



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

*Valoración de la actividad inhibitoria de
lipasas con productos naturales*

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
YARETH GALVÁN GOIZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	M. en C. Ma. Martha Ugalde Hernández
Vocal	Dr. Andrés Navarrete Castro
Secretario	Q.F.B. Graciela Rojas Vázquez
Suplente	M. en C. José Luis Balderas López
Suplente	M. en C. Juana Rosado Pérez

Lugar en el que se desarrolló este trabajo:

Laboratorio 126. Departamento de Farmacia. Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y FES Zaragoza UNAM

Director de Tesis:

Dr. Andrés Navarrete Castro

Asesor de Tesis:

M. en C. Ma. Martha Ugalde Hernández

Sustentante:

Yareth Galván Goiz

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado parcialmente por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del proyecto PAPIIT 210910, el CONACYT proyecto 82613 y el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 6390-18).

Se agradece la beca otorgada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico en la modalidad de elaboración de tesis del proyecto PAPIIT 210910.

Agradecimientos

Al Dr. Andrés Navarrete Castro, por su confianza, enseñanzas y sabiduría, ya que sin él no sería posible nada de esto.

A la M. en C. María Martha Ugalde Hernández. Por haberme sugerido realizar esta tesis.

A la M. en C. Leticia García de la Cruz por su amistad, experiencia y conocimientos compartidos durante el desarrollo de este proyecto.

Dedicatoria

A mis padres Enriqueta y Sergio que sin ellos no sería nada, por su infinito amor y comprensión, por ser la luz en los momentos más oscuros de mi vida.

A mis hermanos Sergio y Saúl, por ser la alegría de mi vida.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Clasificación de la obesidad y riesgo de enfermedad asociada	3
Cuadro 2	Población con sobrepeso y obesidad en México, 2006-2008	6
Cuadro 3	Principales mecanismos de acción de compuestos para la pérdida de peso	7
Cuadro 4	Fármacos para la obesidad (actuales)	9
Cuadro 5	Medicamentos antiobesidad en tratamiento clínico	9
Cuadro 6	Métodos analíticos para determinación de lipasas	16
Cuadro 7	Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento para la obesidad	19
Cuadro 8	Rendimientos de los extractos de las diferentes plantas	38
Cuadro 9	Resultados de la validación del método	39
Cuadro 10	Concentración inhibitoria de los extractos y compuestos puros	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Prevalencia de obesidad en tres encuestas nacionales, por género	5
Figura 2	Esquema de la unión covalente entre el centro activo de la enzima serina (152) y el anillo β -lactámico del orlistat	12
Figura 3	Papel fisiológico de la lipasa pancreática en la absorción de los lípidos	14
Figura 4	Estructura primaria de lipasa porcina	15
Figura 5	Hidrólisis del p-nitrofenilpalmitato en p-nitrofenol por acción de la lipasa pancreática	17
Figura 6	Estructura química de dos glucósidos cardiacos	21
Figura 7	Estructura química de Nerifolina	21
Figura 8	Semillas de <i>Thevetia</i>	22
Figura 9	Flor de <i>Thevetia thevetioides</i>	23
Figura 10	<i>Hypericum silenoides</i>	25
Figura 11	<i>Hypericum philonotis</i>	26
Figura 12	Raíz de <i>Valeriana edulis ssp. procera</i>	27
Figura 13	Estructuras químicas de los valepotriatos	28
Figura 14	Estructura química de diligustilida	29
Figura 15	Curva de la actividad inhibitoria de los extractos de <i>Hypericum philonotis</i>	40
Figura 16	Curva de la actividad inhibitoria de los extractos de <i>Hypericum silenoides</i>	41

Valoración de la actividad inhibitoria de lipasas con productos naturales.

Figura 17	Curva de la actividad inhibitoria de los extractos de <i>Valeriana edulis ssp. procera</i>	42
Figura 18	Curva de la actividad inhibitoria de los extractos de <i>Thevetia thevetoides</i>	43
Figura 19	Curva de la actividad inhibitoria de Nerifolina y diligustilida	44
Figura 20	Espectro de masas de orlistat obtenido por impacto electrónico	52
Figura 21	Espectro de resonancia magnética nuclear ^1H del orlistat	53
Figura 22	Espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C del orlistat	54

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
I. FUNDAMENTO TEÓRICO	3
1. 1 OBESIDAD	3
1.1.1 <i>Características</i>	3
1.1.2 <i>Etiología de la obesidad</i>	4
1.1.3 <i>Obesidad en México</i>	5
1.1.4 <i>Tratamiento</i>	7
1.2 LIPASAS	13
1.2.1 <i>Actividad enzimática</i>	15
1.3 PRODUCTOS NATURALES.....	18
1.3.1 <i>Plantas para el tratamiento de la obesidad</i>	19
1.3.1.1 <i>Adelfas</i>	20
1.3.1.1.1 <i>Thevetia thevetioides</i>	22
1.3.1.2 <i>Género Hypericum</i>	23
1.3.1.2.1 <i>Hypericum silenoides</i>	24
1.3.1.2.2 <i>Hypericum philonotis</i>	25
1.3.1.3.1 <i>Valeriana edulis ssp. procera</i>	26
1.3.1.3.1.1 <i>Valepotriatos</i>	27
1.3.1.4 <i>Ligusticum porteri</i>	28
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
III. HIPÓTESIS.....	32
IV. OBJETIVO GENERAL	33
V. OBJETIVOS PARTICULARES	33
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1 MATERIAL VEGETAL.....	34
6.2 FÁRMACOS Y SUSTANCIAS	34
6.2.1 <i>Extracción de orlistat</i>	34
6.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS	35
6.4 DETERMINACIONES ESPECTROSCÓPICAS.....	35
6.5 ENSAYO IN VITRO	35
6.5.1 <i>Preparación de las soluciones</i>	35
6.5.2 <i>Curva estándar</i>	36
6.5.3 <i>Cuantificación p-nitrofenol</i>	36
6.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO	36
VII. RESULTADOS.....	38
7.1 RENDIMIENTO DE EXTRACTOS.....	38
7.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO	39
7.3 ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA LIPASA PANCREÁTICA PORCINA CON PRODUCTOS NATURALES	40
VIII. DISCUSIÓN	46
IX. CONCLUSIONES.....	50

X. PERSPECTIVAS.....	51
XI. ANEXO	52
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	55

RESUMEN

Los lípidos se absorben a partir de la dieta gracias a la acción de las enzimas lipasas; debido a esto, la inhibición de las lipasas se ha considerado un blanco farmacológico importante para el control de la obesidad.

El propósito de esta tesis fue investigar la inhibición de la lipasa pancreática porcina con diferentes productos naturales como *Hypericum silenoides* Juss, *Hypericum philonotis* Cham. & Schlecht, *Thevetia thevetoides* (Kunsth.)Schum. en Engl. y Prantl., *Valeriana edulis* ssp. *procera* (Kunth) Meyer y los compuestos puros provenientes de plantas como nerifolina y diligustilida, utilizando el método de la inhibición de la hidrólisis de palmitato de p-nitrofenilo. Se realizaron curvas de concentración-respuesta de los diferentes extractos (hexano, diclorometano, metanol y acuoso), para observar el porcentaje de inhibición de cada uno. Se encontró que los extractos de hexano, diclorometano y acuoso de *Hypericum philonotis*, así como los extractos de diclorometano y acuoso de *Hypericum silenoides*, presentaron la mayor actividad como inhibidores de la lipasa pancreática porcina.

Los extractos de mediana y baja polaridad, diclorometano y hexano, de *Valeriana edulis* ssp. *procera* fueron capaces de inhibir a la lipasa pancreática porcina, posiblemente por la presencia de los valepotriatos. Adicionalmente, la diligustilida necesita una concentración alta de compuesto (>300µg/mL) para que pueda inhibir a la lipasa pancreática en un 50%. Los extractos de *Thevetia thevetoides* y su compuesto puro nerifolina, no presentaron actividad inhibitoria en la lipasa pancreática porcina. Esto sugiere que el mecanismo de acción para la disminución de peso corporal y es diferente a la inhibición de las lipasas.

Cabe mencionar que este trabajo es la primera evidencia experimental de que *Hypericum philonotis* e *Hypericum silenoides* inhiben a la lipasa pancreática porcina en un modelo *in vitro*. Igualmente el extracto de *Valeriana edulis* ssp. *procera* que se sabe, contiene una mayor contenido de valepotriatos presentó efecto inhibitor de las lipasas, debido tal vez, a la reactividad del anillo oxirano presente en los valepotriatos, el cual podría formar un enlace covalente con la enzima. Además se demostró que *Thevetia thevetoides* y su metabolito nerifolina no presentan actividad inhibitoria en dicho modelo.

INTRODUCCIÓN

La obesidad constituye uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo. El tratamiento de la obesidad incluye modificaciones en el estilo de vida: menor consumo energético y aumento de la actividad física y en algunos casos, medicamentos o cirugía (García- García et al., 2010).

En el mundo se han hecho grandes esfuerzos para desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de la obesidad. Sin embargo, solo 2 agentes han sido introducidos al mercado: sibutramina (Reductil® o Meridia®), un supresor del apetito, aunque está suspendida su venta por la COFEPRIS (Comisión Federal Para la Protección contra Riesgos Sanitarios) desde 2010, y orlistat (Xenical®) un inhibidor de la absorción de grasa, cuyo mecanismo de acción es inhibir a la lipasa pancreática (Brirari y Bhutani, 2007).

La inhibición de la lipasa se ha considerado un blanco farmacológico importante para el control de la obesidad que no incluye un mecanismo de acción en el sistema nervioso central; ya que el consumo excesivo de lípidos en la dieta a largo plazo contribuye al desarrollo de la obesidad (Slanc, et al., 2009).

Una alternativa para el tratamiento de la obesidad son las plantas medicinales. Existe una amplia literatura en la que se demuestra que existe progreso respecto al conocimiento de los bioactivos que se encuentran presentes en los alimentos vegetales y su relación con la obesidad.

Hypericum silenoides Juss, comúnmente llamada Tlanchalagua y *Thevetia thevetoides* (codo de fraile) son empleadas en la medicina tradicional herbolaria para la pérdida de peso, sin que existan bases científicas que sustenten este uso, por lo que en el presente trabajo se investigaron estas plantas considerando la posibilidad de que inhiban a la lipasa pancreática porcina, para así dar sustento científico sobre el uso tradicional de estas plantas para el tratamiento de la obesidad (Moro y Basile, 2000).

Así mismo, se investigaron algunos compuestos presentes en plantas medicinales en cuya estructura tienen un anillo reactivo (como lo son los valepotriatos presentes en la planta *Valeriana edulis* ssp. *procera*, la diligustilida y la nerifolina) para determinar si son capaces de inhibir a la lipasa pancreática, mecanismo por el cual actúa el orlistat.

I. FUNDAMENTO TEÓRICO

1. 1 Obesidad

1.1.1 Características

La obesidad es un padecimiento crónico, que se caracteriza por la acumulación de tejido adiposo (Hensrud y Klein, 2006), se presenta cuando la ingesta de alimentos es superior a las necesidades del organismo (García- García et al., 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define con base al Índice de Masa Corporal (IMC) este parámetro que se emplea para su clasificación (Hensrud y Klein, 2006). La clasificación de la obesidad se muestra en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Clasificación de la obesidad y riesgo de enfermedad asociada (Hensrud y Klein, 2006).

Clasificación	IMC	Riesgo de enfermedad
Bajo de peso	< 18.5 kg/m ²	...
Normal	18.5- 24.9 kg/m ²	...
Sobrepeso	25.0-29.9 kg/m ²	Aumentado
Obesidad		
Tipo 1	30.0- 34.9 kg/m ²	Alta
Tipo 2	35.0- 39.9 kg/m ²	Muy alta
Tipo 3 (Obesidad Extrema)	≥40 kg/m ²	Extremadamente alta

El exceso de peso corporal (sobrepeso y obesidad) es reconocido como uno de los retos más importantes de salud pública en el mundo, dada su magnitud, rapidez de incremento y el efecto negativo que ejerce sobre la salud de la población que la padece; aumenta significativamente el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles (Secretaría de Salud, 2010).

