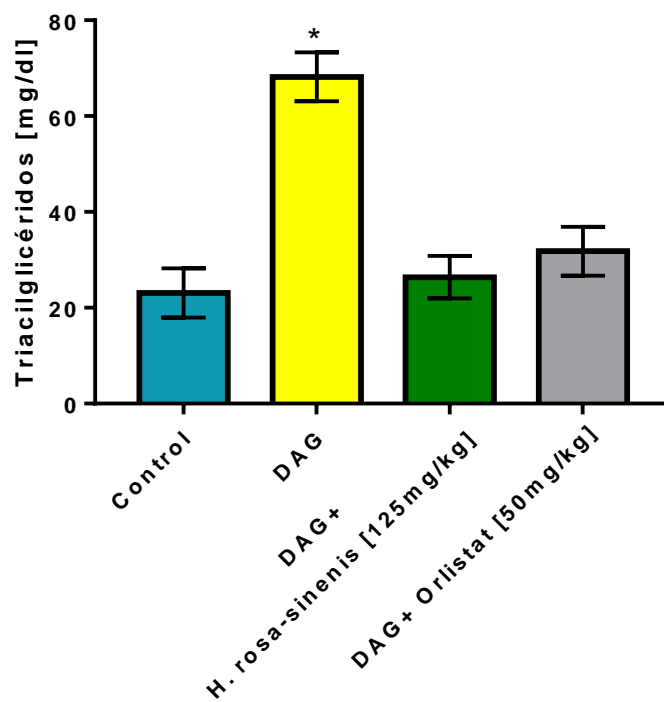


Figura 7.- Concentración de triacilglicéridos en sueros de ratas tratadas durante tres semanas con una dieta alta en grasa y dos inhibidores de lipasa pancreática (extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* y orlistat). La diferencia estadística entre los tratamientos se determinó usando la prueba ANOVA seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnet. “*” implica diferencias significativas. Cada valor representa la media \pm SEM ($P \leq 0.05$), $n=6$.

Tabla 8. Efecto en el peso (g) en 4 grupos de ratas durante tres semanas con una dieta alta en grasas (DAG) y dos inhibidores de la lipasa pancreática (extracto de hoja seca de *H.rosa-sinensis* y orlistat)

Tratamiento /Peso (gr)	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Control	213.00 ± 14.67	247.66 ± 14.47	251.00 ± 11.96
Control DAG	217.00 ± 10.38	275.33 ± 10.23	303.16 ± 8.46*
<i>H. rosa-sinensis</i> [125mg/kg]	212.85 ± 9.61	269.14 ± 9.47	280.00 ± 12.13
Orlistat [50mg/kg]	201.80 ± 11.37	255.80 ± 11.21	276.00 ± 9.26

La diferencia estadística entre los tratamientos se determinó usando la prueba ANOVA seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnet. “*” implica diferencias significativas. Cada valor representa la media ± SEM (P≤0.05), n=6.

Por otro lado, no hubo cambios significativos en la concentración de colesterol (mg/dL) en el suero de los animales con una dieta alta en grasas durante tres semanas (Figura 8), este resultado es similar al reportado por Woo *et al.*, (2008) en el cual administraron a ratas Sprague-Dawley 10 % de sebo y 5 % de aceite de maíz durante 6 semanas. Cabe mencionar que la mayoría de los trabajos donde administran una dieta rica en grasas usan el sebo que es un producto de origen animal, por lo cual se incrementa el nivel de colesterol en los animales tratados bajo dicha dieta, en la presente investigación se utilizó grasa de origen vegetal.

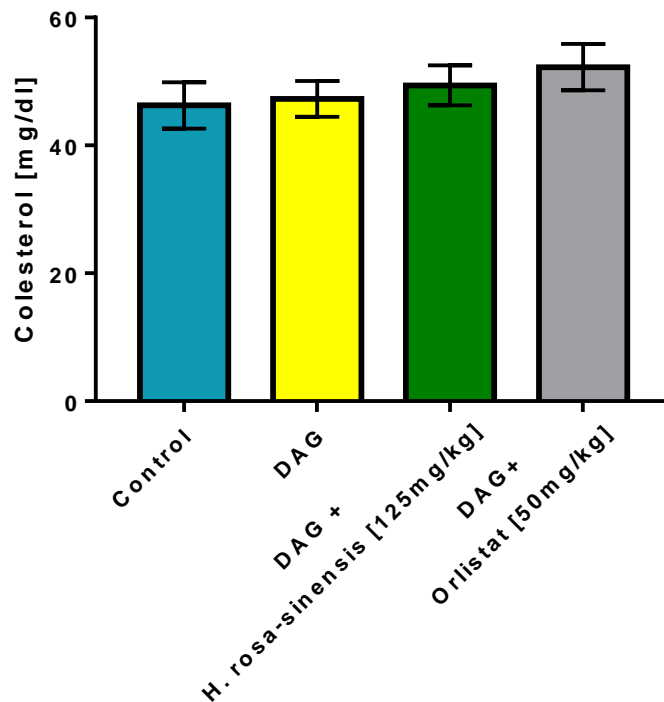


Figura 8.- Concentración de colesterol en sueros de ratas tratadas durante tres semanas con una dieta alta en grasa y dos inhibidores de lipasa pancreática (extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* y orlistat). La diferencia estadística entre los tratamientos se determinó usando la prueba ANOVA seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnet. “*” implica diferencias significativas. Cada valor representa la media \pm SEM ($P \leq 0.05$), $n=6$.

Marques C., *et al.* 2015 realizaron una comparación en parámetros como los triacilglicéridos y colesterol en ratas Wistar con dieta estándar y dieta alta en grasas durante 17 semanas, en donde encontraron una concentración de colesterol total promedio en suero de 103 mg/dL en dieta estándar y 105 mg/dL con dieta alta en grasa, valores que disciernen de los encontrados en este trabajo (50-60 mg/dL) , de igual manera los triacilglicéridos muestran un nivel elevado en comparación con los presentados, esto puede deberse al tipo y tiempo de la dieta efectuada.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran relación con el trabajo de Caridad-León *et al.* (2011), donde obtienen valores de colesterol de 49.7 mg/dL y de triacilglicéridos de 24.5 mg/dL.

Kamal *et al.* (2014) probando el orlistat y una mezcla de hierbas (cáscara de *Arachis hypogaea*, de *Curcubita moschata* y de *Morus alba*) con una dieta alta en grasas durante 16 semanas, muestran un 25 % de reducción de triacilglicéridos en sangre con ambos tratamientos con respecto al grupo con dieta alta en grasas, además presentó una reducción significativa en el peso en ambos tratamientos, manteniendo su peso similar al grupo con dieta estándar. En este trabajo se encontró que la concentración de triacilglicéridos en el grupo tratado con el extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* con respecto al control es aún menor (62 %). De los pocos estudios con *H. rosa-sinensi* está el de Kumar *et al.*, (2009), donde reportan que el extracto de raíz de *H. rosa-sinensis*, presenta una actividad hipolipidémica en ratas tratadas con una dieta rica en colesterol y grasas. Sin embargo, en dicho estudio la concentración del extracto de la raíz fue de 500 mg/kg, mientras que en este trabajo se utilizó una concentración de 125 mg/kg, lo cual indica una mayor actividad hipolipidémica en el extracto objeto de este trabajo de investigación.

Conclusión

H. rosa-sinensis posee una alta capacidad hipotrigliciridémica, muy similar a la actividad del orlistat, viéndose reflejado en ratas con una dieta alta en grasa, así como durante una prueba de tolerancia a triacilglicéridos, efecto dado gracias a la capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática.

Literatura citada

- Anai, M., Funaki, M., Ogihara, T., Kanda, A., Onishi, Y. 1999. Enhanced insulin-stimulated activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the liver of high fat fed rats. *Diabetes*, 48,158-169.
- Astrup, A., Dyerberg, J., Selleck, M., Stender, S. 2008. Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obesity Reviews*, 9(s1), 48–52.
- Bais, S., Singh, G.S., Sharma R. 2014. Antiobesity and Hypolipidemic Activity of *Moringa oleífera* leaves against High Fat Diet-Induced Obesity in Rats. *Hindawi pub. Corp. Advances in biology*. Vol. 2014, Article ID 162914, 9 pages.
- Bash, A.C, Babayan, B. K. 1982. Medium-chain triglycerides: An update. *Am. J Clin Nutr*; 36: 950-962.
- Bottino, N.R., Vandenburg, G.A., Reiser., R. 1967. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. *Lipids*; 2: 489-493.
- Bray, G.A. 1999. Etiology and pathogenesis of obesity. *Clinical Cornerstone*, 2(3), 1–15.
- Carey M. y Hernell, O. 1992. Digestion and absorption of fats. *Semin Gastrointest Dis*; 4: 189-208.
- Castro, I. 2006. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Rev Cubana Plant Med*. 2006; 11 (2).
- Caridad-León, G.A., Blanco, D., Peña, A., Ronda, M., González, B.O., Arteaga M. E., Bada A. M., González Y., Mancebo A. 2011. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cemp:

SPRD. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 12(11),1-10. ISSN:.
Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63622049001>

Chatterjee, A., Pakrashi, S.C., 1992. The Treatise of Indian Medicinal Plants 2, 180.

Clark, J. M., Brancati, F. L. 2000. The challenge of obesity-related chronic diseases. *Journal of General Internal Medicine*, 15(11), 828–829.

Donnet-Hughes A, Schiffrin E. J., Turini M E. 2001. The intestinal mucosa as a target for dietary polyunsaturated fatty acids. *Lipids*; 36: 1043-1052.

Elangbam, C. S. 2009. Review Paper: Current Strategies in the Development of Anti-obesity Drugs and Their Safety Concerns. *Veterinary Pathology*, 46(1), 10–24.

Farombi, E. O., Ige, O. O. 2007. Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats. *Fundamental y Clinical Pharmacology*, 21(6), 601–609.

Filippatos, T. D., Derdemezis, C. S., Gazi, I. F., Nakou, E. S., Mikhailidis, D. P., Elisaf, M. S. 2008. Orlistat-Associated Adverse Effects and Drug Interactions. *Drug Safety*, 31(1), 53–65.

Fryxell, P.A. 1992. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México. Fascículo 68.

García-Berumen, C. I., Ortiz-Avila, O., Vargas-Vargas, M. A., del Rosario-Tamayo, B. A., Guajardo-López, C., Saavedra-Molina, A., Cortés-Rojo, C. 2019. The severity of rat liver injury by fructose and high fat depends on the degree of respiratory dysfunction and oxidative stress induced in mitochondria. *Lipids in Health and Disease*. 18(1): 78.

Gholamhoseinian, A., Shahouzehi, B., Sharifi-far, F. 2010. Inhibitory Effect of Some Plant Extracts on Pancreatic Lipase. *International Journal of Pharmacology*, 6: 18-24.

- Graham D. Y, Sackman J. W. 1983. Solubility of calcium soaps of long-chain fatty acids in simulated intestinal environment. *Dig Dis Sci*; 28: 733-736.
- Hamosh, M. 1978. Rat lingual lipase. Factors affecting enzyme activity and secretion. *Am J Physiol*; 235: E416-E421.
- Hamosh, M., Burns W. 1977. Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). *Lab Invest*; 37: 603-606.
- Hennink, S. D., Jeroen Maljaars, P. W. 2013. Fats and satiety. Satiating, Satiety and the Control of Food Intake, 143–165.
- Jaradt, 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 Pharmaceutical Journal*. 21(4), 828-836.
- Kamal A.A., Sana'a R. Galaly, Wala'a G. H., Shima'a M. R., 2014. Effects of Orlistat and Herbal Mixture Extract on Renal Function and Oxidative Stress Biomarkers in a Rat Model of High Fat Diet. *Int Jour of Bio Res & Rev*, 4(2): 173-192.
- Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Jour. Med. Plant. Res.* Vol. 3(13), pp. 1222-1239.
- Kim, J., Jang, D.S., Kim, H., Kim, J.S. 2009. Anti-lipase and lipolytic activities of ursolic acid isolated from the roots of *Actinidia argute*. *Archives of Pharmacal Research*. 32(7), 983-987.
- Kumar, V., Gaur, P. 2017. Antiobesity activity of liraglutide on high fat diet-induced obesity in Wistar rats. *Current Research in Diabetes & Obesity Journal*. 3(1), ID.555602.
- Kumar, V., Singh, P., Chander, R., 2009. Hypolipidemic activity of *Hibiscus rosa sinensis* root in rats. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 46, 507-510.

- Linagariya, N.A., Patel, N.R., Jagtap, C.S., Bhutani K.K. 2014. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *EXCLI Journal*. 13:897-921.
- Londoño-Lemos, M.E. 2012. Tratamiento farmacológico contra la obesidad. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, Vol. 41 (2), 217-261.
- Marqués, C., Meireles, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., Calhau, C. 2015. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*, 5(1), 11–21.
- Mnafgui K., Derbali A., Sayadi S., Gharsallah N., Elfeki A, Allouche N. 2014. Anti-obesity and cardioprotective effects of cinnamic acid in high fat diet-induced obese rats. *J Food Sci Technol*.
- Ortega-Pérez L.G. 2020. Efecto del extracto de *Callistemon citrinus* sobre el estrés oxidativo en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica. Tesis de Maestría, PIMCB. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Ríos-Chávez P, Perez-Gonzalez J, Salgado-Garciglia R, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Martinez-Trujillo M, Carreon-Abud Y. 2019. Antibacterial and cytotoxicity activities and phytochemical analysis of three ornamental plants grown in Mexico. *An Acad Bras Cienc* 91(2), 1-13 e20180468.
- Rodbell, M. 1964. Metabolism of isolated fat cells: I Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *Journal of Biology Chemistry*. 339, 375-380.
- 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.
- Sachdewa, A., Raina, D., Srivastava, A.K., Khemani, L.D. 2001. Effect of Aegle marmelos and *Hibiscus rosa sinensis* leaf extract on glucose tolerance in glucose induced hyperglycemic rats (Charles foster). *Journal of Environmental Biology* 22, 53–57.

- Sandeep, G., Raghuvver, I., Prabodh, C.S., Suresh, T., Atin, K., Tilak, R.B. 2010. Hypolipidemic effect of ethanolic extract from the leaves of *Hibiscus sabdariffa* L. in hyperlipidemic rats. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, Vol. 67 No. 2 pp. 179-184.
- Serrame, E., Lim-Sylianco, C.Y. 1995. Anti-tumour promoting activity of decoctions and expressed juices from Philippine medicinal plants. *Philippine Journal of Science* 124, 275–281.
- Sharma, N., Sharma, V.K., Seo, S-Y. 2005. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 97,453-456.
- Sharma, U.D., 1994. Cure of heart diseases with ayurvedic drugs. *Sachitra Ayurved* 47, 95–96.
- Shilpa K., K. Varun., B. S. Lakshmi. 2010. An alternative method of natural drug production: Elcting secondary metabolite production using plant cell culture. *J. Plant Sci.*, 5(3): 222- 247.
- Su, N., Li, J., Yang, L., Hou, G.,Ye, M. 2018. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fermented milks with added roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Journal of Functional Foods*, 43, 234–241.
- Tiss, A., Lengsfeld, H., Carrière, F., Verger, R. 2009. Inhibition of human pancreatic lipase by tetrahydrolipstatin: Further kinetic studies showing its reversibility. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4), 41–47.
- Tiss, A., Ransac, S., Lengufeld, H., Hadvary, P., Cagna, A., Verger, R. 2001. Surface behaviour of bile salts and tetrahydrolipstatin at air/water and oil/water interfaces. *Chemistry and Physics of Lipids* 111 .73–85.
- Toplak, H., Ziegler, O., Keller, U., Hamann, A., Godin, C., Wittert, G., Van Gaal, L. 2005. X-PERT: weight reduction with orlistat in obese subjects receiving a mildly or moderately reduced-energy diet. Early response to treatment predicts weight maintenance. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 7(6), 699–708.