La obesidad tipo II y III se asocian directamente con alteraciones metabólicas que predisponen al deterioro de la salud.

El sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo importantes de las enfermedades cardiovasculares, las cuales constituyen la primera causa de muerte, con más de 17 millones de defunciones anuales mundialmente. Antes se consideraba que este problema

sólo afectaba a los países ricos o con mayores recursos económicos, pero las estimaciones de la OMS, muestran que el sobrepeso y la obesidad están aumentando en forma considerable en los países de bajos y medianos ingresos (Organización Mundial de la Salud, 1999).

1.1.2 Etiología de la obesidad

La obesidad constituye uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo (Martorell et al., 1998). El tratamiento de la obesidad incluye modificaciones en el estilo de vida: menor consumo energético y aumento de la actividad física (Jakicic et al., 2005 y Avenell et al., 2006), y en algunos casos, medicamentos (Li et al., 2005 y Lean et al., 2006) o cirugía (Kral, 2006 y Bult et al., 2008).

La obesidad debe considerarse una condición multifactorial; genética, cultural, socioeconómica, conductual y de situaciones que juegan un papel importante en la alimentación y control de peso (Carek y Dickerson, 1999), así como el cambio generalizado de la dieta hacia un aumento del consumo de calorías, sales y azúcares, y la tendencia a la disminución de la actividad física ocasionada por el carácter sedentario del trabajo actual, el cambio de los medios de transporte y la creciente urbanización (Organización Mundial de la Salud, 1999).

Con el fin de conocer las prevalencias de algunos padecimientos, incluidas diversas enfermedades crónicas, en México, la Secretaria de Salud ha favorecido el levantamiento de varias encuestas nacionales de salud y nutrición; las cuales son: la ENEC 1993 (Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas 1993) (Secretaria de Salud, 1995), la ENSA 2000 (Encuesta Nacional de Salud 2000) (Olaiz et al., 2003) y la ENSANUT 2006 (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006) (Olaiz-Fernández et al., 2006).

La prevalencia de la obesidad en los adultos mexicanos revela un franco incremento a través de los años. La ENEC 1993, mostró que la prevalencia era de 21.2%; los datos de la ENSA 2000 expresaron que tenía obesidad 25.1% de los adultos en nuestro país, y en fecha más reciente, con mediciones obtenidas a partir de la ENSANUT 2006, se encontró que 31.3% de los adultos de ambos sexos son obesos (**Figura 1**). Sin embargo, entre las mujeres se registra un mayor porcentaje de obesidad, en comparación con los hombres, (**Figura 1**); en ellas ha sido mayor el incremento a través del tiempo (Secretaria de Salud, 1995, Olaiz et al., 2003 y Olaiz-Fernández et al., 2006).

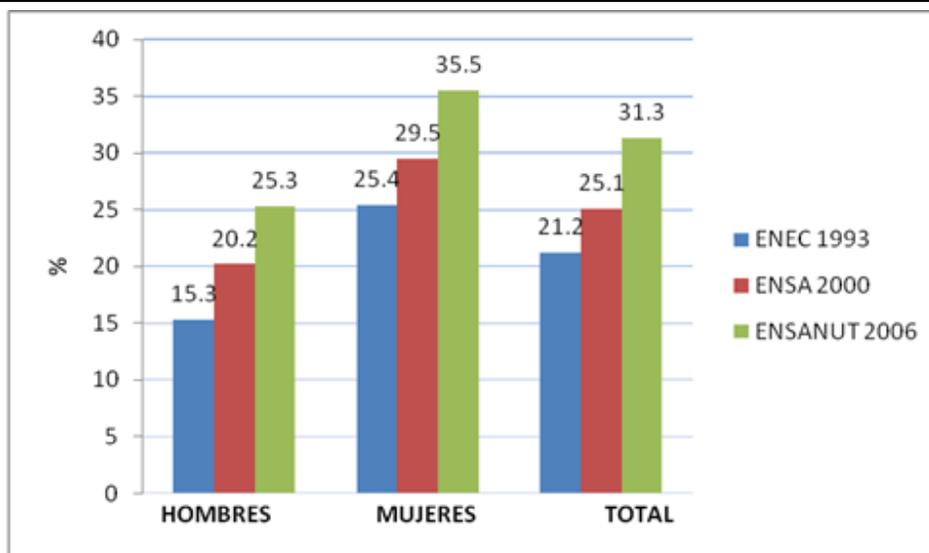


Figura 1. Prevalencia de obesidad en tres encuestas nacionales, por sexo.

Así mismo, cuando se analiza la presencia de obesidad en la población, se puede ver el aumento de este padecimiento conforme se incrementa la edad y en personas con una menor escolaridad, en los dos sexos y en las tres encuestas nacionales (Secretaría de Salud, 1995, Olaiz et al., 2003 y Olaiz-Fernández et al., 2006).

El aumento en el porcentaje de la obesidad en las últimas dos décadas permite catalogar a este padecimiento como un grave y preocupante problema de salud pública, vista su asociación con la aparición de enfermedades crónicas, incluyendo las cardiovasculares (Olaiz -Fernández et al., 2006).

1.1.3 Obesidad en México

Según los criterios de la OMS, el diagnóstico de la obesidad se establece con un IMC igual o mayor a 30kg/m². Sin embargo, la Norma Oficial Mexicana NOM-174-SSA1-1998 para el manejo integral de la obesidad, ha fijado puntos de corte diferente a los propuestos por las normas y consenso de otros países. La intención de promover estos puntos de corte es promover una conducta diagnóstica y terapéutica más temprana (García- García et al., 2010).

Además de la evaluación del IMC, es útil determinar la presencia de obesidad abdominal mediante la medición del perímetro de cintura, con un punto de corte sugerido para los hispanoamericanos (extrapolados de estudios asiáticos) por la Federación

Internacional de Diabetes: 90 cm en hombres y 80 cm en mujeres (International Diabetes Federation, 2006).

De 1980 a la fecha, la prevalencia de obesidad y sobrepeso en México se ha triplicado en particular en la población adulta ya que 39.5% de los hombres y mujeres tienen sobrepeso y 31.7% obesidad. Es decir, aproximadamente el 70% de la población adulta tiene un IMC inadecuado (superior a 25Kg/m²).

En México, la epidemia del sobrepeso y obesidad es un problema de gran magnitud en todos los grupos de edad ya que experimenta una gran velocidad de crecimiento (**Cuadro 2**). En el ámbito internacional existe evidencia suficiente para establecer la contribución de estas condiciones al desarrollo de enfermedades crónicas y su carga potencial a los sistemas de salud (Secretaría de Salud, 2010).

Cuadro 2. Población con sobrepeso y obesidad en México, 2006-2008 (Secretaría de Salud, 2010).

Grupo	Año		
	2006	2007	2008
Escolares (5 a 11 años)	4 158 800	4 203 765	4 249 217
Adolescentes (12 a 19 años)	5 757 400	5 930 799	6 109 420
Adultos (20 años o más)	41 142 327	41 678 669	42 222 003
TOTAL	51 058 527	51 813 233	52 580 639

Hoy en día, México ocupa el segundo lugar de prevalencia mundial de obesidad, después de los Estados Unidos de América. La epidemia implica costos significativos para el sistema de salud pública, para la sustentabilidad del régimen de pensiones y para la estabilidad económica y social de la población, especialmente de los sectores más pobres (Secretaría de Salud, 2010).

El incremento registrado en las cifras de sobrepeso y obesidad es resultado de diversos factores, entre los que destacan los cambios en el acceso y consumo de alimentos, así como los cambios drásticos en los estilos de vida en un tiempo relativamente corto (Secretaría de Salud, 2010).

En México, hemos pasado por un proceso en el cual se ha dejado de practicar la lactancia materna hasta los seis meses de vida y se han modificado las dietas y los

hábitos alimenticios, todo ello debido al crecimiento económico, urbanización, mayor esperanza de vida, incorporación de la mujer a la fuerza de trabajo, masificación de la producción de alimentos, abaratamiento de los precios relativos de los alimentos procesados versus los frescos (por economías de escala), transporte, conservación y almacenaje. Además, como factor clave ha disminuido la actividad física de la población (Secretaría de Salud, 2010).

Todo ello contribuye al “ambiente obesogénico” que actualmente se vive en muchos países del mundo, incluyendo México (Secretaría de Salud, 2010).

La prevalencia de obesidad en los adultos mexicanos revela un franco incremento a través de los años. El aumento en el porcentaje de la obesidad en las dos últimas décadas permite catalogar a este padecimiento como un grave y preocupante problema de salud pública. Ante ello, como sociedad tenemos que generar una reacción y adecuación a la nueva circunstancia (Secretaría de Salud, 2010).

1.1.4 Tratamiento

La prevalencia de la obesidad está aumentando a un ritmo alarmante, pero por desgracia, sólo un par de medicamentos se encuentran en uso clínico el orlistat y sibutramina a nivel mundial. Hoy en día existen cinco mecanismos de acción (**Cuadro 3**) para el tratamiento de este padecimiento (Hauner, 2001):

Cuadro 3. Principales mecanismos de acción de compuestos para la pérdida de peso (Hauner, 2001).

Efecto	Tipo de fármacos	Fármacos representativos
Reducción del consumo de alimentos o supresores de apetito	Fármacos noradrenérgicos	Fentermina (Retirada)
	Fármacos noradrenérgicos/serotoninérgicos	Sibutramina
	Fármacos serotoninérgicos	SSRI
	Fármacos dopaminérgicos	Ecopipam
	Neuropéptidos y otras hormonas	CCK, GLP-1, α -MSH, leptina, GLP-1, amilina

Cuadro 3. Continuación

Efecto	Tipo de fármacos	Fármacos representativos
Retardamiento del vaciamiento gástrico		
Reducción de la absorción de grasas y carbohidratos	Inhibidores de lipasa Inhibidores de amilasa	Orlistat Acarbose
Incremento de la energía o aumento de calor	Fármacos termogénicos Agonistas β 3- adrenérgicos	Efedrina, cafeína
La sustitución de grasas	Poliéster de sacarosa	Olestra

El mercado de los medicamentos antiobesidad, es potencialmente enorme, ya que representa del 2-6% de los costos totales de atención de salud en varios países desarrollados. El mercado de proliferación de estos medicamentos y la enorme suma de dinero en juego (3.7 millones de dólares en E.U.A. en el 2008), garantiza que la investigación en esta área de la terapéutica se realizará en un futuro próximo (Brirari y Bhutani, 2007).

Actualmente, los únicos fármacos aprobados en el tratamiento para la obesidad a largo plazo son el orlistat (Xenical[®]) y la sibutramina (Reductil[®]), aunque esta última fue retirada del mercado debido a sus efectos adversos por COFEPRIS en el 2010, estos fármacos pueden provocar una pérdida de peso de hasta el 10% cuando se ha combinado con una dieta y ejercicio (**Cuadro 4**) (Brirari y Bhutani, 2007). A pesar de que estos fármacos ayudan a la disminución de peso, en forma significativa, existe una gran necesidad de nuevos fármacos, que sean seguros y eficaces (**Cuadro 5**) (Weigle, 2003).

Cuadro 4. Fármacos para la obesidad (actuales) (Brirari y Bhutani, 2007).

Fármaco	Mecanismo	Compañía/ Laboratorio	Estatus
Rimonabant	Antagonista del receptor de cannabinoide CB-1	Sanofi-Aventis	Suspendido por EMEA (Europa) y COFEPRIS (México), 2008
Sibutramina	Inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina	Abbott laboratories	Aprobado por la FDA. Suspendido por COFEPRIS (México), 2010
Orlistat	Lipasa pancreática 1	Roche	Aprobado por la FDA

FDA (Agencia de Alimentos y Fármacos)

EMA (Agencia Europea de Medicamentos)

COFEPRIS (Comisión Federal Para la Protección contra Riesgos Sanitarios)

Cuadro 5. Medicamentos antiobesidad en tratamiento clínico

Clave	Mecanismo de acción	Compañía	Estatus
ATL-962 (cetilistat)	Inhibidor de la lipasa pancreática	Alizyme	Fase IIb
GT389-255	Inhibidor de la lipasa pancreática	Peptimmune	Fase I
APD356	Antagonista selectivo de 5HT _{2c}	Arena Pharmaceuticals	Fase II completa
SLV319	Antagonista del receptor CB1	Solvay Pharmaceuticals	Fase IIb
CP945 598	Antagonista del receptor CB1	Pfizer	Fase II
SR58611A	Antagonista del receptor β -adrenergico	Sanofi-Synthelabo	Fase IIa
L796568	Antagonista del receptor β -adrenergico	Merck	Fase II
Metreleptin	Modificación de leptina	Amgen	Fase II
Leptin	Receptor de leptina	Amgen	Fase II

Cuadro 5. Continuación

Clave	Mecanismo de acción	Compañía	Estatus
GI181771	Agonista CCK-A	GlaxoSmithKline	Fase II
Oleoyl estrone	No se conoce	Manhattan pharmaceuticals	Fase IIa
PYY(3–36)	Forma sintética del apetito Inhibición de la hormona PYY(3–36)	Nastech pharmaceutical	Fase II
TM30338	Neuropéptido Y2 y antagonista Y4	7TMPharma	Fase I/II
Pramlintide	Retrasos del vaciamiento gástrico	Amylin	Fase II
1426	Mecanismo periférico	Sanofi-Aventis	Fase IIa
CYT-009- GhrQb	Vacuna Ghrelin-targeted	Cytos Biotechnology	Fase I/II
AOD9604	Hormona del crecimiento humana	Metabolic pharmaceuticals	Fase IIb completa
P57	Supresor del apetito	Phytopharm	Fase II

1.1.4.1 Sibutramina

Farmacología

Este fármaco se desarrolló originalmente como un antidepresivo, ya que actúa a nivel nervioso central mediante la inhibición de la recaptura de monoaminas, por lo cual se incrementa la saciedad. La sibutramina también estimula la termogénesis, pero este efecto desempeña un papel secundario en la inducción de la pérdida de peso. Este fármaco presenta el efecto de primer paso, ya que se metaboliza en el hígado por el CYP-34A del citocromo P-450, lo que da como resultado dos metabolitos (M1 y M2) que son aún más potentes que el compuesto primario. La mayor parte del fármaco, así como sus metabolitos activos se excretan por el riñón (Padwal y Majumdar, 2007).

Efectos Secundarios

Los efectos más comunes son el insomnio, náuseas, sequedad de boca y constipación. A diferencia de la fenfluramina y la dexfenfluramina, el empleo de la sibutramina no se ha asociado con lesiones valvulares cardiacas o hipertensión pulmonar. La sibutramina se ha relacionado con discretas elevaciones de la tensión arterial y la frecuencia cardiaca. Por

estas razones, no se recomienda en pacientes con hipertensión arterial, enfermedad cardiovascular o historia de arritmias (Padwal y Majumdar, 2007).

1.1.4.2 Orlistat

Farmacología

El orlistat fue aprobado en 1998 como fármaco adyuvante en el tratamiento de la obesidad (García- García et al., 2010), actúa mediante la inhibición de las lipasas gástrica y pancreática, lo que provoca la disminución de la absorción intestinal de cerca de 30% de los lípidos provenientes de la dieta (Hauptman, et al., 1992).

Es un compuesto parcialmente hidratado derivado de lipstatina endógena producida por *Streptomyces toxytricini* (McNeely y Benfield, 1998).

El esquema de prescripción típico consiste en la administración de una cápsula de 120mg tres veces al día, con cada uno de los alimentos (García- García et al., 2010). Por otro lado a pesar de un aumento en la prevalencia de la obesidad en los EE.UU. desde la década de los noventas, han sido pocos los agentes antiobesidad aprobados por la FDA (Agencia de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de Norteamérica) (McNeely y Benfield, 1998).

La biodisponibilidad del fármaco es menor al 1%, ya que su absorción es muy pobre. La mayor parte de este fármaco se excreta por las heces sin metabolizarse (Padwal y Majumdar, 2007).

Efectos Secundarios

Los principales efectos secundarios atribuidos al orlistat son gastrointestinales, en particular esteatorrea e incontinencia fecal, que se presenta hasta en un 15 a 30% de los pacientes que lo utilizan en forma regular. Se recomienda, además, la suplementación de vitaminas liposolubles para evitar la deficiencia relacionada con el uso de este fármaco. Los efectos sistémicos son mínimos, pues el orlistat prácticamente no se absorbe (Padwal y Majumdar, 2007).

Mecanismo de acción

El orlistat es un inhibidor de las lipasas gastrointestinales, el cual tiene efecto farmacológico en el padecimiento de la obesidad, ya que previene la absorción intestinal de las grasas de la dieta ingerida (Hauptman, et al., 1992). La inhibición de la lipasa pancreática es uno de los mecanismos más estudiados, sin embargo, no existe un mecanismo de acción establecido, por lo que se ha propuesto la formación de un complejo estequiométrico covalente entre la enzima y el inhibidor (orlistat) de acil-enzima de larga vida, ya que se forma entre el anillo abierto de la β -lactona del orlistat y el centro catalítico de la enzima (serina 152) (**Figura 2**). Sin embargo, la inhibición de las lipasas en general, aún es poco conocido a nivel físico-químico (Tiss et al., 2009).

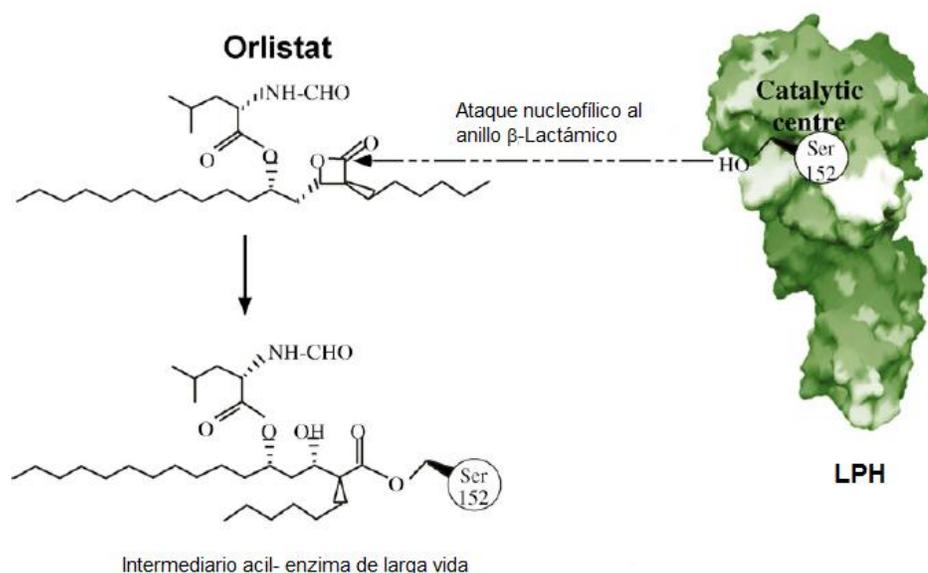


Figura 2. Esquema de la unión covalente entre el centro activo de la enzima serina (152) y el anillo β -lactámico del orlistat

Desde los primeros estudios *in vitro*, la inhibición de la lipasa pancreática porcina fue reportada como irreversible, mientras que la inhibición de la lipasa humana resultó ser reversible y no competitiva. Se observó que las sales biliares por encima de su concentración micelar crítica son necesarias para que el orlistat sea capaz de inhibir eficazmente la lipasa pancreática humana. El hecho de que el inhibidor puede ser reactivado por la reducción de la concentración de sales biliares por debajo de su concentración micelar crítica sugirió que, las sales biliares (por encima de su concentración micelar crítica) puede estabilizar el complejo acil-enzima (Tiss et al., 2009).

1.2 Lipasas

Las lipasas son enzimas que digieren las grasas, incluyendo los triglicéridos y los fosfolípidos. Las lipasas humanas incluyen la pre-duodenal (lingual y gástrica) y extra-duodenal (pancreática, hepática, lipoproteínas y endotelio).

Las lipasas fueron reconocidas como un grupo particular pertenecientes a las carboxilesterasas. Las lipasas y las esterasas fueron diferenciadas de acuerdo a la estructura química de los sustratos; ya que las lipasas catalizan la hidrólisis del glicerol y ácidos grasos de cadena larga, mientras que las esterasas hidrolizan el monoalcohol y ácidos grasos de cadena corta (Chapus et al., 1988).

La lipasa pancreática es la principal enzima lipolítica sintetizada y excretada por el páncreas, desempeñando un papel clave en la digestión de los triglicéridos, ya que es la responsable de la hidrólisis del 50-70% del total de las grasas de la dieta diaria. **La Figura 3** muestra el papel fisiológico de la lipasa pancreática. (Carek y Dickerson, 1999).

Es bien sabido que las grasas no se absorben directamente en el intestino a menos que se haya sometido a la acción de las lipasas. Los dos principales productos formados por la hidrólisis de las lipasas son los ácidos grasos y el 2-monoacilglicerol. Estos productos lipolíticos son dispersados y mezclados en micelas que contienen sales biliares y fosfatidilcolina biliar, para ser transportados al sitio de absorción de las grasas. La absorción de los lípidos se da en la parte apical de la membrana plasmática de las células epiteliales o enterocitos epiteliales del intestino. En general, los ácidos grasos con longitudes inferiores a 14 átomos de carbono entran directamente en el sistema portal y son transportados hacia el hígado, mientras que los de 14 o más átomos de carbono se vuelven a esterificar dentro del enterocito y entran en circulación a través de la ruta linfática en forma de quilomicrones. Las vitaminas liposolubles (vitaminas A, D, E y K) y el colesterol son liberados directamente en el hígado como una parte de los restos quilomicrónicos. (Tsuji et al., 2007; Mesa et al., 2006).

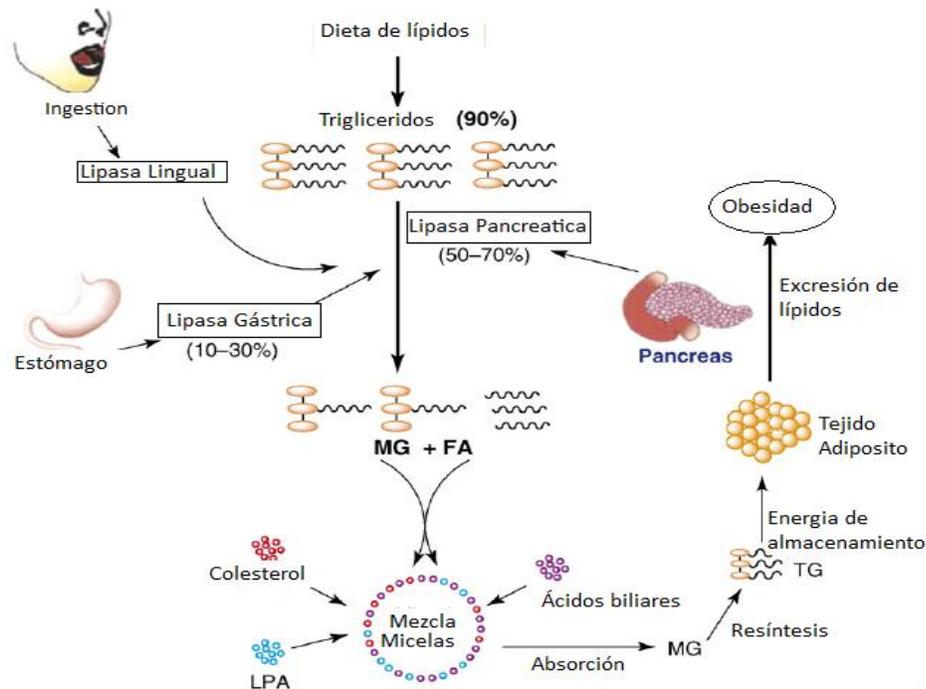


Figura 3. Papel fisiológico de la lipasa pancreática en la absorción de los lípidos (Birari y Bhutani, 2007).