- Valenzuela, A., Sanhueza, J, Nieto, S. 1997. Digestión, absorción y transporte de los ácidos grasos: Una perspectiva diferente en la interpretación de sus efectos nutricionales. *Aceites y Grasas*; IX: 582-588.
- Woo, M.N, Bok, S.H., Lee, M.K. 2008. Anti-obesity and hypolipidemic effects of a proprietary herb and fiber combination (S&S PWH) in rats fed high-fat diets. *Journal of Medicinal Food*. 11(1),169-178.
- Yang, M.-Y., Peng, C.-H., Chan, K.-C., Yang, Y.-S., Huang, C.-N., Wang, C.J. 2010. The Hypolipidemic Effect of *Hibiscus sabdariffa* Polyphenols via Inhibiting Lipogenesis and Promoting Hepatic Lipid Clearance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 850–859.

6.3 Capítulo 3. Toxicidad aguda y subaguda del extracto etanólico de *Hibiscus rosa-sinensis*

Resumen

Para poder usar un extracto de plantas con fines medicinales es importante conocer si presenta toxicidad o no. En el presente trabajo se muestran los ensayos toxicológicos vía oral del extracto etanólico de hoja seca de *Hibiscus rosa-sinensis*. La prueba toxicológica aguda mostró que, a concentraciones de 100, 316 y 1000 mg/kg de peso no hay toxicidad en ratas Wistar, por lo que la IC₅₀ es mayor a 1000 mg/kg, además en la prueba de toxicidad subaguda, administrando diariamente una concentración alta (1000 mg/kg) durante 28 días no se observaron cambios en el comportamiento, además se tuvo un 0 % de muertes, para determinar lesiones hepáticas y renales se midieron biomarcadores como GSH, PON 1, MDA, HNE y proteínas totales, las cuales no presentaron cambios significativos con respecto al control, demostrando así que *H. rosa-sinensis* es seguro a dosis menores o iguales a 1000 mg/kg.

Palabras claves: *H. rosa-sinensis*, Toxicidad, GSH, PON1, MDA, HNE.

Abstract

In an attempt to know the safety of the use of *H. rosa-sinense*, we carried out an acute and sub acute toxicity study. The acute toxicological test was conducted in Wistar rats. The extract of *H. rosa-sinensis* was administered in a single dose of 100, 316 and 1000 mg/kg and observed for behavioral changes and mortality. In sub acute toxicological test, Wistar rats were administered the *H. rosea-sinensis* at dose of 1000 mg/kg via oral daily for 28 days. Rats were observed if there are any changes in their body weight, food and water intake during this period. In acute toxicity, neither mortality nor any change in the behavior in rats were observed. The IC_{50} is greater than 1000 mg/kg. In sub acute study, no changes in behavior were observed, in addition there were 0% deaths, no alterations had been observed in the liver and kidney. Biomarkers such as GSH, PON 1, MDA, HNE and total proteins did not showed significant changes with compared to control group. Our results suggest that *H. rosa-sinensis* is relatively safe at doses less than or equal to 1000 mg/ kg when administrated orally in rats.

Keywords: *H. rosa-sinensis*, Toxicity, GSH, PON1, MDA, HNE.

Introducción

Aunque ninguna sustancia puede certificarse como completamente "segura" (libre de riesgo), el objetivo primordial de la toxicología es estimar el riesgo relacionado con la exposición al fármaco elegible y considerarlo en el contexto de las necesidades terapéuticas y la duración probable del uso del o los compuestos (Katzung, 2009).

Sin embargo, no solo los fármacos pueden causar daños hepáticos o renales sino también otras sustancias que se metabolizan en él, como lo son ciertos compuestos naturales derivados de plantas (Matkowski *et al.*, 2008).

Se conoce muy poco de la seguridad de *Hibiscus rosa-sinensis* para ser usada como planta medicinal, es por lo anterior que estudiar el posible efecto tóxico del extracto de esta planta es importante. Por lo que el objetivo de este trabajo es la caracterización de la toxicidad aguda y sub-aguda del extracto etanólico de las hojas secas de *H. rosa-sinensis*

Materiales y métodos

Ensayo de toxicidad aguda

El ensayo de toxicidad aguda se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento estándar Clasificación Tóxica Aguda o Método de las Clases de Toxicidad (Toxic Class Method, TCM), establecido por la OCDE (2001), pero modificado en cuanto al número de animales y lotes experimentales. Se utilizaron 3 concentraciones del extracto que tuvo la mayor actividad inhibitoria de la lipasa pancreática (extracto de *Hibiscus rosa-sinensis*) los animales fueron administrados con cánula intra-gástrica una sola vez y permanecieron en condiciones estándar controladas y con acceso libre a agua y comida. Se observaron constantemente durante las primeras 4 horas y después a las 24, 48 y 72 horas y se dejaron durante 15 días, para registrar signos de toxicidad visibles tales como la muerte, cambios de comportamiento, disminución de la capacidad motriz, letargo, respuesta al sonido, fuerza de agarre, diarrea, vomito y reflejos.

Ensayo de toxicidad subaguda

Se utilizaron 12 ratas Wistar macho que se distribuyeron al azar en dos grupos, uno el control y el otro fue tratado con una dosis no letal del extracto (identificada previamente en el estudio de toxicidad aguda), igualmente administrada con cánula intra-gástrica durante 28 días y permanecieron en condiciones estándar de humedad, luz y temperatura, con libre acceso a agua y alimento. Se sacrificó a los animales por sobredosis de barbitúricos para realizar la extracción de órganos (hígado y riñones) para los posteriores estudios bioquímicos del laboratorio tales como el glutatión reducido, paraoxanasa 1, productos de la lipoperoxidación (malondialdehído y 4-hidroxinonenal) y proteínas totales.

Proteínas totales

Las proteínas totales fueron determinadas usando el método de Bradford (1976) adaptado para cuantificar concentraciones bajas mediante un micrométodo disponible comercialmente (marca Sigma). Se usó 1 μ l de homogenado de hígado y riñón, después se le adicionó 799 μ l de agua destilada, se mezcló y posteriormente se le agregó 1 mL de reactivo de Bradford, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm. Para el blanco solo se agregó 800 μ l de agua destilada y el Bradford.

Glutatión reducido

Mediante la técnica de Sedlak y Lindsay (1968) se determinó el contenido de glutatión reducido (GSH) en hígado y corazón de la siguiente forma: en eppendorf se agregaron 62.5 μ l de homogenado del tejido, 187.5 μ l de Tris buffer (0.2 M, pH 8.2) y 12.5 μ l de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DNTB) (0.01 M), se mezcló y posteriormente se adicionaron 987.5 μ l de metanol absoluto, luego se colocaron en un agitador a 240 rpm durante 15 minutos, después las muestras se centrifugaron a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, se desarrolló el

color amarillo de la reacción y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 412 nm. Las unidades fueron expresadas como mM GSH/g de tejido.

Determinación de actividad arilesterasa (Paraoxanasa 1)

Para la determinación de la arilesterasa se utilizó la técnica colorimétrica para determinación de PON (paraoxanasa) siguiendo el protocolo de Dantoine (1998), iniciando con la dilución 1/20 del mismo homogenado, por otro lado, se preparó un coctel que por mililitro contuvo: 25 μ l de metanol, 100 μ L CaCl_2 [10 mM], 562.5 μ l de buffer Tris HCl [25 mM] pH 8 y 312.5 μ l de 4-nitrofenilacetato [1M] disuelto en metanol. Se colocaron 125 μ l de la dilución 1/20 del homogenado en una celda de vidrio y se le agregó 1 mL del coctel previamente preparado, se agitó la celda y se leyó en espectrofotómetro a 402 nm cada 30 segundos por 3 min contra un blanco solo del coctel.

Determinación de MDA/HNE

Para la determinación de malondialdehídos (MDA) y el 4-hidroxi-alquenos (HNE) se utilizó la técnica colorimétrica de evaluación del 1-metil-2-fenilindol siguiendo el protocolo de Johnston *et al.* (2007) Para la cual se inicia tomando 0.5 gr de tejido al cual se le agregaron 10 μ L de BHT [5 mM] y 2 mL de buffer de fosfatos con un pH de 7.4 [10 mM] para machacarse en frío en mortero con pistilo, el machacado se recuperó para ser centrifugado por 13 min a 13,000 rfc (g_s) y se recuperó el sobrenadante.

Se tomaron 200 μ l de muestra de la técnica anterior, se colocaron en un tubo eppendorf se le agregaron 650 μ l de 1-metil-2-fenilindol [10 mM] disuelto en una mezcla de acetonitrilo/metanol 3:1 (se hizo por duplicado cada muestra), a una de las muestras se le agregaron 150 μ l de HCL al 37% (V/V) y al otro se le agregaron 150 μ l de ácido metanesulfónico, se agitaron bien y se llevaron a incubación por 60 min a 45°C, pasado el tiempo de incubación se colocan en hielo por 5 minutos y se llevaron a centrifugar por 10 min a 13,000 rfc (g_s) posteriormente se recuperó el

sobrenadante en celdas de vidrio para leer a 586 nm, como blanco se sustituyó la solución de 1-metil-2-fenilindol por solo la mezcla de acetonitrilo/metanol 3:1 (un blanco para cada acido).

Análisis estadístico

Los valores se expresan como media \pm el error estándar de la media. Para las determinaciones enzimáticas las diferencias estadísticas se determinaron con análisis de varianza (ANOVA) de una vía de JMP versión 8.0 seguido de la prueba post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples con el grupo de control, se consideró un nivel de significancia de $*P \leq 0.05$. Los gráficos se realizaron en el software GraphPad Prism versión 8.0.

Resultados y discusión

Los individuos control, así como los tratados con las diferentes dosis de extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* no mostraron signos evidentes de toxicidad general ni cambios en la conducta o comportamiento. En este caso ningún individuo de los cuatro tratamientos (el control y las 3 dosis del extracto de la hoja) tuvo reacciones adversas al extracto, teniendo actividad motriz normal, no presentaron sangrado y no hubo ninguna muerte (Tablas 9 y 10). Por lo anterior se establece que la Dosis Letal 50 para el extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* es superior a la dosis máxima utilizada ($DL_{50} > 1000$ mg/kg).

De los pocos estudios de toxicidad aguda de *H. rosa-sinensis* son el de Nath *et al.* (2015) donde se reporta que el extracto metanólico de hoja seca de *H. rosa-sinensis* no presentó signos de toxicidad alguna incluso a dosis de 2000 mg/kg estableciendo una $DL_{50} > 2000$ mg/kg. Por otro lado, existe en un estudio del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de hoja seca de *H. rosa-sinensis*, donde se observó que a dosis de 500 mg/kg no hay efectos adversos hepátotoxicos (Raduan *et al.* 2013). Por último esta un estudio de toxicidad aguda del extracto metanólico de flor seca de *H. rosa-sinensis* a concentraciones de 100, 200, 400, 800 y 1600 mg/kg de peso,

encontrando que ningún roedor presento cambios conductuales ni físicos, a excepción de la dosis de 1600 mg/kg de peso en donde se encontró una mortalidad del 20 % (Meena *et al.*, 2018).

Tabla 9. Estudio de toxicidad aguda de extractos etanólicos de hojas secas de *Hibiscus rosa-sinensis* en ratas Wistar

Observación	Respuesta			
	Control	H. r-s 100 mg / kg	H. r-s 316 mg / kg	H. r-s 1000 mg / kg
Conciencia	+	+	+	+
Respuesta táctil	+	+	+	+
Duración del sueño	+	+	+	+
Movimiento	+	+	+	+
Fuerza de agarre	+	+	+	+
Reflejo de enderezamiento	+	+	+	+
La ingesta de alimentos	+	+	+	+
Consumo de agua	+	+	+	+
Temblores	-	-	-	-
Diarrea	-	-	-	-
Hiperactividad	-	-	-	-
Color de piel	+	+	+	+
Letargo	-	-	-	-
Convulsión	+	+	+	+
Respuesta de sonido	+	+	+	+

Notas: + = normal o - = ausente.

Los datos representan los valores de tres determinaciones (n = 4).

Tabla 10. Efecto de la toxicidad subaguda del extracto de hoja seca de *Hibiscus rosa-sinensis* sobre el peso corporal en dosis de extracto de 1000 mg/kg de peso corporal a 28 días

Tratamiento	Peso corporal (g)			Hígado	
	Día inicial	Día 14	Día 28	Aumento de peso el día 28 (g)	Peso (g)
Control	230.5 ± 16.6	262.0 ± 8.8	293.3 ± 9.5	62.0 ± 16.6	13.3 ± 2.8
<i>H. rosa-sinensis</i>	222.6 ± 8.0	251.0 ± 7.5	288.0 ± 13.2	65.3 ± 15.3	12.0 ± 1.9

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 6). Dunnett prueba post-hoc, *: valor s son estadísticamente significativas a P ≤0.05 cuando en comparación con el grupo de control.

En la determinación de proteínas no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en el hígado (Figura 9 A) ni en el riñón (Figura 9 B). Los resultados del presente estudio son semejantes a los reportados en los estudios de toxicidad subaguda del extracto oleoso de *Acrocomia aculeata* (Treasel *et al.* 2014), Kalpaamruthaa (Mythilypriya *et al.* 2007) y del aceite de *Azadirachta indica* (Deng, 2013) donde concluyeron que sus extractos y preparados no fueron tóxicos con dosis diarias durante 28 días, no teniendo diferencias significativas en la concentración de proteínas totales en los grupos tratados con respecto al control.