Las grasas de la dieta (90%) son generalmente mezclados con triglicéridos (TG) y tienen la obligación de ser hidrolizados para su absorción. De las diferentes lipasas, la lipasa pancreática es la encargada del 50-70% de la hidrólisis de las grasas a sus respectivos ácidos grasos (FA) y monoacilglicéridos (MG). El MG y FA libres, forman micelas mixtas con las sales biliares, el colesterol y el ácido lisofosfatídico (LPA) y son absorbidos por los enterocitos, donde se lleva a cabo la resíntesis en el tracto gastrointestinal (TG).

La estructura tridimensional de la lipasa pancreática humana se determinó por cristalografía de rayos x. Se estableció mediante clones de cDNA aislada de una biblioteca del páncreas humano y así fue posible comprobar que se trata de una glicoproteína de 449 aminoácidos. La proteína codificada muestra un 86% y 68% de homología con la especie de lipasa pancreática porcina y lipasa pancreática canina respectivamente. En la **Figura 4** se muestra la estructura primaria de la lipasa pancreática porcina (Carek y Dickerson, 1999).

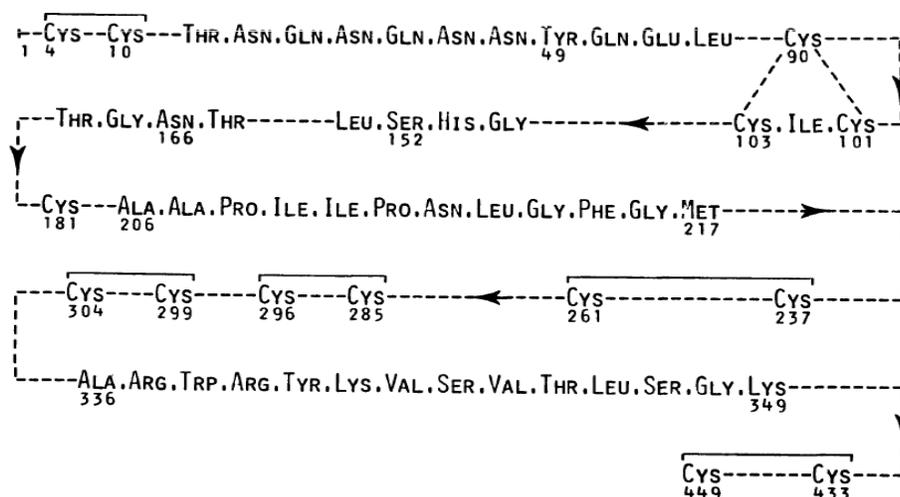


Figura 4. Estructura primaria de lipasa porcina

La lipasa pancreática porcina se aisló por primera vez en 1955, mediante el uso de varias técnicas tales como el fraccionamiento de proteínas por sales y precipitación con solventes o electroforesis de zona. Se incrementó la actividad enzimática mediante su purificación y el aumento de las concentraciones del sustrato (Chapus et al., 1988).

1.2.1 Actividad enzimática

Las lipasas son a menudo analizadas por su acción catalítica sobre los triglicéridos por medio de una reacción heterogénea de agua y aceite. Se debe tener especial cuidado en el momento de la interpretación de las mediciones cinéticas. Dado que el medio es heterogéneo, la adición de cualquier compuesto anfifílico tendrá efectos en la interface y a menudo en la enzima. Es por ello que ha quedado establecido que la calidad de los lípidos en agua (en términos de la orientación y conformación de moléculas, formas de las películas, densidad superficial de carga, la tensión interfacial, la viscosidad de la superficie etc.) es uno de los parámetros más decisivos cuando se trabaja con enzimas lipolíticas. Eso lamentablemente significa que las comparaciones válidas sólo pueden hacerse entre los datos obtenidos en condiciones estrictamente idénticas (de preferencia obtenida de un mismo laboratorio). Es por ello que los datos sobre la actividad de las lipasas obtenidas de diferentes fabricantes por lo general no se pueden comparar. Por razones prácticas se presenta el **Cuadro 6** que ofrece una visión general de los principales métodos utilizados en el análisis de las lipasas (Schmid y Verger, 1998).

Cuadro 6. Métodos analíticos para determinación de lipasas (Schmid y Verger, 1998).

Método	Principio	Ventajas	Desventajas
Potenciométrico	Determinación potenciométrica de los ácidos grasos liberados por hidrólisis	Método continuo cinético para la determinación de los valores iniciales.	<ul style="list-style-type: none">• Equipo caro• Los emulsionadores añadidos a menudo modifican las condiciones de reacción• No aplicable en condiciones de pH ácidas
Titulación	Valoración de los ácidos grasos liberados después de la exposición a la actividad de la lipasa	Simple	<ul style="list-style-type: none">• No hay datos cinéticos continuos
Colorimétrico	Liberación de un grupo éster sintético (por ejemplo p-nitrofenil palmitato)	Medidas cinéticas rápidas y automáticas	<ul style="list-style-type: none">• Sustratos artificiales
Determinación de la hidrólisis de lípidos en la difusión de películas en la interface aire/agua	Hidrólisis de la monocapa de lípidos en la superficie a presión constante con un suministro continuo de sustrato	Medidas cinéticas en ausencia de la adición de un emulsionador controlado bajo calidad interfacial	<ul style="list-style-type: none">• Equipo costoso• Mucho tiempo

Debido a las dificultades encontradas sobre el uso de ésteres insolubles en agua para poder determinar la actividad de la lipasa, se han desarrollado métodos de ensayos utilizando como sustratos al p-nitrofenol y/o ésteres β -naftol, al tween (sorbitol y esteres de ácidos grasos de cadena larga), la triacetina, la tripopionina, etc. Sin embargo, dichos

ensayos se han utilizado en los primeros estudios sobre la lipasa pancreática, en particular en los estudios para purificar la enzima (Chapus et al., 1988).

1.2.1.1 Método analítico colorimétrico para la determinación de la actividad de las lipasas

De los métodos analíticos para valorar la actividad de las lipasas, (**Cuadro 6**), el colorimétrico se basa en el uso de sustratos cromogénicos como lo son los ésteres de p-nitrofenilo (acetato, caprilato, palmitato, propionato), que son ampliamente utilizados para la determinación de esterasa y actividad enzimática de la lipasa (Margesin et al., 2002). Este método de acuerdo con Lee et al. (1993) se ha optimizado para el ensayo de actividad de la lipasa. La reacción que se lleva a cabo es la hidrólisis del éster cromogénico (palmitato de p-nitrofenilo), por medio de la lipasa pancreática, liberando el producto p-nitrofenol el cual presenta una coloración amarilla, cuyo producto es cuantificado. Dicha reacción se encuentra representada en la **Figura 5** (Dolenc et al., 2010).

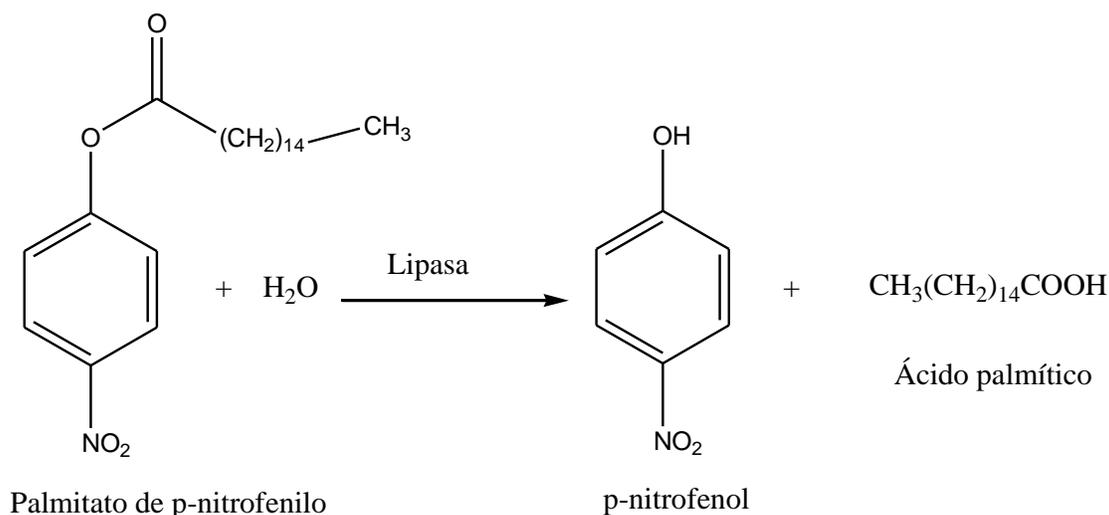


Figura 5. Hidrólisis del palmitato de p-nitrofenilo en p-nitrofenol por acción de la lipasa pancreática.

Los lípidos se absorben a partir de la dieta gracias a la acción de las enzimas (lipasas); debido a esto, la inhibición de las lipasas se ha considerado un blanco farmacológico importante para el control de la obesidad, en el mecanismo de acción de inhibición no participa el sistema nervioso central, ya que el consumo excesivo de lípidos en la dieta a largo plazo contribuye al desarrollo de la obesidad. La investigación de frutos y plantas

medicinales son blancos de nuevas fuentes para que se produzca la inhibición de la lipasa pancreática (Slanc, et al., 2009).

1.3 Productos naturales

En general, algunos de los materiales provenientes de derivados de plantas o brebajes, que se venden comúnmente para tratar malestares contienen sustancias que pueden ser aisladas, probadas y verificadas; para tratar problemas específicos. Sin embargo existe una gran mistificación en torno al uso de los “tratamientos tradicionales” y “tratamientos herbales” no divulgados, sobre todo en el caso de la obesidad, en la que la falta de veracidad deja una puerta abierta a la fe de los curanderos y vendedores de tratamientos contra la obesidad. (Fernández et al., 2002). Es por ello que los metabolitos identificados a partir de plantas medicinales presentan una gran oportunidad para el desarrollo de nuevas terapias (Carek y Dickerson, 1999).

La Fitoterapia de hoy aprovecha los conocimientos amplios sobre los principios activos encontrados en las plantas, ya sea en relación a sus características químicas o farmacológicas; para posteriormente encontrar fórmulas que mantengan las características de interés en las plantas (Moro y Basile, 2000).

Como parte de la búsqueda continua de agentes biológicamente activos para tratar la obesidad, diversas plantas han sido seleccionadas para encontrar inhibición sobre la actividad de las lipasas. Alrededor de la mitad de todas las sustancias de origen natural tuvieron éxito en los ensayos clínicos realizados a finales de la década de los noventa, lo que muestra que dichas sustancias no han sido investigadas a fondo; sin embargo nos da una idea de que se pueden obtener fármacos provenientes de diversas plantas (Birari y Bhutani, 2007).

Existe una literatura amplia en la que se demuestra que existe progreso respecto al conocimiento de los bioactivos que se encuentran presentes en los alimentos vegetales y su relación con la obesidad (Rayalam et al., 2008). Las plantas que contienen inhibidores de lipasas incluyen a las especies *Cassia mimosoides*, *Camelia sinensis*, *Dioscorea nipponica*, *Platycodon grandiflorum*, *Salix matsudara* y *Scabiosa tschiliensis* (Moreno et al., 2006; Won et al. 2007). Muchos metabolitos de microorganismos contienen inhibidores de lipasas, dentro de los cuales se incluyen la lipstatina endógena producida por *Streptomyces toxytricini*, pancligin aislado de *Streptomyces* sp. NR0619, valilactona y

ebelactonas extraídos de *Streptomyces albolongus*, esterastina obtenida de *Streptomyces lavendulae*, caulerpenina obtenida de *Caulerpa taxifolia*, vibrilactona obtenida de *Boreostereum virans* y perciqinina aislada de *Basidiomycete stereum complicatum*, entre otros (Won, 2010).

En los ensayos clínicos, la inhibición de la lipasa suprimió el aumento de peso en los pacientes obesos, por la reducción en la absorción de las grasas de la dieta (Won et al. 2007).

1.3.1 Plantas para el tratamiento de la obesidad

El reino vegetal se ha considerado como una fuente de sustancias que contribuyen al control del sobrepeso y la obesidad. En México se destaca el uso de algunas plantas medicinales para el control del sobrepeso, entre ellas destaca el codo de fraile (*Thevetia thevetoides*) así como la Tlanchalagua (*Hypericum silenoides*). En el **Cuadro 7** se presentan algunas plantas utilizadas en el tratamiento de la obesidad (Moro y Basile, 2000 y Hersch 1999).

Cuadro 7. Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento para la obesidad

Planta medicinal	Nombre común	Indicación terapéutica
<i>Betula alba</i> L. (Betulaceae)	Abedul	Celulitis, hipertensión
<i>Camellia thea</i> Link. (Theaceae)	Té verde	Obesidad, celulitis, alteraciones del metabolismo de proteínas
<i>Carica papaya</i> L. (Caricaceae)	Papaya	Obesidad, celulitis, problemas digestivos
<i>Citrus aurantium</i> L. (Rutaceae)	Azahar	Obesidad
<i>Fucus vesiculosus</i> L. (Fucaceae)	Sargazo (Alga marina)	Obesidad y celulitis
<i>Garcinia cambodia</i> Desr. (Clusiaceae)	Tamarindo malabar	Obesidad, alteración de lípidos y glucosa
<i>Hydrocotyle asiatica</i> L.	Centella asiática	Celulitis, fragilidad capilar
<i>Hypericum silenoides</i>	Tlanchalagua	Control de peso
<i>Ortosiphon stamineus</i> Benth	Ortosifón	Obesidad y mantenimiento de peso

Cuadro 7. continuación

Planta medicinal	Nombre común	Indicación terapéutica
<i>Paullinia sobilis</i> Mat. (Sapindaceae)	Guaraná	Obesidad
<i>Plantago ovata</i> Forks. (Plantaginaceae)	Plantago	Obesidad, estreñimiento
<i>Taraxacum officinale</i> Weber. (Asteraceae)	Amargón (Diente de León)	Celulitis, alteraciones en el metabolismo de lípidos y glucosa
<i>Thevetia thevetoides</i>	Codo de fraile	Obesidad, cardiotónico

1.3.1.1 Adelfas

Las adelfas son arbustos verdes que contiene una flor perteneciente a la familia Apocynaceae. Las adelfas crecen en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Son ampliamente cultivadas como ornamentales y son capaces de alcanzar de 6 a 9 metros de altura. Las adelfas pueden producir flores de diversos colores durante todos los meses de verano. Todas las partes de las adelfas son venenosas para el hombre, animales y ciertos insectos; sin embargo, a pesar de su toxicidad las adelfas se han utilizado como método abortivo, para el tratamiento de la hidropesía, la lepra, la malaria, la tiña, la indigestión, enfermedades venéreas e incluso como instrumento de suicidio. Los componentes de la adelfa responsables para ejercer efectos cardiotónicos son los glucósidos cardiacos, que son de particular importancia para la toxicidad de la adelfa. Los agentes cardioactivos se encuentran dentro de la adelfa, como por ejemplo los mostrados en la **Figura 6**, son compuestos esteroideos capaces de ejercer efectos farmacológicos sobre el músculo cardiaco; en otras palabras son capaces de ejercer un efecto tónico sobre el corazón (Ibiyemi et al., 2002).

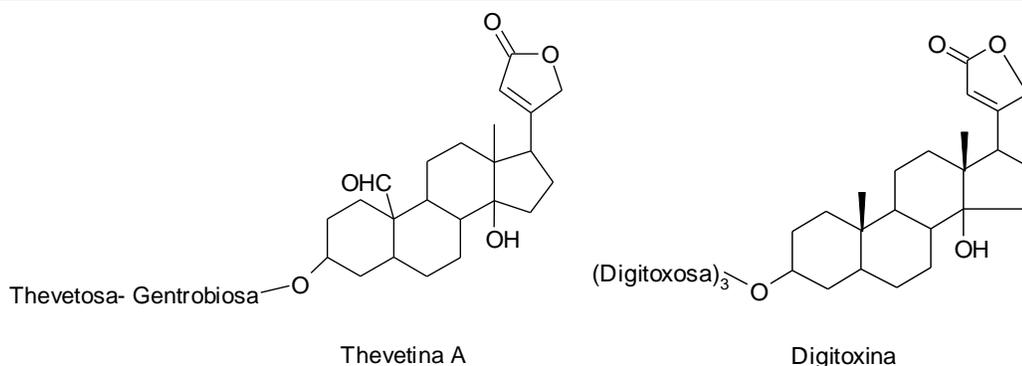


Figura 6. Estructura química de dos glucósidos cardiacos

Las adelfas amarillas son las especies de *Thevetia*, por ejemplo *T. thevetioides* y *T. neriifolia*, son abundantes en México y en particular la última también se encuentra en varias partes del mundo. Las semillas de estas plantas contienen un alto contenido de triglicósidos cardenólidos, principalmente thevetina A y B, así como acetilados o derivados oxidados de estos. La hidrólisis por la enzima endógena de la planta da como resultado la mezcla de monoglicósidos, que consiste principalmente en nerifolina, (**Figura 7**), monoacetato de nerifolina y otros compuestos. En principio estos componentes podrían servir como fuentes para digitoxigenina, pero por la ruptura de los enlaces glicósídicos de los α -L-thevetosidos no ha permitido lograr un rendimiento satisfactorio ya sea por métodos químicos o enzimáticos. La digitoxigenina es de importancia ya que sirve como punto de partida para la síntesis de cardenólidos modificados (Cruz et al., 1977).

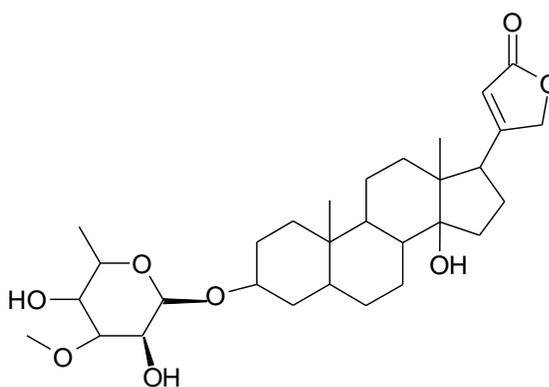


Figura 7. Estructura química de Nerifolina

La *Thevetia peruviana* es nativa de América tropical, proveniente de la familia Apocynaceae (Ambang et al., 2010), se distribuye a lo largo de todo México (Martínez et al., 2002). Esta planta contiene un alto contenido de aceite de semilla (60 a 65%), además

de un alto valor proteico (30 a 37%) (Omolar e Ibiyemi, 2007). La ingestión de las semillas (**Figura 8**) produce un cuadro clínico muy parecido al que se produce por la intoxicación de digoxina (vómito, mareo, bradicardia y bloqueo aerovenricular (Martínez et al., 2002; Omolar e Ibiyemi, 2007). Se han reportado varios intentos por reducir la cantidad de glucósidos cardiacos en la semilla; dentro de los cuales se incluye la esterilización en seco y húmedo y, la fermentación, aunque sin mucho éxito (Omolar e Ibiyemi, 2007). Se han reportado fatales envenenamientos en diversas partes del mundo; sin embargo, en México la semilla de la *Thevetia peruviana* es utilizada para reducir el peso corporal. El uso empírico se relaciona con numerosas intoxicaciones con consecuencias fatales (Martínez et al., 2002). Sin embargo, es posible que la atención prestada a las toxinas haya distraído el interés de la investigación hacia el aceite y las proteínas (Ibiyemi et al., 2002).



Figura 8. Semillas de *Thevetia*

1.3.1.1.1 Thevetia thevetioides

Esta planta pertenece a la familia Apocynaceae (Ambang et al., 2010), se presenta como un arbusto o árbol de 3 a 9 m de altura, con jugo lechoso; el tallo es color gris. Las hojas son angostas y miden hasta 15 cm de largo (Monroy y Castillo, 2007). Las flores son amarillas y aparecen en racimos que tienen pocas flores (**Figura 9**). Los frutos son de tamaño mediano y tienen una semilla café claro (McLaughlin et al., 1980).



Figura 9. Flor de *Thevetia thevetioides*

Esta planta es originaria de América central tropical, habita en lugares de clima cálido, en donde se le cultiva en huertos familiares y solares (Monroy y Castillo, 2007). Entre sus nombres comunes se encuentran cabalonga, calaverita, codo de fraile, huevos de gato, venenillo, yerba de yoyota y *yoyotli*.

En cuanto a la parte química se conoce muy poco de esta planta (UNAM, 2010). Feedelman et al. reportó en 1979 que los extractos metanólicos de las semillas de una planta mexicana amarilla, *Thevetia thevetioides* eran mortales cuando eran incorporadas en la dieta (McLaughlin et al., 1980).

La toxicidad de la planta *Thevetia* en animales superiores, incluyendo humanos, se encuentra bien documentada y es atribuida a sus constituyentes químicos entre los que se encuentran heterósidos cardiotónicos (thevetósidos: thevetina), sobre todo en semillas y latex (Waizel, 2007) y a los glucósidos cardiotónicos, cuya aglicona esteroideal es digitoxigetina. (McLaughlin et al., 1980).

1.3.1.2 Género *Hypericum*

Este género pertenece a la familia de *Hypericaceae*. Plantas herbáceas anuales o perenne, o bien arbustivas, rara vez arborescentes; tallos glabros con pelos simples; hojas opuestas o en ocasiones verticiladas, sésiles o cortamente pecioladas, con glándulas transparentes de color amarillo o bien las glándulas oscuras en la superficie y

en los márgenes; inflorescencias en forma de cimas terminales o axiliares o bien, reducidas a una sola flor, pedicelos, brácteas y bacterolas presentes; sépalos 5, ocasionalmente 4 desiguales, imbricados o valvantes, de color amarillo, rojo o anaranjado, a menudo con estrías rojas, punteados con glándulas amarillas o negras (Rodríguez, 1996).

El género comprende aproximadamente 400 especies bien representadas en regiones templadas y subtropicales del mundo. Son organismos que se adaptan a diversos medios ecológicos, algunos se cultivan como plantas de ornato, comportándose como otras malezas de relativa agresividad (Rodríguez, 1996).

Hypericum perforatum también llamada hierba de San Juan, está ampliamente distribuida en Europa, Asia, Norte de África y Norteamérica. *Hypericum perforatum* es ampliamente utilizada para el tratamiento de desórdenes del sistema nervioso central, el potencial antidepresivo de *Hypericum* es aceptado científicamente (Kumar et al., 1999). Actualmente se ha establecido una estrecha relación entre el tratamiento prolongado de antidepresivos sintéticos con el incremento de sobrepeso u obesidad. Se ha reportado un incremento de riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, al emplear antidepresivos sintéticos (Kivimäki et al., 2010). Husain et al. reportó que el extracto de *Hypericum perforatum* presenta actividad hipoglucémica significativa en ratas diabéticas (Husain et al., 2008 y Husain et al., 2009). En otro estudio se demostró que el extracto hidroalcohólico de *Hypericum perforatum* disminuye la ganancia de peso corporal, parámetros séricos (colesterol total, LDL- colesterol, triglicéridos, glucosa e insulina) e incrementa HDL- colesterol en ratas alimentadas con fructuosa y una dieta rica en grasas. *Hypericum perforatum* puede ser utilizado por pacientes que padecen obesidad y diabetes (Husain et al., 2011).