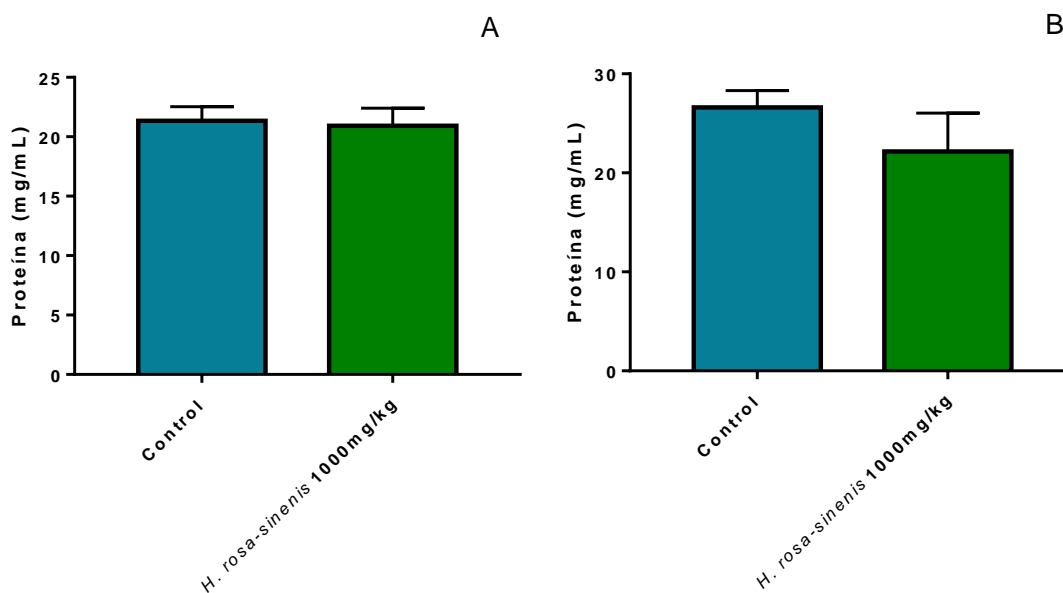


Figura 9. Contenido de proteínas en ratas control y con tratamiento en el hígado (A) y riñón (B). Los valores se presentan como media \pm error estándar (prueba de Dunnett, * $P \leq 0.05$, $n=4$).

Los resultados obtenidos en la concentración de glutatión reducido indican que tanto en hígado como en riñón no hay diferencias significativas en el grupo tratado con el extracto etanólico de hoja seca de *H. rosa-sinensis* con respecto al control mostrando una concentración en los hígados del grupo control de 9.95 mM de glutatión/g tejido y en los hígados del grupo tratado de 10.98 mM de glutatión/g tejido, teniendo un aumento del 6.22 % en los hígados del grupo tratado (Figura 10 A), sin embargo no significativo. En riñón se observa de igual manera que no hay diferencias significativas en ambos tratamientos teniendo una concentración en grupo control de 6 mM GSH/g tejido y de 5.47 mM GSH/g tejido en el grupo tratado, observando un decremento no significativo del 8.83 % de glutatión en riñones del grupo tratado (Figura 10 B). Yawata *et al.* (1975) observaron que los niveles de GSH están íntimamente relacionados con el daño renal, tendiendo a reducir los niveles de este antioxidante al incrementar el daño en riñón, así mismo Ceballos-Picot *et al.* (1996) en un estudio del glutatión como biomarcador del daño renal encontraron que cuando existe daño en los riñones la concentración del GSH es significativamente menor. Sripradha *et al.* (2010) en un estudio sobre la hepatitis alcohólica menciona que el GSH y el glutatión oxidado (GSSH) pueden ser usados para determinar si hay daños hepáticos. Chai *et al.* (1994) explican también que toda célula en exposición a estrés oxidativo tiende a disminuir la concentración de GSH / GSSG de una relación 100:1 hasta una relación 1:1. En la investigación presente al no haber encontrado cambios en los niveles de glutatión reducido se puede decir que el extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* no presenta ninguna toxicidad.

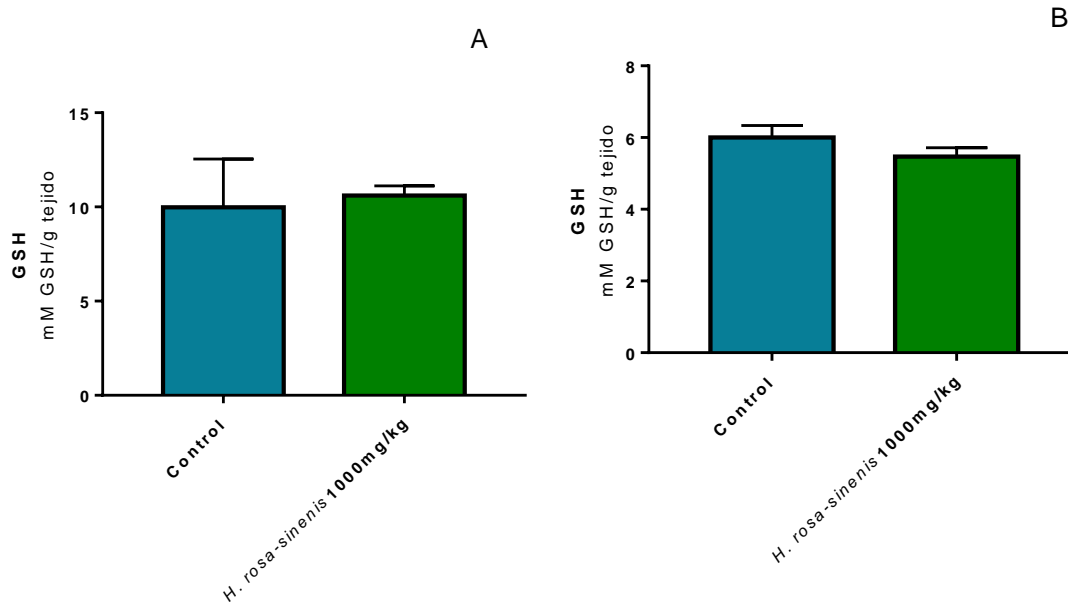


Figura 10. Contenido de glutatión reducido en ratas control y con tratamiento en el hígado (A) y riñón (B). Los valores se presentan como media \pm error estándar (prueba de Dunnett, * $P \leq 0.05$, $n=4$).

La actividad de la PON 1 no presentó diferencias significativas en los hígado ni riñón del grupo tratado con respecto al control, teniendo el grupo tratado una disminución no significativa del 23.36 % en hígado (Figura 11 A), al contrario, en riñón se observó un incremento no significativo del 21.56 % en la actividad de esta enzima en el grupo tratado con el extracto (Figura 11 B).

Dantoine *et al.* (1998) reportaron que la reducción de la actividad arilesterasa o de la PON 1 se observa cuando existe lesión o daño renal, en esta investigación no se presentó una disminución de la actividad de la PON 1, así mismo, Ferré *et al.* (2001), en un estudio de inducción de fibrosis por tetracloruro de carbono, muestra que en hígado la baja actividad de la paraoxanasa indica daño hepático, además de que la disminución de la PON 1 está fuertemente relacionada con el aumento de los productos de la lipoperoxidación, Ferré *et al.* (2005) en un estudio de cirrosis hepática obtiene también niveles bajos de PON 1 al igual que Burlina y Galzigna (1974), este fue el primer estudio donde se observó que cuando existe daño hepático la actividad de la PON1 disminuye sistemáticamente. Por lo anterior Ferré

et al. (2002) proponen que la medición de la PON1 es un buen indicativo para determinar el daño hepático.

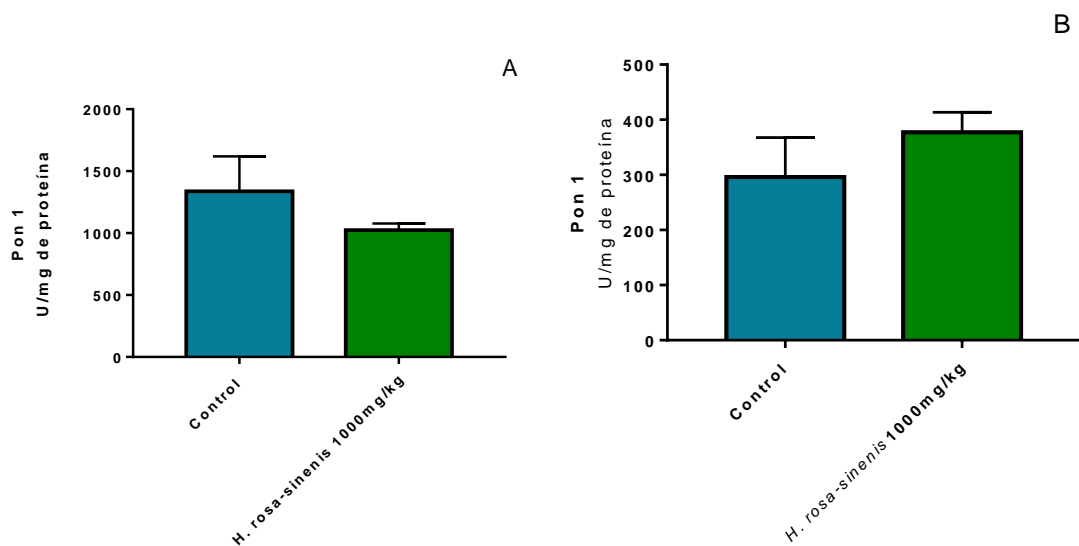


Figura 11. Actividad de la enzima paraoxonasa uno (PON1) en el hígado (A) y Riñón (B) del grupo control y con tratamiento. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, $*P \leq 0.05$, $n=4$).

Con relación a los productos de la lipoperoxidación, se encontró que el MDA se encuentra aumentado no significativamente tanto en hígado (Figura 12 A) como en riñón (Figura 13 A) del grupo tratado, teniendo un aumento en hígado de 31.30 % y en riñón de un 31.49 % con respecto a su control. Así mismo el HNE en ambos órganos tuvo un decremento no significativo, reduciendo los niveles de HNE en hígado tratado con extracto del 1.47 % (Figura 12 B) y en riñón una disminución del 6.42 % (Figura 13 B).

Ferré *et al.* (2001) reportan que una baja actividad de la PON1 está relacionada fuertemente con aumento en niveles de los productos de la lipoperoxidación. Freita *et al.* (2017) en un estudio sobre los beneficios del extracto acuoso de *H. rosa-sinensis* encontraron que con una dosis única del extracto se obtiene una reducción no significativa en la concentración de MDA en un 4.4 %. De igual manera en este trabajo no se observaron cambios evidentes en dichos productos, por lo que se

puede mencionar que el extracto de *Hibiscus rosa-sinensis* no ocasiona daño renal o hepático.

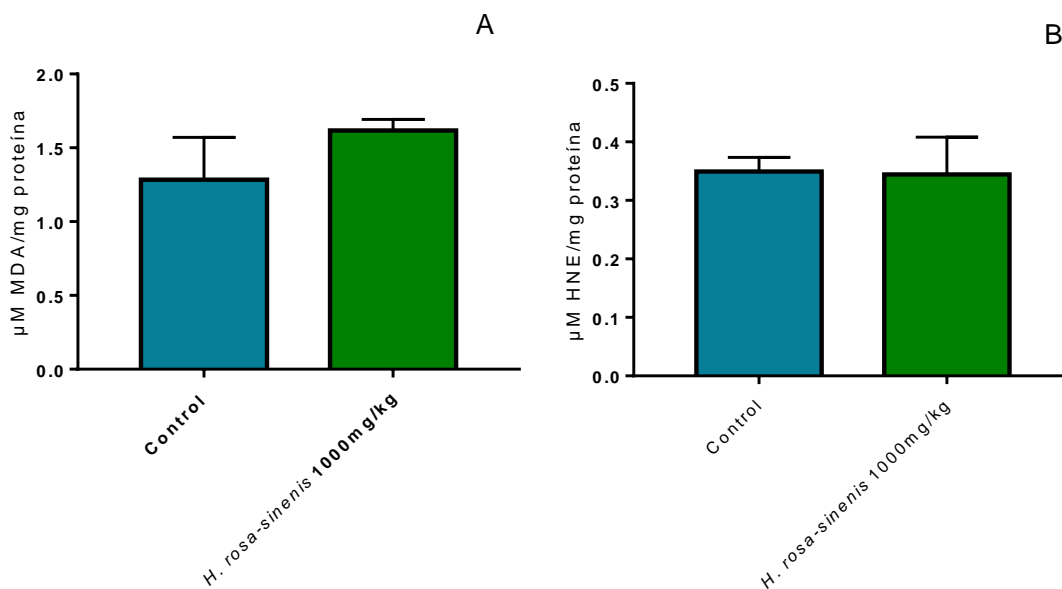


Figura 12. Concentración (μM / mg de proteína) de malondialdehído (A) y 4-hidroxinonenal (B) en el hígado del grupo control y el tratamiento. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, $*P \leq 0.05$, $n=4$).

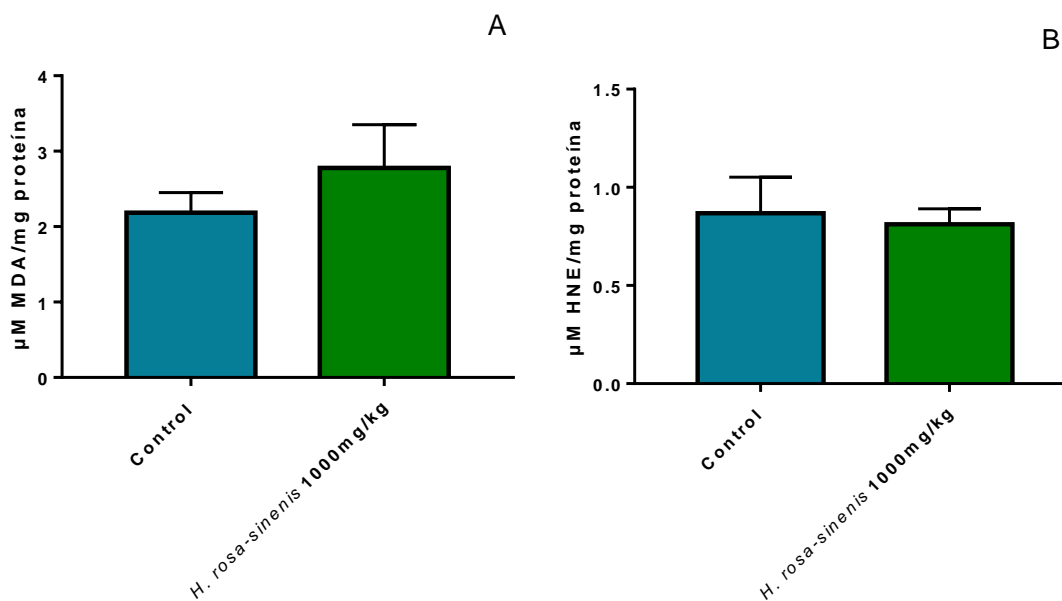


Figura 13. Concentración (μM / mg de proteína) de malondialdehído (A) y 4-hidroxinonenal (B) en riñón del grupo control y con tratamiento. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, $*P \leq 0.05$, $n=4$).

Conclusión

El extracto de *H. rosa-sinensis* no presentó toxicidad alguna y tampoco se observó un cambio significativo en los biomarcadores utilizados (GSH, MDA, HNE, PON 1) a una dosis de 1000 mg/kg durante 28 días. Por lo cual el extracto es seguro a dosis iguales o menores a 1000 mg/kg teniendo en cuenta que la $DL_{50} > 1000$ mg/kg.

Literatura citada

- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72(1-2), 248-254.
- Burlina, A. y Galzigna, L. 1974. Serum arylesterase isoenzymes in chronic hepatitis. *Clin Biochem.* 7, 202–205.
- Ceballos-Picot, I., Witko-Sarsat, V., Merad-Boudia, M., Nguyen, A.T., Thévenin, M., Jaudon, M.C., Zingraff, J., Verger, C., Jingers, P., Descamps-Latscha B. 1996. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *21(6)*, 845–853.
- Chai, Y.C., Ashraf S.S., Rokutan, K., Johnston, Jr R.B., Thomas, J.A. 1994. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys.* 10, 273-81
- Conforti, F., Perri, V., Menichini, F., Marrelli, M., Uzunov, D., Statti, G. A., Menichini, F. 2011. Wild Mediterranean Dietary Plants as Inhibitors of Pancreatic Lipase. *Phytotherapy Research*, 26(4), 600–604.

- Dantoine, T.F., Debord, J., Charmes, J.P., Merle, L., Marquet, P., Lachatre, G., Leroux-Robert, C. 1998. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 2082-2088.
- Deng, Yun-xia; Cao, Mei; Shi, Dong-xia; Yin, Zhong-qiong; Jia, Ren-yong; Xu, Jiao; Wang, Chuan; Lv, Cheng; Liang, Xiao-xia; He, Chang-liang; Yang, Zhi-rong; Zhao, Jian 2013. Toxicological evaluation of neem (*Azadirachta indica*) oil: Acute and subacute toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 35(2), 240–246.
- Ferre, N., Camps, J., Cabre, M., Paul, A, Joven, J. 2001. Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism.* 50,997–1000
- Ferré, N., Camps, J., Prats, E., Vilella, E., Paul, P., Figuer, L., Joven, J. 2002. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin. Chem.* 48, 261-268.
- Ferre, N., Marsillach, J., Camps, J., Rull, A., Coll, B., Tous, M., Joven, J. 2005. Genetic association of paraoxonase-1 polymorphisms and chronic hepatitis C virus infection. *Clin Chim Acta.* 361,206–210
- Johnston, J.W., Home, S., Harding, K. y Benson, E.E. 2007. Evaluation of the 1-methyl-2-phenylindole colorimetric assay for aldehydic lipid peroxidation products in plants: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Plant Physiology and Biochemistry.* 45, 108-112.
- Katzung, G.B. 2009. *Farmacología Básica y Clínica.* 11ª edición. Editorial McGraw Hill. México, D.F. pp 1159.
- Matkowski, A., Tasarz, P., Szypuła, E., 2008. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *J Med Plant Res* 2: disponible en: [http://www.academicjournals.org/article/article1380527961_Matkowski et al.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1380527961_Matkowski_et_al.pdf).
- Meena, A.K., Akansha, J., Keerty, P. ySingh. R. K.. 2018. Acute Toxicity and Genotoxic Activity of Hibiscus rosa sinensis Flower Extract. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*; 2321-2748.

- Mythilypriya, R., Shanthi, P., Sachdanandam, P. 2007. Oral Acute and Subacute Toxicity Studies with Kalpaamruthaa, a Modified Indigenous Preparation, on Rats. *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*, 53(4), 351–358.
- Nath, P., Yadav, A. 2015. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the methanolic extract from leaves of *Hibiscus rosa-sinensis* L. in mice. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(1), 70–73.
- OECD. 2001. Guideline for the Testing of Chemicals N° 423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Co-operation and Development. Disponible en <http://www.oecd.org> . Consultado en agosto de 2020.
- Raduan, S.Z, Abdul Aziz, M.W.H., Roslida, A.H, Zakaria, Z.A, Zuraini, A, Hakim, M.N. 2013. Anti-inflammatory effects of *Hibiscus rosa-sinensis* L. and *Hibiscus rosa-sinensis* var. Alba ethanol extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(4), 754– 762.
- Sedlak, J., Lindsay, R. H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*. 25: 192-205.
- Sripradha, R., Sridhar, M.G., Agrawal A. 2010. Can protein carbonyl/ glutathione ratio be used as a potential biomarker to assess oxidative stress in alcoholic hepatitis? *Indian J Med Sci*. 64, 476-83.
- Traesel, G.K., de Souza, J.C., de Barros, A.L., Souza, M.A., Schmitz, W.O., Muzzi, R. M., Oesterreich, S.A., Arena, A.C. 2014. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 320–325.
- Yawata, Y., Jacob, H. S. 1975. Abnormal red cell metabolism in patients with chronic uremia; Nature of defects and its persistence despite adequate hemodialysis. *Blood* 45, 231.

7. DISCUSIÓN GENERAL

Este trabajo de investigación presenta una búsqueda para encontrar plantas que tengan actividad inhibitoria de la lipasa pancreática para ser usada para combatir la obesidad. Se analizaron 37 extractos vegetales de varias especies, siendo el primer reporte de inhibición de la lipasa pancreática de algunos extractos vegetales.

Se obtuvieron 37 extractos de los cuales se clasificaron como inhibidores bajos, medios, altos y muy altos según el porcentaje de inhibición mostrado a la concentración más alta (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 11 extractos demostraron una inhibición muy alta de lipasa $\geq 61\%$. Siendo el extracto etanólico de hoja seca de *Hibiscus rosa-sinensis* a una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el que presento mayor actividad inhibitoria de la lipasa pancreática con un 71.90 %, siendo muy semejante al orlistat el cual posee un 70 % de inhibición.

Como se mencionó anteriormente no se cuenta con mucha información de la actividad antilipasa de muchos de los extractos probados, sin embargo hay trabajos relacionados como el de Buchholz y Melzig (2015) que reportaron que los extractos metanólico y acuoso de frutos de *T. indica* tuvieron una actividad inhibitoria de la lipasa del 98 %, mientras que los extractos metanólico y acuoso de semillas de *V. vinífera* presentaron un 100 % y 58 % de inhibición de la lipasa respectivamente, cabe señalar que la concentración de estos extracto fue de 2.5 mg/mL, lo cual difiere con lo encontrado en este trabajo ya que incluso al ser la misma especie la concentración de metabolitos puede variar de un órgano a otro además de que la concentración máxima en este trabajo fue de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En 2010 Zheng *et. al.*, encontraron que el extracto metanólico de *Morus alba* a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ posee una inhibición de lipasa pancreática del 16.4 %. En este trabajo se encontró un 50 % de inhibición para el extracto etanólico de hoja fresca y un 41 % de inhibición para el extracto etanólico de hoja seca de *Morus sp.*, lo cual podría indicar que los compuestos inhibitorios de este género podrían tener una polaridad y ser más afines a dilución en solventes polares.

El estudio mostró que la relación taxonómica no está ligada al potencial de inhibición de la lipasa pancreática, ya que este efecto varía según la especie e incluso el tejido

y el tratamiento de este, por ejemplo, Bustanji *et al.*, 2011 realizaron un barrido de 23 plantas medicinales las cuales pertenecen a 15 familias, probaron su actividad inhibitoria de la lipasa pancreática y encontraron casos en los que una misma familia tenía tanto taxones que inhiben a la lipasa pancreática así como taxones que no lo hacen en la familia *Asteraceae*, con *Chrysanthemum coronarium* y *Anthemis palestina* inhibidores y otros como *Achillea biebersteinii* y *Calendula arvensis* no presentaron inhibición. Así mismo, otros casos como el género *Reseda* del cual se probaron dos especies *Reseda alba* y *Reseda lutea* mostró que la actividad inhibitoria puede variar incluso dentro de un mismo género, ya que *Reseda alba* demostró ser capaz de inhibir la lipasa pancreática, mientras que *Reseda lutea* no posee dicha actividad.

Otro caso es el presentado en 2015 por Dechakhamphu y Wongchum quienes cuantificaron la actividad inhibitoria de lipasa pancreática del extracto etanólico de hoja seca de *Syzygium gratum* encontrando un porcentaje de inhibición de 34.93 % a una concentración de 100 µg/mL lo cual indica una estimulación en la actividad enzimática de la lipasa, resultados que presentan una relación a un miembro del mismo género probado en este estudio, *Syzygium jambos*, mostro una acción inhibitoria del 41.5 % a una concentración de 100 µg/mL y una inhibición del 69.3 % a una concentración de 400 µg/mL.

Los trabajos anteriormente mencionados, en conjunto con los obtenidos en este trabajo indican que los metabolitos presentes en las plantas que poseen la capacidad de inhibir la lipasa pancreática no están distribuidos uniformemente en las familias o géneros, teniendo grupos taxonómicos con mayor número de especies inhibitorias de la lipasa pancreática o grupos taxonómicos que varían en esta cualidad. Esto además tiene relación no sólo con la presencia de metabolitos en grupos taxonómicos, sino que también puede deberse a la planta probada, ya que se sabe que los metabolitos secundarios en plantas tienden a cambiar en concentración o bien en composición gracias al estrés que pueda sufrir la planta (Akula *et al.*, 2011).

Una de las plantas probadas por primera vez fue *H. rosa-sinensis*, la cual dio los mejores resultados obtenidos, sin embargo, Kumar *et. al.*, en 2009 utilizando extracto etanólico de raíz de *H. rosa-sinensis* observó una actividad hipolipidémica, al tratar ratas adultas macho de Charles Foster con una HFD, obteniendo niveles bajos de colesterol, fosfolípidos y triacilglicéridos a diferencia del grupo tratado solamente con la dieta alta en grasas. Este resultado aunado al obtenido en este trabajo da bases para la continuación del trabajo en donde se utilizó esta planta como un hipolipemiente.

Sabiendo que *H. rosa-sinensis* posee una alta capacidad de inhibición de la lipasa pancreática, se realizó un estudio de cinética enzimática del extracto para comparar si el tipo de inhibición es semejante al del orlistat. Los resultados muestran que el orlistat es un inhibidor mixto, esto significa que este inhibidor puede estar actuando tanto en el complejo enzima sustrato, así como uniéndose a la enzima libre. Sin embargo, el extracto de *H. rosa-sinensis* tuvo un comportamiento como un inhibidor un-competitivo, indicando que él o la mezcla de compuestos que tiene la capacidad de inhibir a la lipasa pancreática se une solamente al complejo enzima sustrato.

Esta investigación además mostró que en un prueba de tolerancia de triacilglicéridos se puede observar una significativa reducción en la concentración de triacilglicéridos en sangre cuando se administra el extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* a una concentración de 125 mg/kg y con el orlistat a una dosis de 50 mg/kg, lo cual indica una reducción en la absorción de grasas en un 62 % y 65 % respectivamente; en la dosis de *H. rosa-sinensis* a una concentración de 250 y 65.2 mg/kg no se observa diferencia significativa al grupo DGA tratado solo con la mezcla reduciendo su nivel en un 9.7 % con la dosis más alta, esto se puede deber a la cantidad de ácidos grasos presentes en el extracto tal como lo demuestran Rios-Chavez *et al.*, (2019) donde encontraron que el extracto de hoja de *H. rosa-sinensis* contiene un 21.72 % de ácidos grasos.

Al extender el experimento utilizando una HFD es posible afirmar que efectivamente *Hibiscus rosa-sinensis* ayuda a evitar la hiperlipidemia y el aumento de peso ya que tras tres semanas de estar bajo una dieta con un suplemento de 37 % de margarina,

el grupo control mostró un aumento significativo en el peso y en los triacilglicéridos del 20 % y 195 % respectivamente en comparación con el grupo con dieta estándar, teniendo en cuenta que las dietas altas en grasa son uno de los principales factores en el aumento de peso y la hiperlipidemia (Anai *et al.*, 1999; Kumar y Gaur, 2017). Con relación al grupo con una dieta alta en grasas más el orlistat y el grupo con una dieta alta en grasa y el extracto de hojas secas de *H. rosa-sinensis*, presentaron un peso y niveles de triacilglicéridos muy similares al grupo con dieta estándar. Lo cual nos muestra que *H. rosa-sinensis* tiene un efecto similar al orlistat en cuanto a la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática que previene la obesidad y la hiperlipidemia; sin embargo, no incrementó la excreción de grasas en las heces ni afectó su textura lo cual es un efecto secundario del orlistat (Kim *et al.*, 2009).

Por otro lado, no hubo cambios significativos en la concentración de colesterol (mg/dL) en el suero de los animales con una dieta alta en grasas durante tres semanas, este resultado es similar al reportado por Woo *et al.*, (2008) en el cual administraron a ratas Sprague-Dawley 10 % de sebo y 5 % de aceite de maíz durante 6 semanas. Cabe mencionar que la mayoría de los trabajos donde administran una dieta rica en grasas usan el sebo que es un producto de origen animal, por lo cual se incrementa el nivel de colesterol en los animales tratados bajo esta dieta, en el caso presente se uso grasa de origen vegetal.

Mencionado anteriormente, Kumar *et al.*, (2009) probaron el efecto hipolipidémico del extracto de raíz de *H. rosa-sinensis*, encontrando resultados favorables; sin embargo, al comparar con el presente trabajo se puede asumir que el extracto analizado tiene una acumulación mayor de metabolitos hipolipemiantes ya que la concentración del extracto de la raíz fue de 500 mg/kg, mientras que en este trabajo se utilizó una concentración de 125 mg/kg.

En las pruebas toxicológicas se estableció una DL₅₀ (> 1000 mg/kg) para el extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* ya que los individuos tratados con dicho extracto no mostraron signos de toxicidad general ni cambios conductuales teniendo una mortalidad del 0 % lo cual coincide con los estudios de toxicidad aguda de *H. rosa-sinensis*, ya que se han probado extractos metanólicos de hoja seca y extractos de

flor seca en los cuales se ha demostrado que la DL₅₀ en hoja supera los 2000 mg/kg (Raduan *et al.* 2013; Nath *et al.*, 2015) y en flor una dosis de 1600 mg/kg puede presentar un 20 % de mortalidad (Meena *et al.*, 2018).

La prueba de toxicidad sub-aguda mostro que incluso administrando diariamente durante 28 días con una dosis alta del extracto etanólico de *H. rosa-sinensis* no se presentan anomalías conductuales ni defunciones. Sin embargo, para determinar daño hepático y renal se determinó el contenido de algunos marcadores como las proteínas totales, GSH, MDA, HNE y PON 1.

Estos marcadores fueron elegidos ya que se sabe que bajos niveles de GSH están relacionados con el daño hepático y renal y esta tendencia se agudiza cuando el daño incrementa (Yawata *et al.*,1975; Ceballos-Picot *et al.*, 1996; Chai *et al.*, 1994; Sripradha *et al.*, 2010). De igual manera la actividad de la PON 1 ha demostrado disminuir cuando existen lesiones renales o hepáticas por xenobióticos, por lo que investigadores proponen que la actividad de la PON 1 es un claro indicativo para determinar daños hepáticos y renales (Burlina y Galzigna, 1974; Dantoine *et al.*, 1998; Ferré *et al.*,2002), además de que el aumento de productos de la lipoperoxidación como MDA y HNE están fuertemente relacionados a la disminución de la actividad de la PON 1 (Ferré *et al.*,2001).

Las proteínas totales se han medido en trabajos de toxicidad sub-aguda del extracto oleoso de *Acrocomia aculeata* (Treasel *et al.* 2014), Kalpaamruthaa (Mythilypriya *et al.* 2007) y del aceite de *Azadirachta indica* (Deng, 2013) donde concluyeron que sus extractos y preparados no fueron tóxicos con dosis diarias durante 28 días, no teniendo diferencias significativas en la concentración de proteínas totales en los grupos tratados con respecto al control.