1.3.1.2.1 Hypericum silenoides

Esta planta pertenece a la familia Clusiaceae, sus nombres comunes son hipérico, h'antun wamal, sanguinaria, taxinoxihuitl, tenchalita, tlanchalahua. Es una planta herbácea generalmente perenne, a veces anual de 4 a 60 cm de alto; tallos cuadrangulares, erectos o decumbentes, ramificados desde la base, en ocasiones rojizos o con manchas de color rojo, entrenudos de 1.5 a 3 cm de largo; hojas sésiles, linear-lanceoladas u oblongo-lanceoladas, margen entero a veces incurvado, en formas variables en forma y densidad, delgadas; inflorescencias en forma de cimas terminales compuestas con 3 a 15 flores ;

pétalos amarillo o anaranjados con algunos tintes rojizos, una imagen de esta planta se encuentra en la **Figura 10** (Rodríguez, 1996).



Figura 10. *Hypericum silenoides*

Es un elemento propio de bosques de coníferas y de encino; frecuentemente en claros o en la vegetación secundaria derivada; también en zonas fangosas. Esta especie se distribuye en regiones montañosas húmedas, siguiendo las grandes cordilleras americanas desde México hasta Argentina. Es una planta frecuente y sin problemas de supervivencia desde hace 20 años (Rodríguez, 1996).

Fuera del estudio botánico de esta planta, se presume que tiene una reputación medicinal (Rodríguez, 1996).

1.3.1.2.2 Hypericum philonotis

Planta herbácea anual o perenne, erecta, de 7 a 60 cm de alto; tallos ramificados desde la base, cuadrangulares, rojizos, entrenudos de 0.2 a 2.5 cm de largo; hojas sésiles u oblongas, de 0.9 a 2.5 cm de largo por 0.2 a 1 cm de ancho, ápice obtuso, base cuneada, margen entero; inflorescencia en forma de cimas compuestas, con 5 a 30 flores, pedicelos de 1 a 4 mm de largo; sépalos lanceolados u oblongos, de 1.5 a 6 mm de largo, desiguales; pétalos amarillos o anaranjados, oblanceolados, de 2.5 a 4 mm de largo; estambres 5 a 9, libres; cápsula cilíndrica a elipsoide, rojo- púrpura; semillas cilíndricas de

0.3 a 0.6mm de largo, de color café, con estrías longitudinales difusas (**Figura 11**) (Rodríguez, 1996).

Especie distribuida en centro y sur de México, también registrada en Honduras. Es una planta común, sobre todo en el norte de Michoacán, sin problemas de supervivencia en la actualidad (Rodríguez, 1996).



Figura 11. *Hypericum philonotis*

1.3.1.3 Género Valeriana

El género valeriana, perteneciente a la familia Valerianaceae, tiene más de 200 especies distribuidas en todo el mundo. Las especies del género valeriana tienen propiedades sedantes, antiespasmódicas y ansiolíticas debido principalmente a la presencia de iridoides, ésteres conocidos como valepotriatos presentes en las raíces y los rizomas (Houghton, 1988).

1.3.1.3.1 Valeriana edulis ssp. procera

Valeriana edulis ssp. procera, conocida como valeriana mexicana, es una subespecie endémica de México (Estrada- Soto et al., 2010). Es una herbácea perene; raíz gruesa

con bifurcaciones (**Figura 12**). Se presenta en bosque de encino, bosque de coníferas, pastizales y ocasionalmente como planta ruderal o maleza (Manzanero-Medina et al., 2009). Los análisis fitoquímicos han demostrado la presencia de valepotriatos, de los cuales el valtrato es tal vez el compuesto más importante de este grupo (Estrada- Soto et al., 2010). Los estudios farmacológicos y clínicos han validado la actividad biológica de esta planta (Herrera- Arellano et al., 2001). Usualmente las raíces contienen la mayor cantidad de valepotriatos y se ha descrito que la *Valeriana edulis ssp procera* contiene el mayor contenido de valepotriatos, encontrándose entre 8 y 12% (Bos et al., 1996).



Figura 12. Raíz de *Valeriana edulis ssp. procera*

1.3.1.3.1.1 Valepotriatos

Los valepotriatos son productos naturales que desde un punto de vista químico son terpenos con esqueleto furanopiranoide, que poseen un esqueleto básico de 10 carbonos, y se encuentran en un gran número de familias de plantas, a menudo en forma glicósida (Bos et al., 2002).

Los valepotriatos pueden contener un doble enlace en uno de los anillos como en el dihidrovaltrato (**Figura 13**) o dos dobles enlaces en los dos anillos como el valtrato (**Figura 13**). El ácido isovalerico generalmente está formando ésteres con el anillo de los valepotriatos. Dicho éster se hidroliza fácilmente, dando como resultado el olor característico de la valeriana seca (Bos et al., 1996).

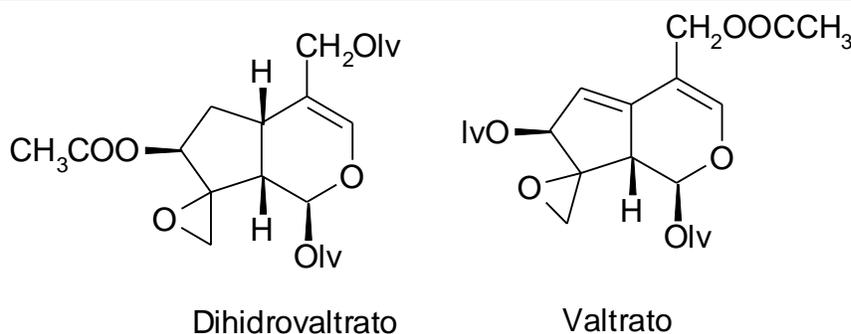


Figura 13. Estructuras químicas de los valepotriatos

Estos compuestos son muy inestables, ya que son termolábiles (Navarrete et al., 2006); y se descomponen fácilmente bajo condiciones de acidez o alcalinidad, así como en soluciones alcohólicas (Bos et al., 2002). Por otra parte en estudios *in vitro*, se ha encontrado que estos compuestos son citotóxicos, carcinógenos y mutagénicos (Bos et al., 2002).

Déciga-Campos et al. (2007) reportó que el extracto de diclorometano-metanol (1:1) de *Valeriana edulis ssp. procera* provocan mutagenicidad a concentraciones mayores a 500µg/mL, ya que por debajo de esta concentración no se observó un efecto mutagénico significativo, el cual se atribuyó a la presencia de valepotriatos, demostrándolo en el ensayo realizado de una tintura hidroalcohólica, en la cual los valepotriatos estaban en bajas concentraciones debido a su baja solubilidad e inestabilidad, que no fue capaz de generar la mutación en las bacterias (Déciga-Campos et al., 2007).

Por todo lo anterior no se consideran como base de fitomedicamentos, ya que al descomponerse rápidamente en el tracto gastrointestinal no llegarían a tener un efecto terapéutico (Bos et al., 2002).

1.3.1.4 *Ligusticum porteri*

El nombre más común de *Ligusticum porteri* es Osha, raíz de oso, chuchupate. Es una hierba perene que crece de 50 a 100 cm de alto en los bosques surestes y centrales de las montañas rocallosas en América y en el norte de la Sierra Madre Occidental en México. En invierno, las partes superiores de la planta, se secan dando raíces fuertemente aromáticas. Sus hojas son divididas de forma irregular, que van de 0.5 a 4 cm, desde la base de las hojas. Sus flores blancas aparecen al final del invierno; son de

aproximadamente de 0.2 a 0.5 cm de diámetro con 5 pétalos. Sus frutos rojizos, oblongos, de 0.5 a 0.8 cm de longitud (Linares et al., 1987)

Es muy empleada por los indios Tarahumaras. Sus raíces han sido usadas en varias preparaciones (tinturas, infusiones o té) y son tomadas internamente para el tratamiento de catarro, resfriados, tos, neumonía, gripe y otras infecciones respiratorias. Así como, para aliviar dolores de estómago, diarrea y otros desordenes gastrointestinales. Además, las raíces pulverizadas son aplicadas tópicamente para prevenir infecciones (Appelt et al., 1985).

La actividad biológica que se atribuye a *L. porteri* ha sido investigada a través de sus extractos y compuestos. Uno de sus metabolitos el Z-3-butilidenftalida mostró un efecto antihiperlipémico por la inhibición de la actividad intestinal de las α -glucosidasas *in vivo* e *in vitro*. Z-6,6a,7,3aR-diligustilida (**Figura 14**) y Z-ligustilida, a pesar de no afectar a las α -glucosidasas *in vivo* afecta la absorción de la glucosa por un mecanismo aun no determinado (Brindis et al., 2000).

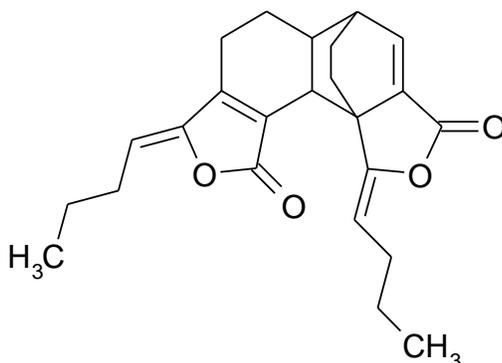


Figura 14. Estructura química de la diligustilida

La Z-ligustilida ha mostrado poseer propiedades anticolinérgicas, antibacteriales, antifúngicas y ser activo contra el asma e inflamación. Además de mostrar fitotoxicidad, ser relajante muscular, tener propiedades vasodilatadoras, también se le han observado propiedades débiles como antiviral, y actividad contra bacterias gram-negativas y otros microorganismos (Cégiéla-Carlio et al., 2005).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prevalencia del sobrepeso y la obesidad se han incrementado en todo el mundo tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo (Neovius y Narbro, 2008); sin embargo, su carácter multifactorial y su reversibilidad no dependen exclusivamente del paciente sino del involucramiento de todos los sectores de la sociedad para lograr los cambios necesarios en los distintos niveles. Para algunos tipos de obesidad es indispensable el tratamiento farmacológico, que actualmente es limitado. Una alternativa al tratamiento farmacológico para tratar la obesidad son las plantas medicinales. *Hypericum silenoides*, comúnmente llamada Tlanchalagua y *Thevetia thevetioides* (codo de fraile) son empleadas en la medicina tradicional Mexicana para la pérdida de peso, sin que existan bases científicas que sustenten este uso.

Adicionalmente, en estudios previos se sugiere que el género *Hypericum* puede ser utilizado en el tratamiento de la obesidad, ya que se encontró que el extracto hidroalcohólico de *Hypericum perforatum* disminuye el peso corporal, así como también disminuye los parámetros lipídicos como colesterol LDL y triglicéridos, sin determinar el tipo de mecanismo a través del cual se realiza. Por lo que se consideró importante el estudio de la inhibición de la lipasa pancreática porcina de las especies de *Hypericum silenoides* e *Hypericum philonotis*, para así sugerir el posible mecanismo de acción de los extractos obtenidos a partir de estas plantas, y por lo tanto dar un paso en el avance científico que sustente su uso tradicional.

Si bien la *Thevetia thevetioides* está catalogada como una planta tóxica, nunca antes se ha investigado el efecto sobre la inhibición de lipasas. Por otro lado, hay un hecho real que las personas la utilizan y se refieren una disminución en el peso corporal, por lo que se considera que pueden estar presentes compuestos muy potentes que inhiban a las lipasas, impidiendo la absorción de lípidos de la dieta y por lo tanto controlando el peso corporal; sugiriendo que el mecanismo de acción por el cual actúa, es por medio de la inhibición de lipasa pancreática.