En el presente estudio al no haber encontrado cambios en los niveles de proteínas totales GSH, MDA, HNE y PON1 puede decirse que el extracto de hoja seca de *H. rosa-sinensis* no presenta ninguna toxicidad.

8. CONCLUSIÓN

El extracto de hojas secas de *H. rosa-sinensis* fue la planta que presentó mayor capacidad inhibitoria de la lipasa pancreática entre las 37 plantas seleccionadas, actividad inhibitoria semejante al orlistat que es de 70 %. También demostró tener una buena capacidad hipolipidémica, además de ayudar a la prevención de sobrepeso al evitar la absorción de lípidos y el aumento de peso evitando además los efectos secundarios como diarrea o excreción líquida de grasas; las pruebas toxicológicas demostraron que no posee efectos hepatotóxicos o nefrotóxicos.

9. LITERATURA CITADA

- Ahima, R. S. yAntwi, D. A. 2008. Brain Regulation of Appetite and Satiety. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 37(4), 811–823.
- Akula, R. yRavishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720–1731.
- Allison, A. C., Cacabelos, R., Lombardi, V. R. M., Álvarez, X. A., Vigo, C. 2001. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(7), 1341–1357.
- Anai, M., Funaki, M., Ogihara, T., Kanda, A., Onishi, Y. 1999. Enhanced insulin-stimulated activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the liver of high fat fed rats. *Diabetes*, 48,158-169.
- Ariens, E.J., Lehman, P.A., Simonis, A.M. 1978. Introducción a la Toxicología General. Pp 334.
- Arundel C. y J. H. Lewis. 2007. Drug induced liver disease in 2006. Lippincott Williams y Wilkins 0267-1379.
- Benedetti, A., Comporti, M., Esterbauer, H. 1980. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta*. 620, 281-96.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., y Crowe, S. E. 2014. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological Reviews*, 94(2), 329–354.
- Buchholz, 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. doi:10.1002/ptr.5525
- Burlina, A. y Galzigna, L.1974. Serum arylesterase isoenzymes in chronic hepatitis. *Clin Biochem*.7, 202–205.

- Bustanji, Y., Mohammad, M., Hudaib, M. 2011. "Screening of some medicinal plants for their pancreatic lipase inhibitory potential," *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 4, no. 2, pp. 81–88
- Ceballos-Picot, I., Witko-Sarsat, V., Merad-Boudia, M., Nguyen, A.T., Thévenin, M., Jaudon, M.C., Zingraff, J., Verger, C., Jingers, P., Descamps-Latscha B. 1996. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *21(6)*, 845–853.
- Chai, Y.C., Ashraf S.S., Rokutan K., Johnston, Jr R.B., Thomas, J.A. 1994. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys*. 10, 273-81
- Dantoine, T.F., Debord, J., Charmes, J.P., Merle, L., Marquet, P., Lachatre, G., Leroux-Robert, C. 1998. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 2082-2088.
- Dash, D.K., V. C. Yeligar, S. S. Nayak, T. Ghosh, D. Rajalingam, P. Sengupta, B.C. Maiti, T. K. Maity. 2007. Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of *Ichnocarpus frutescens* (Linn.) R.Br. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Trop J Pharm Res*, 6(3), 755-765.
- Dechakhamphu, A., Wongchum, N. 2015. Screening for anti-pancreatic lipase properties of 28 traditional Thai medicinal herbs. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(12), 1042–1045.
- Deng, Yun-xia; Cao, Mei; Shi, Dong-xia; Yin, Zhong-qiong; Jia, Ren-yong; Xu, Jiao; Wang, Chuan; Lv, Cheng; Liang, Xiao-xia; He, Chang-liang; Yang, Zhi-rong; Zhao, Jian 2013. Toxicological evaluation of neem (*Azadirachta indica*) oil: Acute and subacute toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 35(2), 240–246.
- Dietrich, M. O. yHorvath, T. L. 2012. Limitations in anti-obesity drug development: the critical role of hunger-promoting neurons. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(9), 675–691.

- Enerbäck, S. 2010. Brown adipose tissue in humans. *International Journal of Obesity*, 34(S1), S43–S46.
- Ferré, N., Camps, J., Prats, E., Vilella, E., Paul, P., Figuer, L., Joven, J. 2002. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin. Chem.* 48, 261-268.
- Ferre, N., Camps, J., Cabre, M., Paul, A, Joven, J. 2001. Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism*. 50,997–1000
- Field, B. C. T., Chaudhri, O. B. y Bloom, S. R. 2010. Bowels control brain: gut hormones and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(8), 444–453.
- Foulkes, E.C., Hammond, P.B. 1975. Toxicology of the kidney. In *Toxicology, the Basic Science of Poisons* (L. S. Cassarett and J. Doull, Eds.). Macmillan, New York.
- Gong, D. W., He, Y., Karas, M. y Reitman, M. 1997. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *The Journal of biological chemistry*, 272(39), 24129–24132.
- Gutiérrez-Salinas, J. y Morales-González, J.A. 2004. Producción de radicales libres derivados del oxígeno y daño al hepatocito. *Med Int Mex*; 20, 287-95.
- Halliwell, B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*; 91,14S-22S.
- Hsu, C. L. y Yen, G. C. 2007. Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(5), 1730–1736.
- Jung, U. y Choi, M.-S. 2014. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 6184–6223

- Katzung, G.B. 2009. Farmacología Básica y Clínica. 11ª edición. Editorial McGraw Hill. México, D.F. pp 1159.
- Kim, J., Jang, D.S., Kim, H., Kim, J.S. 2009. Anti-lipase and lipolytic activities of ursolic acid isolated from the roots of *Actinidia argute*. Archives of Pharmacal Research. 32(7), 983-987.
- Kumar, V, Singh P., Chander R., Mahdi F., Singh S., Singh R., Khanna A.K., Saxena J.K, Mahdi A.A., Singh V.K. 2009. Hypolipidemic activity of *Hibiscus rosa sinensis* root in rats. Indian J Biochem Biophys. 46(6):507-10
- Kumar, V., Gaur, P. 2017. Antiobesity activity of liraglutide on high fat diet-induced obesity in Wistar rats. Current Research in Diabetes & Obesity Journal. 3(1).
- Lee, J. yOzcan, U. 2013. Unfolded Protein Response Signaling and Metabolic Diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 289(3), 1203–1211.
- Lin, J., Della-Fera, M. A. yBaile, C. A. 2005. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity research*, 13(6), 982–990. 5
- Liu, J., Lee, J., Salazar-Hernandez, M. A., Mazitschek, R., Ozcan, U. 2015. Treatment of Obesity with Celastrol. *Cell*, 161(5), 999–1011.
- Lopez-Mejia, A. 2018. Estudio farmacológico de los extractos de hoja y flor de *Callistemon citrinus*. Tesis de Maestría. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Lu, S.C. 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 13,1169-83.
- Martínez Sarrasague M., Barrado D.A., Zubillaga M., Hager A., De Paoli T., Boccio J.2006. Conceptos actuales del metabolismo del glu-tación: Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 40:45-51.

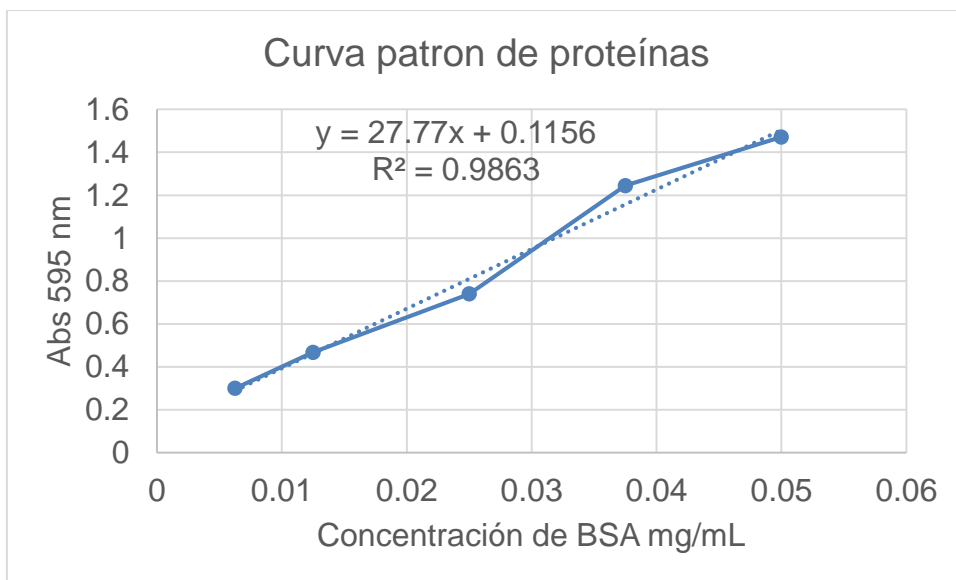
- Mathern, J. R., Raatz, S. K., Thomas, W., Slavin, J. L. 2009. Effect of Fenugreek Fiber on Satiety, Blood Glucose and Insulin Response and Energy Intake in Obese Subjects. *Phytotherapy Research*, 23(11), 1543–1548.
- Meena, A.K., Akansha, J., Keerty, P. ySingh. R. K.. 2018. Acute Toxicity and Genotoxic Activity of Hibiscus rosa sinensis Flower Extract. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*; 2321-2748.
- Moon, H. S., Chung, C. S., Lee, H. G., Kim, T. G., Choi, Y. J. yCho, C. S. 2007. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on lipid accumulation of 3T3-L1 cells. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 15(11), 2571–2582.
- Myers, M. G., Cowley, M. A., Münzberg, H. 2008. Mechanisms of Leptin Action and Leptin Resistance. *Annual Review of Physiology*, 70(1), 537–556.
- Mythilypriya, R., Shanthi, P., Sachdanandam, P. 2007. Oral Acute and Subacute Toxicity Studies with Kalpaamruthaa, a Modified Indigenous Preparation, on Rats. *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*, 53(4), 351–358.
- Nath, P., Yadav, A. 2015. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the methanolic extract from leaves of *Hibiscus rosa-sinensis* L. in mice. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(1), 70–73.
- Niki, E., Yamamoto, K., Komuro, E., Sato, E. 1991 Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr.* 53, 201S-5S.
- Nus, M., Sánchez-Muniz, F., Montero, J.M. 2008. Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 74 (2) 181-202.
- Ozcan, L., Ergin, A. S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., ... Ozcan, U. 2009. Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Central Role in Development of Leptin Resistance. *Cell Metabolism*, 9(1), 35–51.
- Pascuzzo, C. 2008. Farmacología Básica. Lima, Perú. PDF. Pp. 927.
- Powers, M. E. 2001. Ephedra and its application to sport performance: another concern for the athletic trainer?. *Journal of athletic training*, 36(4), 420–424.

- Raduan, S.Z, Abdul-Aziz, M.W.H., Roslida, A.H, Zakaria, Z.A, Zuraini, A, Hakim, M.N. 2013. Anti-inflammatory effects of Hibiscus rosa-sinensis l. and Hibiscus rosa-sinensis var. Alba ethanol extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(4), 754– 762.
- Rayalam, S., Yang, J. Y., Ambati, S., Della-Fera, M. A. yBaile, C. A. 2008. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytotherapy research: PTR*, 22(10), 1367–1371.
- Rui, L. 2013. Brain regulation of energy balance and body weight. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 14(4), 387–407.
- Saito, M., Yoneshiro, T. yMatsushita, M. 2015. Food Ingredients as Anti-Obesity Agents. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 26(11), 585–587.
- Seale, P. yLazar, M. A. 2009. Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. *Diabetes*, 58(7), 1482–1484.
- Shekelle, P. G., Hardy, M. L., Morton, S. C., Maglione, M., Mojica, W. A., Suttorp, M. J., Rhodes, S. L., Jungvig, L. yGagné, J. 2003. Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. *JAMA*, 289(12), 1537–1545.
- Siersbaek, R., Nielsen, R. yMandrup, S. 2010. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS letters*, 584(15), 3242–3249.
- Stancu, C.S., Carnuta, M. G., Sanda, G. M., Toma, L., Deleanu, M., Niculescu, L. S., Sima, A. V. 2015. Hyperlipidemia-induced hepatic and small intestine ER stress and decreased paraoxonase 1 expression and activity is associated with HDL dysfunction in Syrian hamsters. *Molecular Nutrition y Food Research*, 59(11), 2293–2302.
- Traesel, G.K., de Souza, J.C., de Barros, A.L., Souza, M.A., Schmitz, W.O., Muzzi, R. M., Oesterreich, S.A., Arena, A.C. 2014. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 320–325.

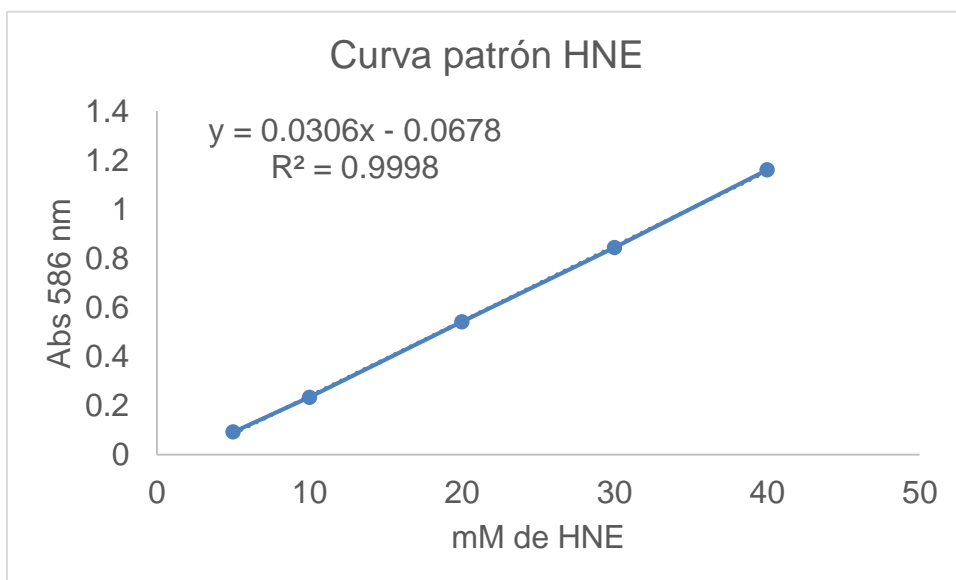
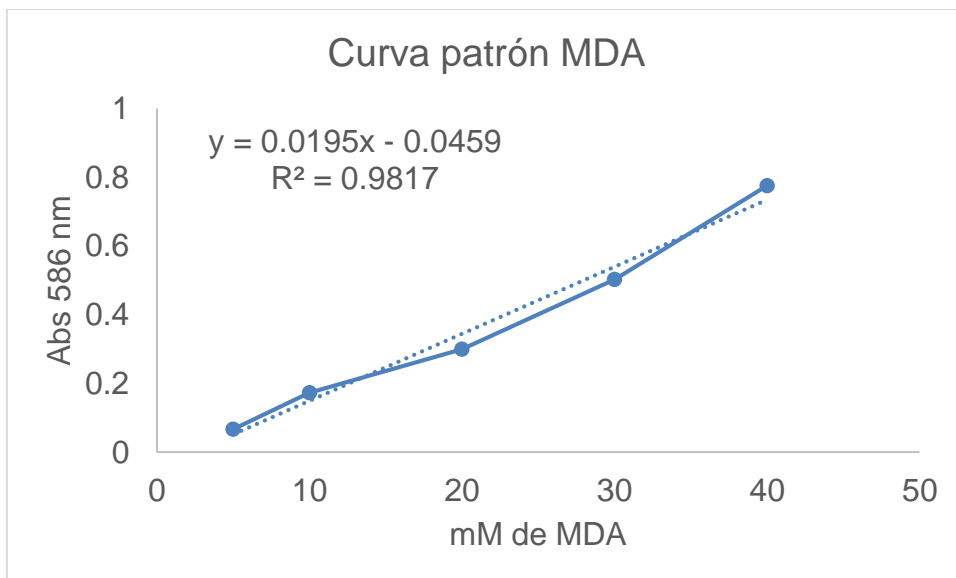
- Waki, H. yTontonoz, P. 2007. *Endocrine functions of adipose tissue. Annual review of pathology, 2*, 31–56.
- Wellman, P. J. 1992. Overview of adrenergic anorectic agents. *The American Journal of Clinical Nutrition, 55(1)*, 193S–198S.
- Woo, M.N, Bok, S.H., Lee, M.K. 2008. Anti-obesity and hypolipidemic effects of a proprietary herb and fiber combination (S&S PWH) in rats fed high-fat diets. *Journal of Medicinal Food. 11(1)*,169-178.
- Yang, J. Y., Della-Fera, M. A., Rayalam, S., Ambati, S., Hartzell, D. L., Park, H. J. yBaile, C. A. 2008. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life sciences, 82(19-20)*, 1032–1039.
- Yawata, Y., Jacob, H. S. 1975. Abnormal red cell metabolism in patients with chronic uremia; Nature of defects and its persistence despite adequate hemodialysis. *Blood 45*, 231.
- Yoshikawa T. y Naito, Y. 2002. What is oxidative stress?. *JMAJ 45(7)*, 271-276.
- Zhang, Z., Zhang, H., Li, B., Meng, X., Wang, J., Zhang, Y., Yao, S., Ma, Q., Jin, L., Yang, J., Wang, W. yNing, G. 2014. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue. *Nature communications, 5*, 5493.
- Zheng, C.-D., Duan, Y.-Q., Gao, J.-M., Ruan, Z.-G. 2010. Screening for Anti-lipase Properties of 37 Traditional Chinese Medicinal Herbs. *Journal of the Chinese Medical Association, 73(6)*, 319–324.

10. ANEXOS

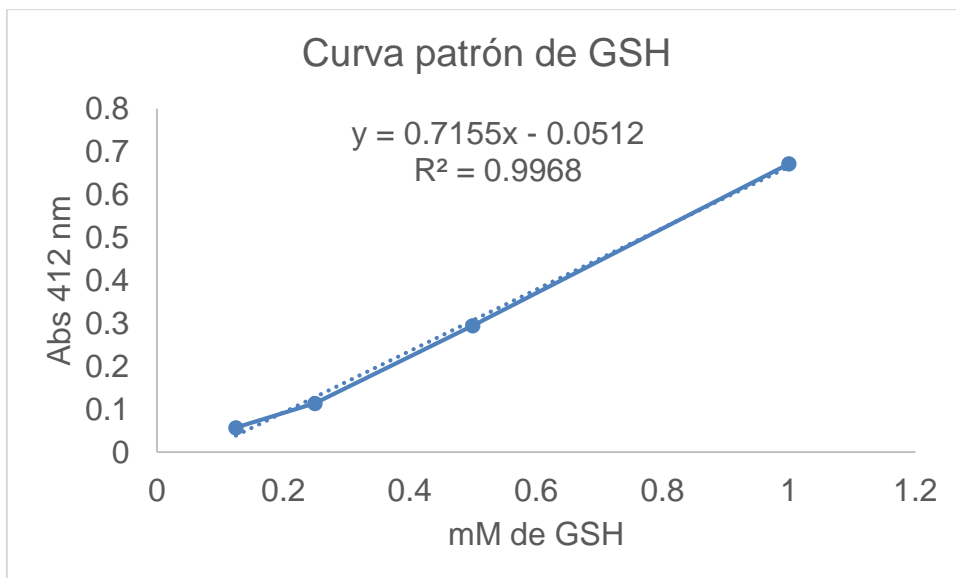
Anexo 1. Curva patrón para la determinación de Proteínas Totales



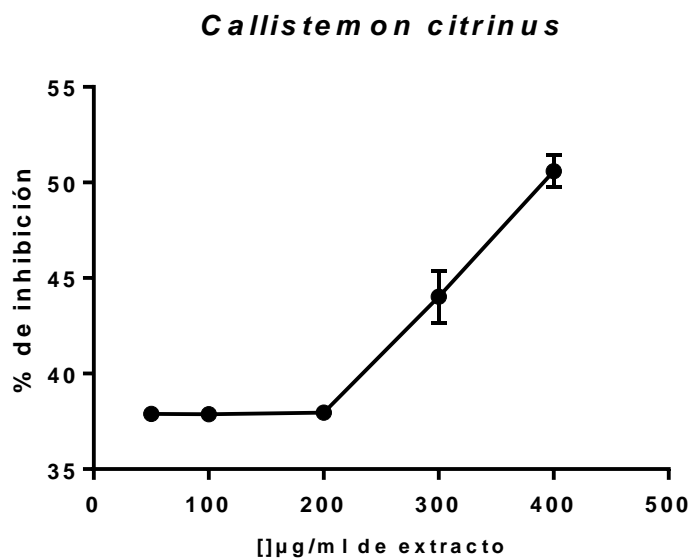
Anexo 2. Curvas patrón para la determinación MDA y HNE



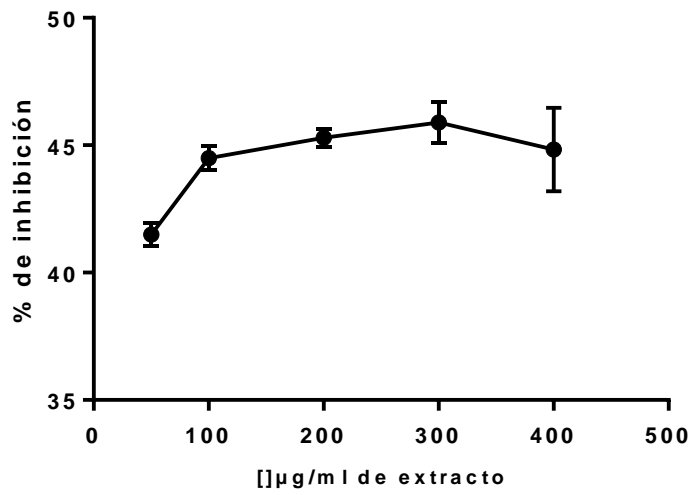
Anexo 3. Curva patrón para la determinación GSH



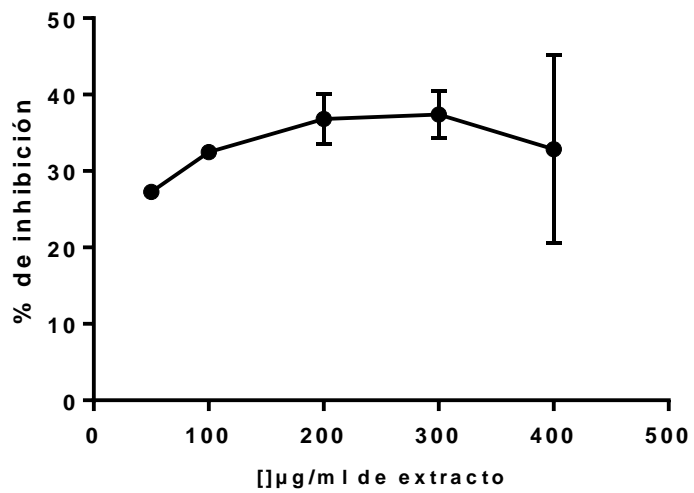
Anexo 4. Curvas de porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática de los diferentes extractos vegetales analizados a diferentes concentraciones.



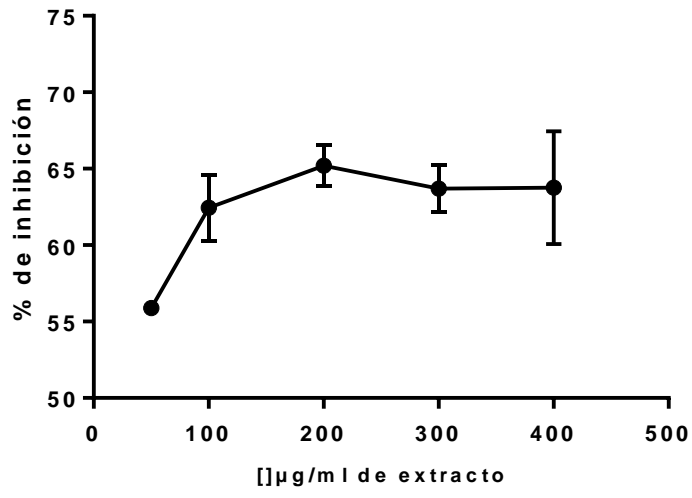
Tigridia pavonia



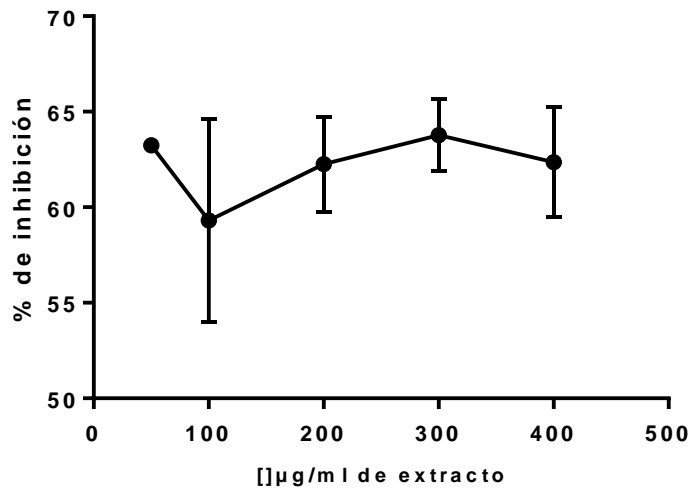
Heliopsis longipes



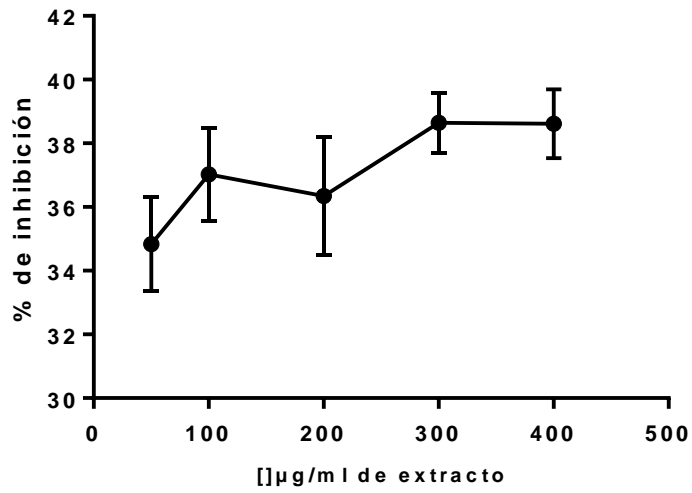
Hibiscus sabdariffa



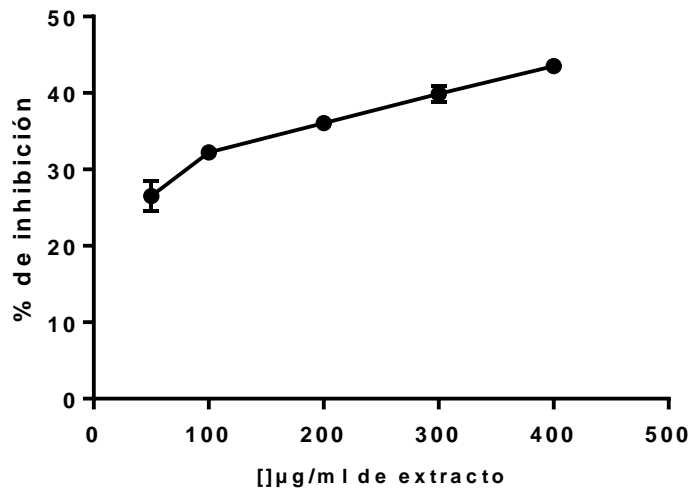
Annana comosus



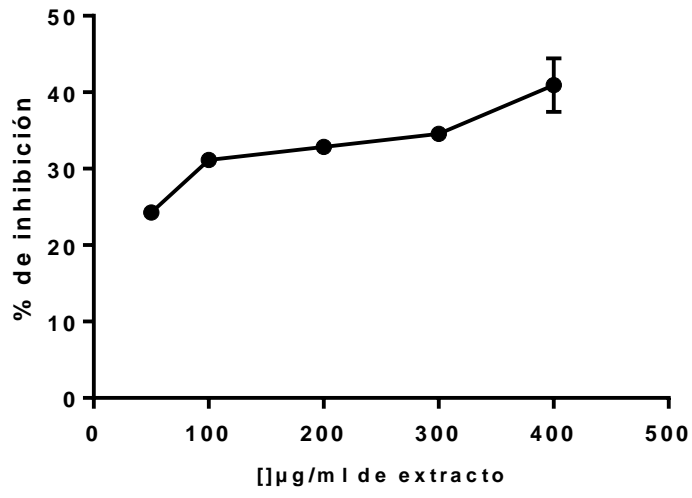
Berenjena



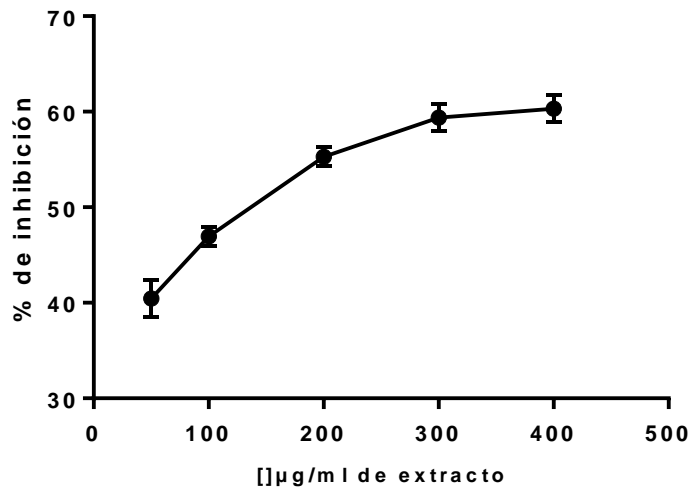
Amorphophallus konjac (fresco)