Existen productos naturales en cuya estructura contienen un anillo químico reactivo, como lo son los valepotriatos presentes en la planta *Valeriana edulis ssp. procera*, la diligustilida y la nerifolina, con lo cual se podría formar un enlace covalente con la enzima

teniendo la capacidad de inhibir a la lipasa pancreática, de forma similar al mecanismo de acción presentado por el orlistat y por lo tanto sugerir que estos grupos reactivos sean un blanco farmacológico en la inhibición de la lipasa pancreática en el tratamiento de la obesidad.

En este trabajo se pretende abordar el estudio de diferentes extractos de *Hypericum silenoides*, *Hypericum philonotis*, *Thevetia Thevetioides* y *Valeriana edulis ssp procera*, así como de la diligustilida y la nerifolina, compuestos aislados de *Ligusticum porteri* y *Thevetiha thevetioides* respectivamente, como agentes inhibitorios de la actividad de la lipasa pancreática porcina en un modelo *in vitro*.

III. HIPÓTESIS

Hypericum silenoides, *Hypericum philonotis* y *Thevetia thevetioides* son plantas que se utilizan tradicionalmente en el tratamiento del sobrepeso y la obesidad; posiblemente su mecanismo farmacológico sea a través de la inhibición de la lipasa pancreática.

Adicionalmente, los valepotriatos presentes en *Valeriana edulis ssp procera*, los compuestos puros diligustilida y nerifolina son estructuras químicas que poseen grupos funcionales altamente reactivos que pueden inhibir a la lipasa pancreática formando un enlace covalente.

IV. OBJETIVO GENERAL

Valorar las propiedades inhibitorias de lipasas de los extractos crudos de *Thevetia thevetioides*, de las partes aéreas de *Hypericum silenoides* e *Hypericum philonotis* en un sistema *in vitro* utilizando como sustrato el palmitato de p-nitrofenilo y proporcionar las bases científicas que sustentan el uso tradicional de estas plantas.

Valorar las propiedades inhibitorias de lipasas de los extractos crudos de la raíz de *Valeriana edulis ssp procera*, los compuestos diligustilida y nerifolina, en un sistema *in vitro* utilizando como sustrato el palmitato de p-nitrofenilo.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

Validar el método basado en la hidrólisis de palmitato de p-nitrofenilo.

Determinar la concentración inhibitoria cincuenta (CI_{50}) de los extractos de *Thevetia thevetioides*, *Hypericum silenoides*, *Hypericum philonotis* y *Valeriana edulis ssp. procera*, así como de los compuestos puros diligustilida y nerifolina por el método basado en la hidrólisis de palmitato de p-nitrofenilo por la lipasa porcina.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal

Hypericum silenoides fue adquirida en el mercado de Sonora Ciudad de México, México, el día 3 de febrero del 2010, el espécimen fue identificado por la M. en C. Abigail Aguilar botánica del herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social, se depositó un ejemplar de herbario con el número 15542.

Hypericum philonotis se colectó a 10 kilómetros al oeste de Pátzcuaro por la carretera a Uruapan, municipio de Pátzcuaro Michoacán, México, el día 7 septiembre del 2010. La planta fue identificada por el Dr. Sergio Zamudio del “Instituto de Ecología Centro Regional de Bajío”. Se depositó un ejemplar de herbario con número 14864.

Las semillas de Codo de Fraile (*Thevetia thevetioides*) se colectaron en el Estado de Colima.

6.2 Fármacos y sustancias

La enzima lipasa tipo II porcina y *p*-nitrofenilpalmitato, se adquirieron de la compañía Sigma-Aldrich (St Louis Mo, EUA). El Tris (hidroximetil)aminometane se adquirió de USBiological (Swampscott, MA, EUA) y finalmente el fármaco orlistat se extrajo de capsulas de Xenical[®] (ROCHE[®]). La identificación del orlistat se realizó por medio de espectrometría de masas (XI. Anexo). El resto de las sustancias fueron de grado reactivo.

6.2.1 Extracción de orlistat

Se vaciaron 15 cápsulas de Xenical[®] (120mg de orlistat por cada una) en un vaso de precipitados de 100mL; se le agregaron 35mL de metanol y se mantuvo en agitación constantemente durante 5 minutos. Posteriormente se filtró por medio de un embudo de talle corto y papel filtro (whatman grado 52), el filtrado se colocó en un matraz bola de 250mL. Después se eliminó el disolvente (metanol) a presión reducida en un evaporador rotatorio y se obtuvo un aceite, el cual se le agregó 25mL de agua destilada fría (10°C). Se dejó reposar durante 30 minutos, y se formó un precipitado color blanco; el cual se

filtró y se lavó con agua destilada fría (10°C). Se dejó secar a temperatura ambiente. Se guardó en un vial color ámbar y en refrigeración. El rendimiento fue de 95%.

6.3 Preparación de los extractos

Las partes aéreas (hojas, flores, tallo y ramas) de *Hypericum silenoides* e *Hypericum philonotis* se secaron a la sombra y se molieron en un molino manual. La parte interna de las semillas de *Thevetia thevetioides* se separaron de la cubierta dura. La raíz de *Valeriana edulis ssp. procera*, se secó a la sombra y se molió en un molino manual. Tres o cinco kilogramos de material se extrajeron 3 veces por maceración en períodos de 3 días y de manera sucesiva con hexano (3 L), diclorometano (3 L) y metanol (3 L). Después se eliminó el disolvente a presión reducida en un evaporador rotatorio y se obtuvieron los extractos correspondientes. También se preparó un extracto acuoso poniendo a ebullición por 5 minutos 100 o 500 g de planta con 800 mL de agua destilada. Se dejó enfriar y después de filtrar se concentró en un evaporador rotatorio (rotavapor) con bomba de alto vacío a 40 °C a 40 mbars (extracto acuoso).

6.4 Determinaciones espectroscópicas

Los espectros de IR se obtuvieron en el equipo FT/IR modelo Spectrum RXI Perkin Elmer con resolución de 4cm⁻¹. Rango de 4000-400cm⁻¹. Los espectros de Masas se obtuvieron en un equipo JEOL JMS-AX505 HA Mass Spectrometer. Los espectros de RMN-¹³C y RMN-¹H se obtuvieron en un aparato Varian Gemini 200MHz, versión 2000.

6.5 Ensayo in vitro

Método basado en la hidrólisis de palmitato de p-nitrofenilo.

6.5.1 Preparación de las soluciones

1) Se preparó una solución amortiguadora de Tris ((hidroximetil) aminometano)- HCl cuya concentración fue 7.5 mM ajustando el pH a 8.5 con una solución de HCl al 10%.

2) Se preparó la solución de lipasa porcina en solución amortiguadora Tris-HCl (5 mg/mL).

3) Se preparó una solución de palmitato de p-nitrofenilo (PNP) cuya concentración estuvo en el rango de 0.3 a 30 mM, disolviendo primero en acetonitrilo y aforando con etanol (la proporción final acetonitrilo: etanol fue 1:2).

4) Se prepararon las soluciones inhibitorias de los extractos acuosos y metanol disolviéndolos en agua, mientras que los extractos de hexano y diclorometano en dimetilsulfóxido (DMSO). Las concentraciones finales de los extractos fueron: 3, 30, 100, 300 y 562 µg/mL.

5) Se realizó un blanco y un control por cada concentración de cada planta o compuesto evaluado.

6.5.2 Curva estándar

Se construyó una curva estándar utilizando el rango de concentraciones antes descritas de palmitato de p-nitrofenilo siguiendo el procedimiento para cuantificar p-nitrofenol.

6.5.3 Cuantificación p-nitrofenol

1) Se realizó una mezcla de 10 µL de PNP, 162 µL de solución amortiguadora Tris-HCl (pH 8.5; 75 mM), 16 µL de solución de inhibitoria y 12 µL de la solución de enzima en los pozos de la microplaca.

2) Se incubó a 37 °C durante 25 minutos.

3) Se leyó a una longitud de onda de 405 nm, utilizando una microplaca de 96 pozos.

4) Se usó como blanco una mezcla de acetonitrilo: etanol (1:2), en lugar de la solución de PNP.

6.6 Validación del método

Se validó el método para la cuantificación de ácidos grasos libres (método basado en la hidrólisis del palmitato de p-nitrofenilo), para definir que el método es confiable y reproducible.

La validación del método se realizó conforme a la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos (16).

- Linealidad del sistema
- Precisión del sistema
- Linealidad del método
- Exactitud y repetibilidad
- Precisión intermedia
- Estabilidad de la muestra. Analizándose cada 24 horas, hasta cumplir 72 horas.

Las condiciones que se determinaron fueron:

d1 Temperatura ambiente con luz

d2 Temperatura ambiente en oscuridad

d3 Temperatura de 4°C

- Robustez
 - Para determinar la robustez de este método los factores modificados fueron:
 - d1: El orden de adición (primero adicionando el sustrato, posteriormente la lipasa y finalmente el inhibidor)
 - d2: El tiempo de incubación (40 minutos; 37°C)
- Tolerancia
 - Método de palmitato de p-nitrofenilo
 - Para determinar la robustez de este método los factores modificados fueron: Diferentes marcas de micropipetas (RAININ y EPPENDORF); y microplacas de fondo redondo
- Límite de cuantificación
- Límite de detección

VII. RESULTADOS

7.1 Rendimiento de extractos

En el Cuadro 8 se presenta el rendimiento de los extractos obtenidos a partir de las diferentes plantas.

Cuadro 8. Rendimientos de los extractos de las diferentes plantas

Extractos	Kilogramos de Planta macerada	Extractos	Gramos obtenidos de extracto	Rendimiento
<i>Hypericum philonotis</i>	3 kg	Hexano	70.7 g	2.3%
		Diclorometano	58.3 g	1.9%
	0.5 kg	Metanol	283.0 g	1.4%
		Acuoso	17.4 g	8.7%
<i>Hypericum silenoides</i>	5 kg	Hexano	128.4 g	2.5%
		Diclorometano	74.8 g	1.5%
	0.5 kg	Metanol	678.1 g	13.3%
		Acuoso	11.3 g	5.6%
<i>Valeriana edulis ssp. procera</i>	0.5 kg	Hexano	-----	No se cuantificó
		Diclorometano	-----	No se cuantificó
	0.01 kg	Metanol	-----	No se cuantificó
		Acuoso	-----	No se cuantificó
<i>Thevetia thevetioides</i>	0.5 kg	Hexano	208.2 g	41.6%
		Diclorometano	56.6 g	11.32%
	0.1 kg	Metanol	28.1 g	5.6%
		Acuoso	8.6 g	8.6%

7.2 Validación del método

Se validó el método basado en la hidrólisis de palmitato de p-nitrofenilo mostrando los resultados en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Validación del método basado en la hidrólisis de palmitato de p-nitrofenilo

	Parámetros	Resultado	Especificación
Linealidad del sistema	Coeficiente de variación	≤3%	≤3%
	r^2	0.9956	≥0.98
Precisión del sistema	Coeficiente de variación	1.46	<3%
Linealidad del método	r^2	0.9935	≥0.98
	Promedio	100.57	97% al 103%
	Coeficiente de variación	1.947	≤3%
Exactitud y repetibilidad	Coeficiente de variación	1.759	≤3%
Precisión intermedia	Coeficiente de variación	2.828	<3%
Estabilidad de la muestra	d1	4.501	<3%
	d2	11.214	<3%
	d3	37.852	<3%
Robustez	d1	12.99	<2%
	d2	1.377	<2%
Tolerancia	Coeficiente de variación	1.807	<3%
Límite de cuantificación	r^2	0.9933	≥0.98
	IC (β_1)	0.1487- 0.1572	No debe incluir al cero
	Límite de cuantificación	0.04036 μ M	Sin especificación
Límite de detección	r^2	0.9933	≥0.98
	IC (β_1)	0.1487- 0.1572	No debe incluir al cero
	Límite de cuantificación	0.01331 μ M	Sin especificación

7.3 Actividad inhibitoria de la lipasa pancreática porcina con productos naturales

Tres de los cuatro extractos (hexano, diclorometano y acuoso) obtenidos a partir de *Hypericum philonotis* inhibieron de manera significativa ($*p < 0.05$ y $\alpha 0.05$) a las lipasas por más del 50% (Figura 15), respecto al punto inicial de la gráfica el cual no contiene inhibidor (extracto).