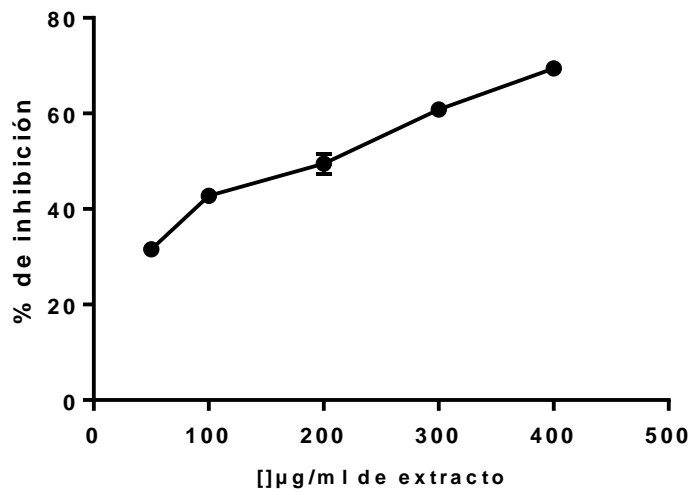
Nelumbo nucifera



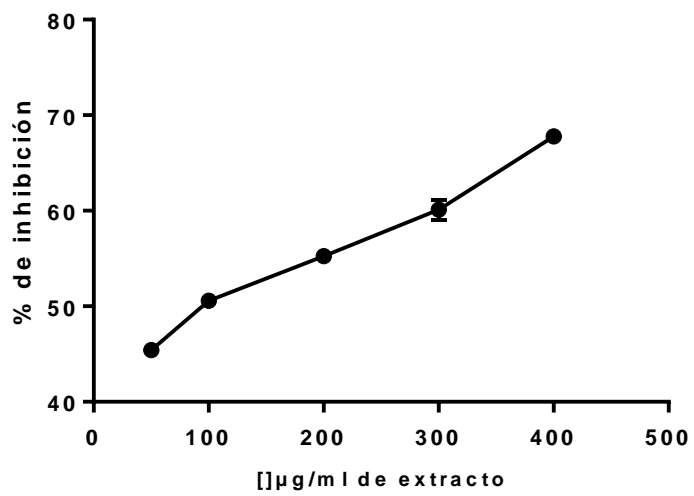
Amorphophallus konjac (seco)



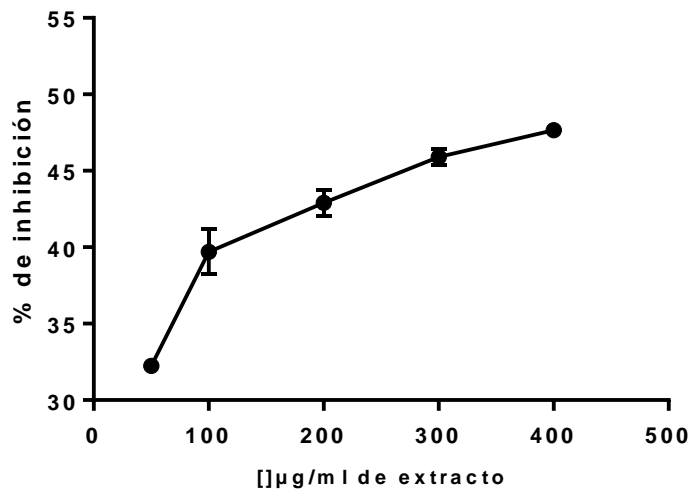
Pomarrosa (seca)



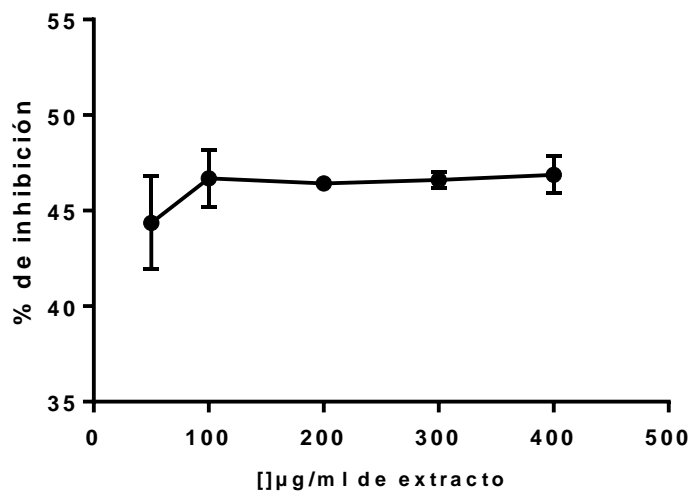
Passiflora



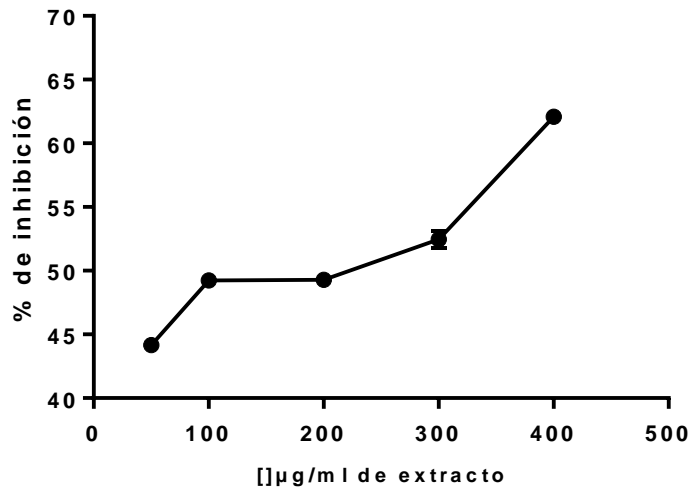
Sépalos Fresa



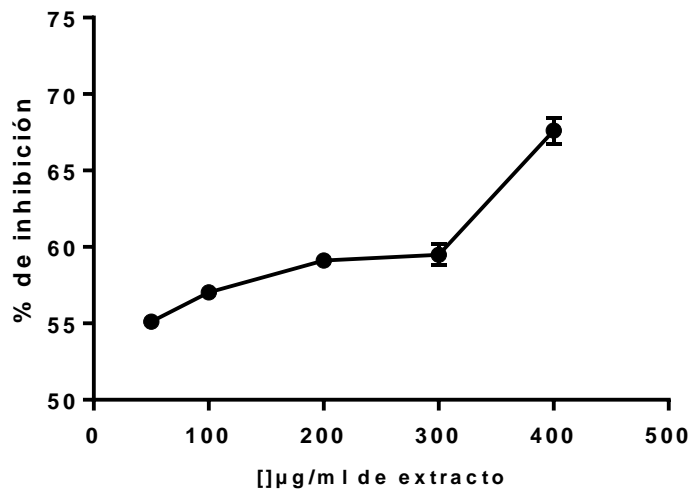
Opuntia



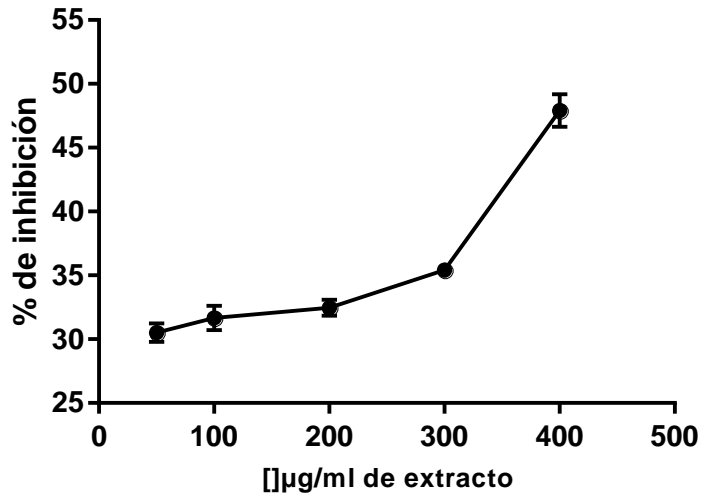
Nanche



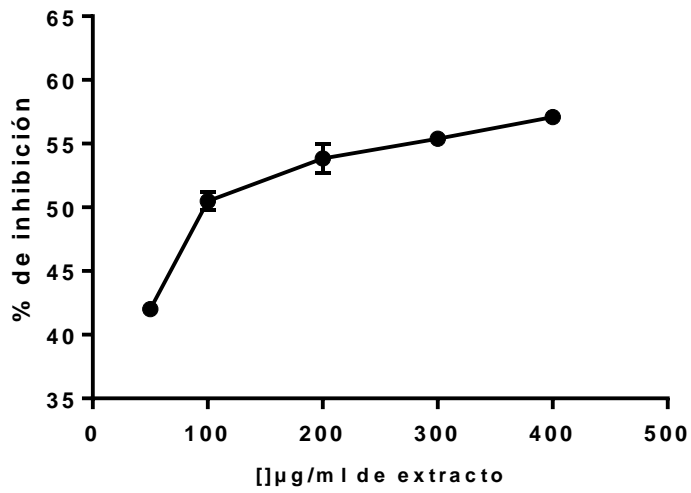
Fresa



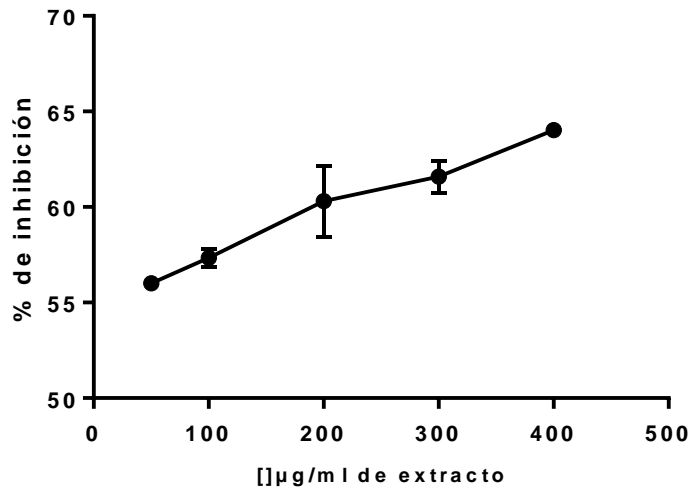
Heidichium coronarium



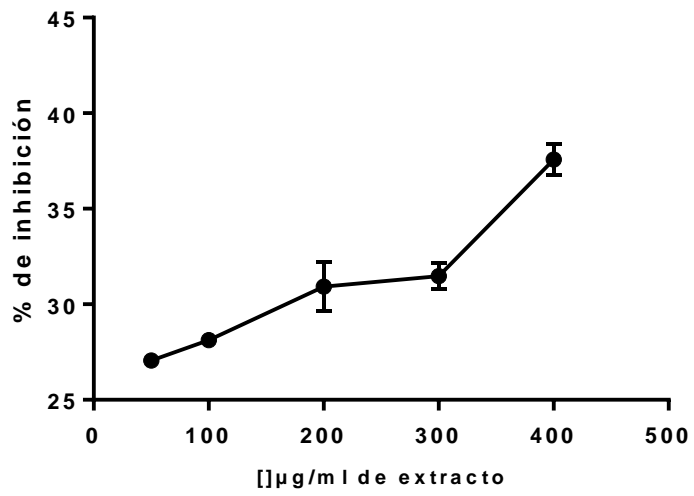
Semillas de melón



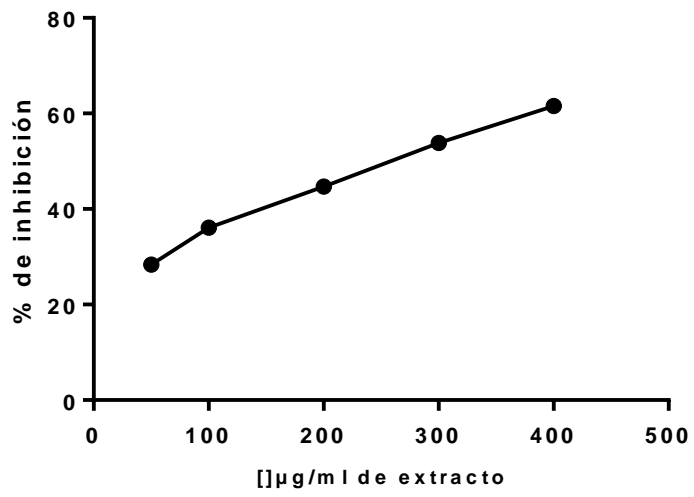
Semillas de papaya



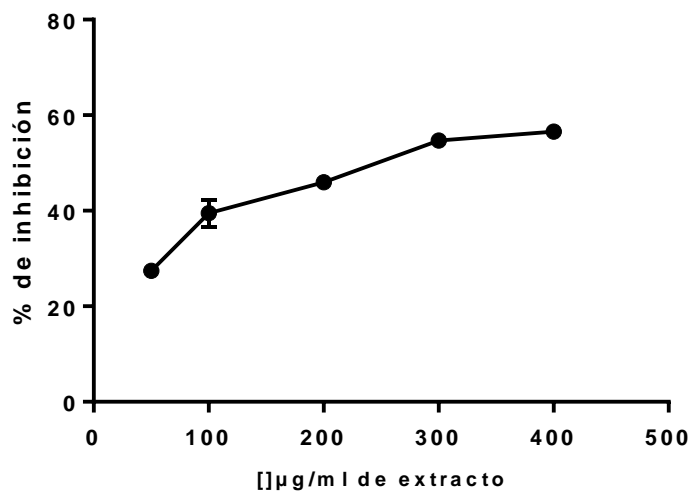
Mora azul



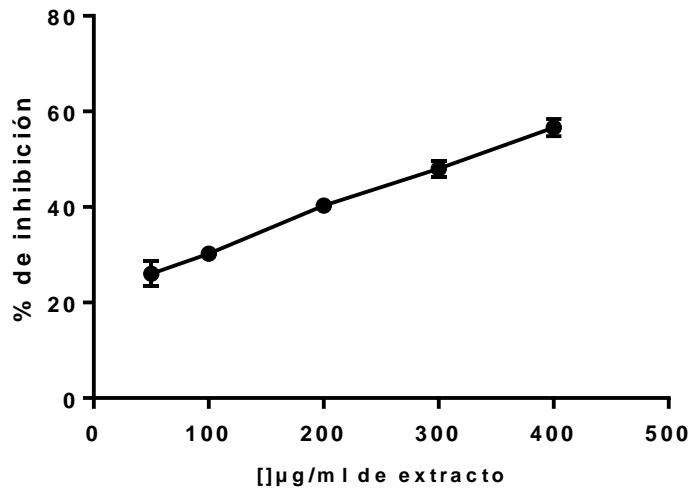
Hoja de chile



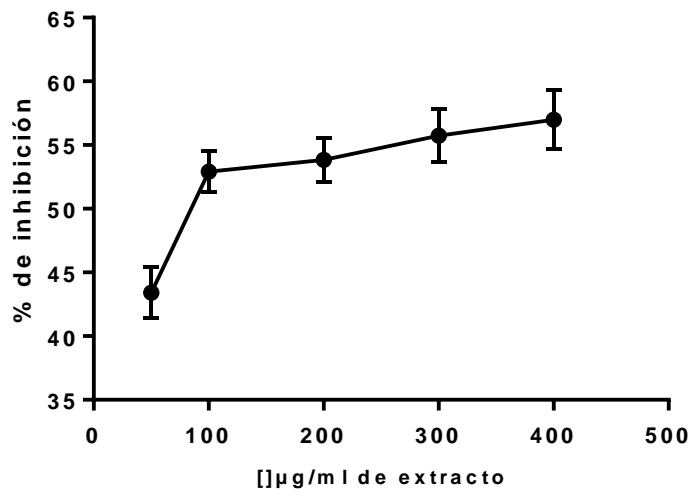
Pomarrosa (fresca)



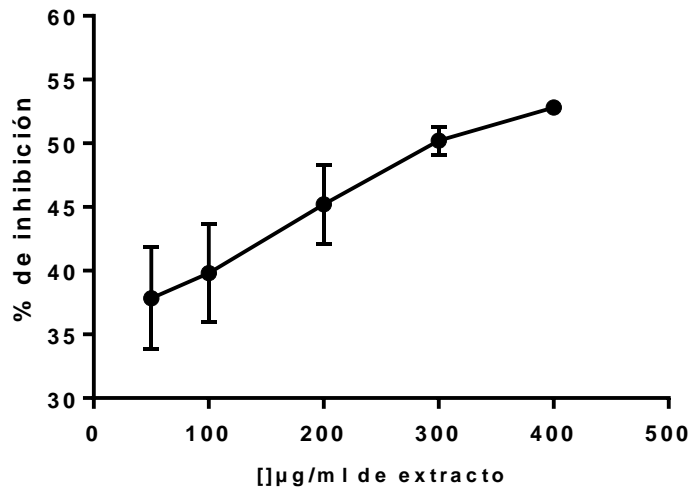
Hoja guanábana



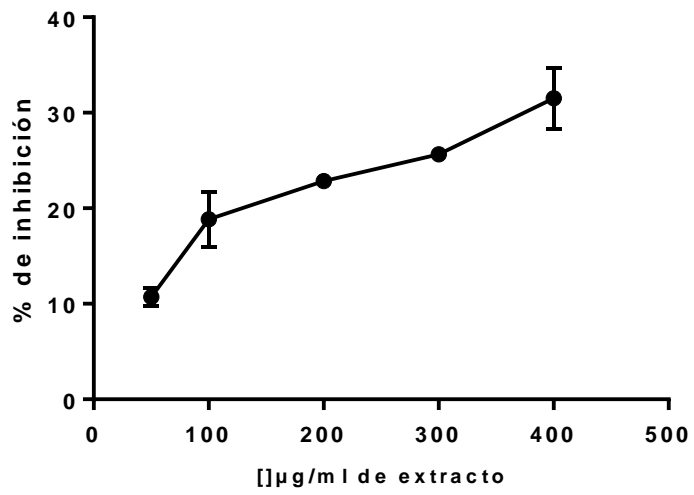
Espinaca



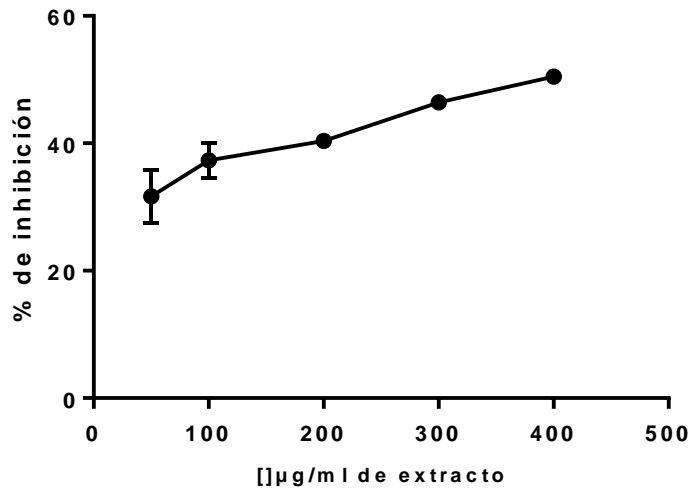
Semillas de chía



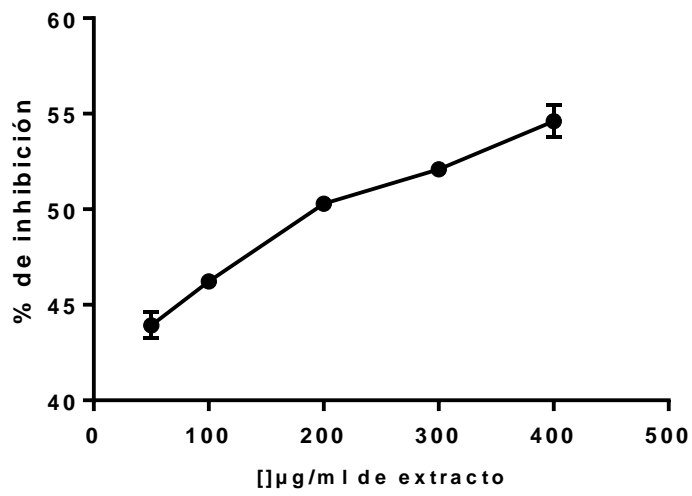
Cáscara de pepino



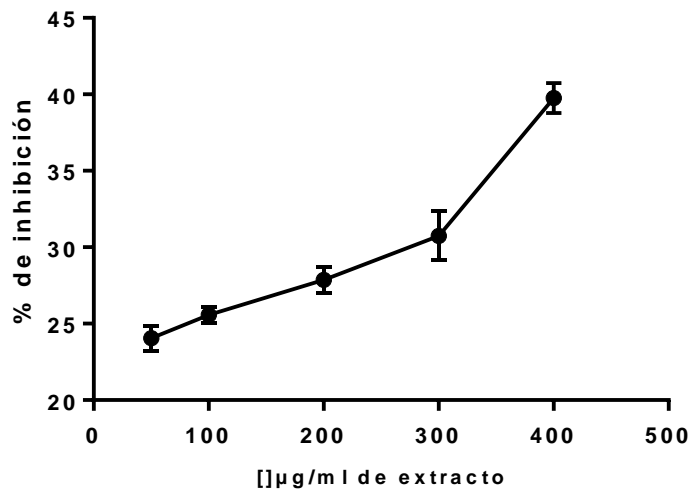
Hoja de Morus sp. (seca)



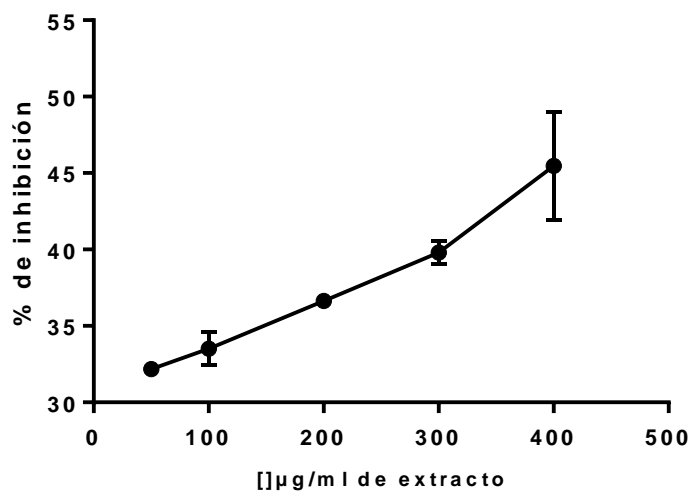
Hoja de Morus sp. (fresca)



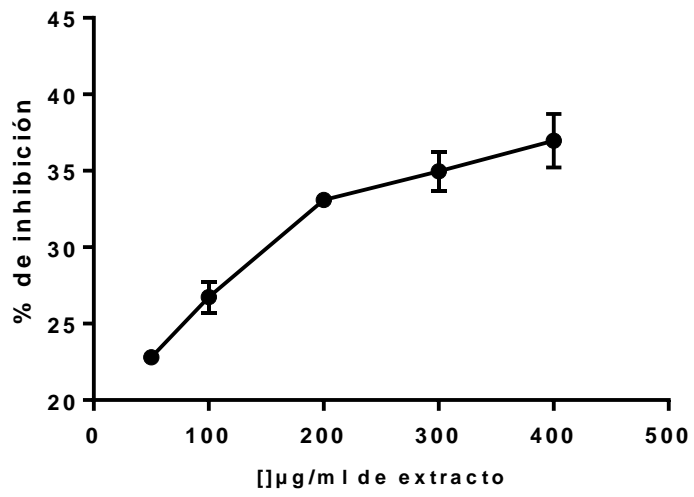
Hoja de Vid (fresca)



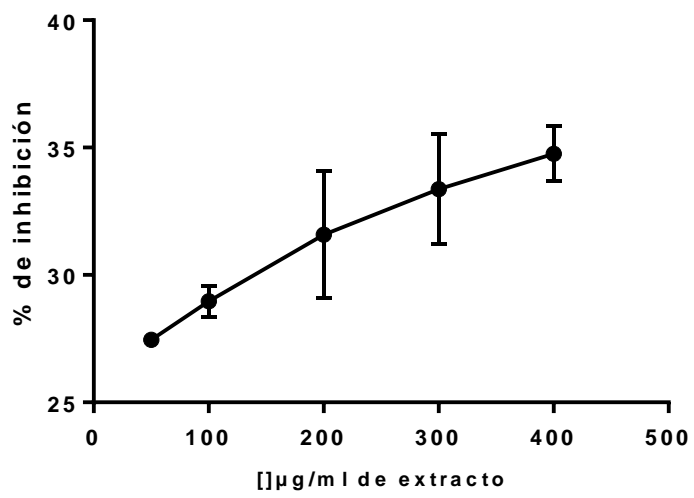
Hoja de vid (seca)



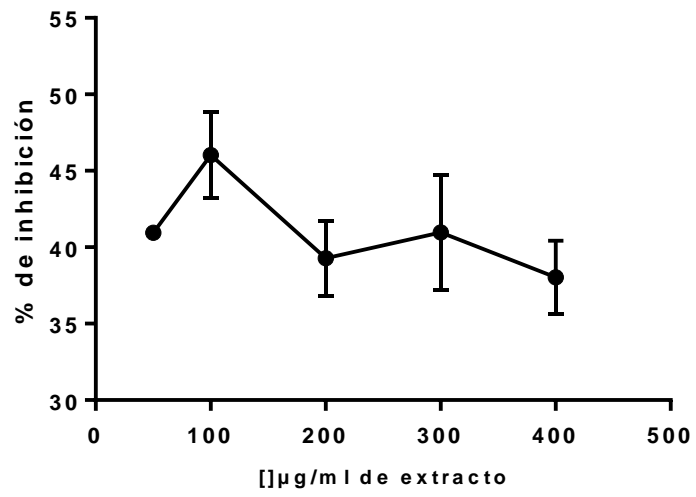
Tamarindo



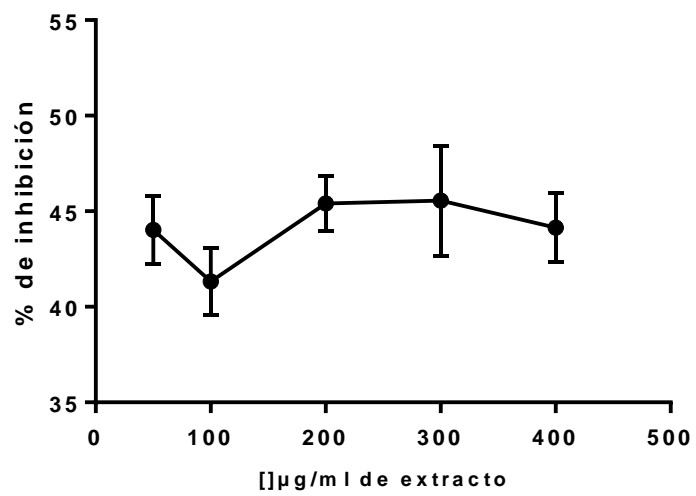
Zarzamora



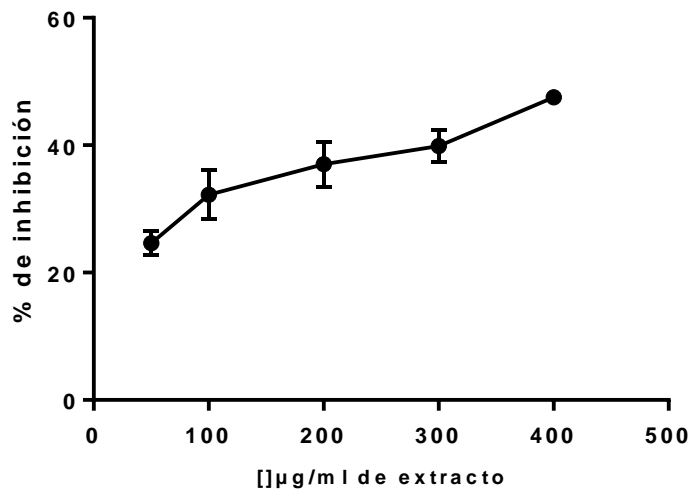
Hoja de chía



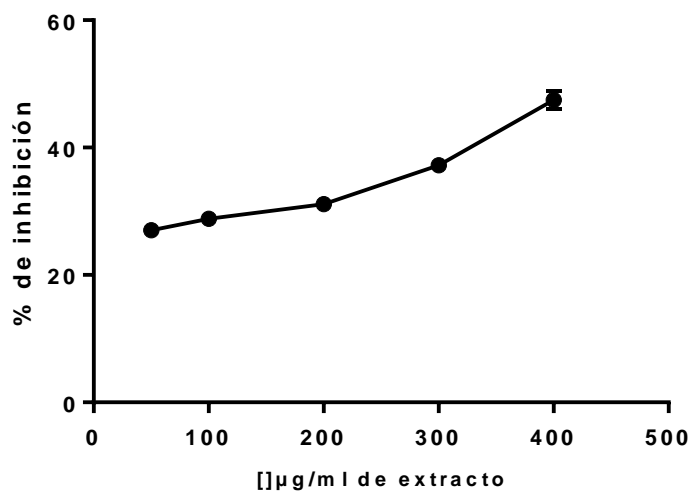
Pisttia stratiotes



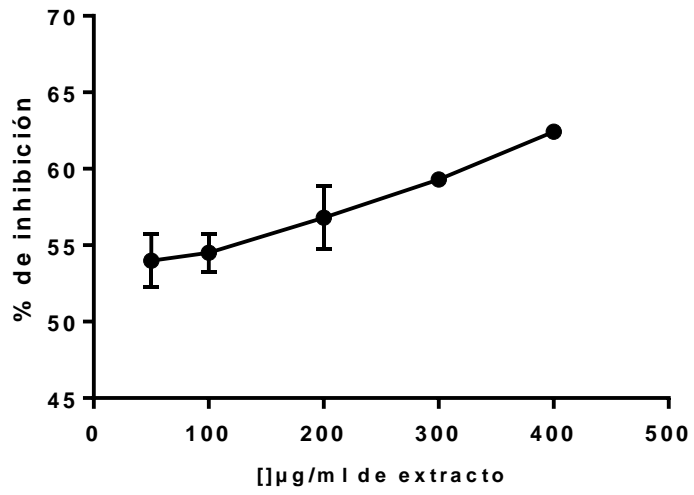
Hibiscus rosa-sinensis (fresco)



Lavanda (seca)



Lavanda (fresca)



Orlistat