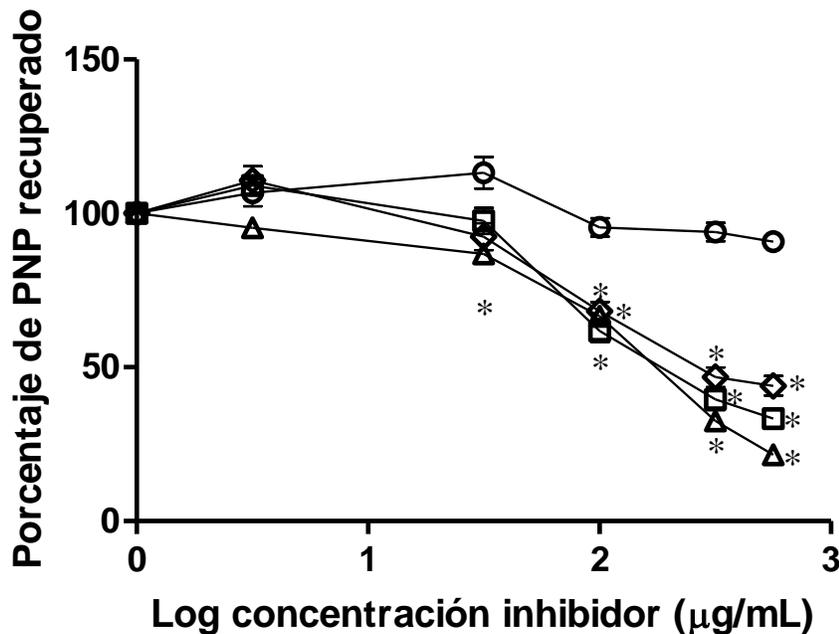


Figura 15. Curva de la actividad inhibitoria de los extractos de *Hypericum philonotis*. Hexano (△), diclorometano (□), metanol (○) y acuoso (◇). Cada punto representa la media \pm EEM de al menos nueve observaciones. $*p < 0.05$ y $\alpha 0.05$ respecto al punto inicial de la gráfica. Se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba *post hoc* de Dunnett.

En tanto que *Hypericum silenoides* (**Figura 16**) presentó un menor efecto de inhibición, ya que sólo dos de los cuatro extractos probados (acuoso y diclorometano) presentaron actividad inhibitoria de manera significativa ($*p < 0.05$ y $\alpha 0.05$) respecto al punto inicial de la gráfica el cual no contiene inhibidor (extracto).

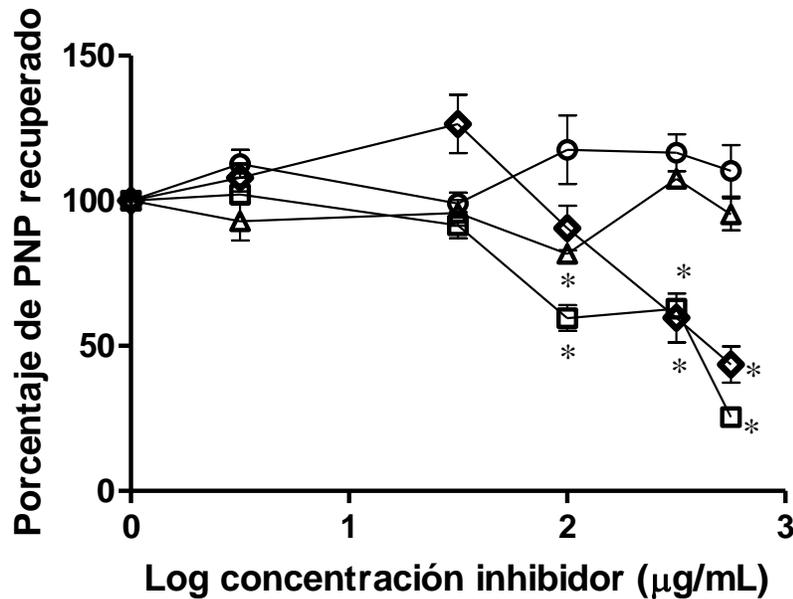


Figura 16. Curva de la actividad inhibitoria de los extractos de *Hypericum silenoides*. Hexano (Δ), diclorometano (\square), metanol (\circ) y acuoso (\diamond). Cada punto representa la media \pm EEM de al menos nueve observaciones. $*p < 0.05$ y $\alpha 0.05$ respecto al punto inicial de la gráfica. Se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba *post hoc* de Dunnett.

Valeriana edulis ssp. procera (Figura 17) también presentó actividad inhibitoria en dos de los cuatro extractos probados (hexano y diclorometano) respecto al punto inicial de la gráfica el cual no contiene inhibidor (extracto). Siendo los extractos menos polares los que presentan actividad dosis- dependiente.

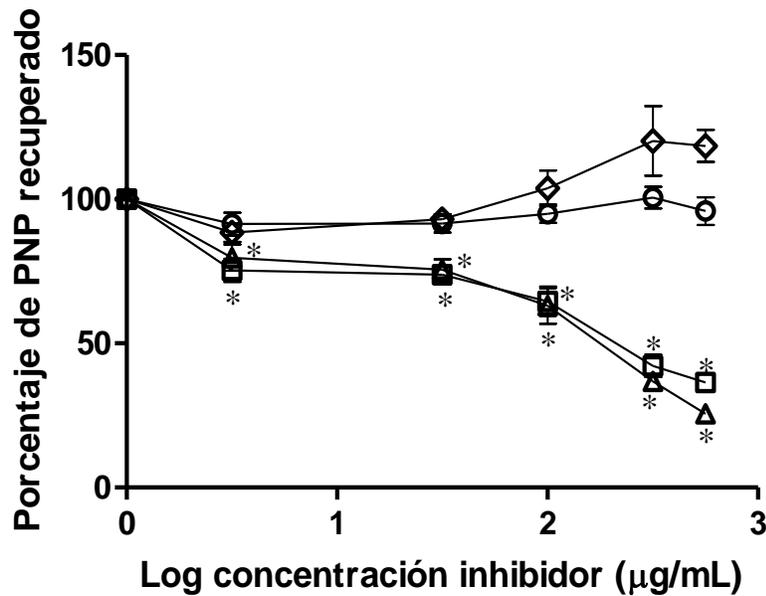


Figura 17. Curva de la actividad inhibitoria de los extractos de *Valeriana edulis ssp. procera*. Hexano (△), diclorometano (□), metanol (○) y acuoso (◇). Cada punto representa la media \pm EEM de al menos nueve observaciones. * $p < 0.05$ y $\alpha 0.05$ respecto al punto inicial de la gráfica. Se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba

Los extractos de *Thevetia thevetioides*, no presentaron actividad inhibitoria (**Figura 18**). Así mismo uno de sus componentes puros, la nerifolina, tampoco presenta actividad inhibitoria de lipasas (**Figura 19**) con respecto al punto inicial de la gráfica, el cual no contiene extracto o componentes puros según sea el caso.

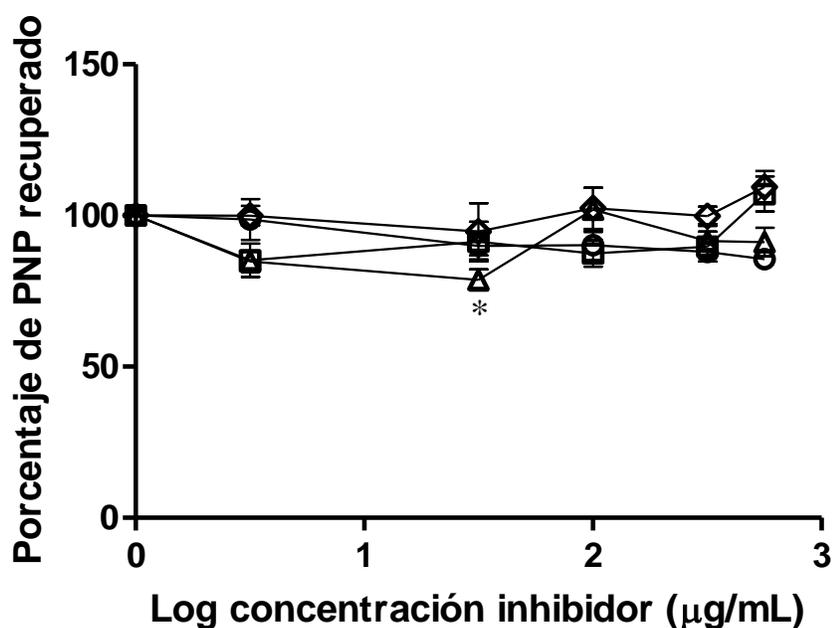


Figura 18. Curva de la actividad inhibitoria de los extractos de *Thevetia thevetioides*. Hexano (\triangle), diclorometano (\square), metanol (\circ) y acuoso (\diamond). Cada punto representa la media \pm EEM de al menos nueve observaciones. * $p < 0.05$ y $\alpha 0.05$ respecto al punto inicial de la gráfica. Se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba *post hoc* de Dunnett.

La diligustilida obtenida de la planta *Ligusticum porteri* presentó actividad inhibitoria a las concentraciones más altas (100 y 300 µg/mL), respecto al punto inicial de la gráfica (Figura 19).

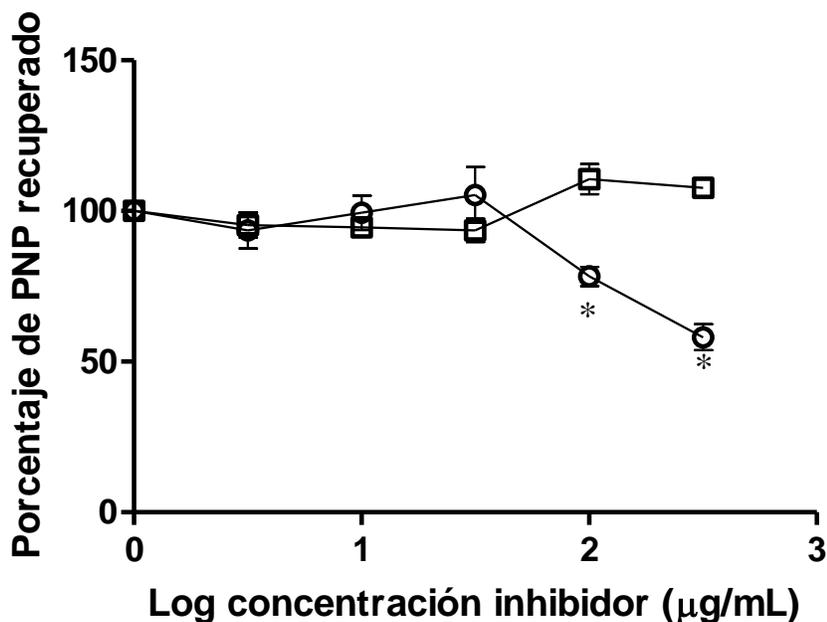


Figura 19. Curva de la actividad inhibitoria de Nerifolina (□) y Diligustilida (○). Cada punto representa la media ± EEM de al menos nueve observaciones. * $p < 0.05$ y $\alpha 0.05$ respecto al punto inicial de la gráfica. Se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba

En el **Cuadro 10** se presentan los valores de CI_{50} (concentración inhibitoria cincuenta) de cada extracto probado. Los extractos hexánicos de las plantas *Valeriana edulis ssp. procera* e *Hypericum philonotis* presentaron una CI_{50} de 151.977 µg/mL y 162.607 µg/mL respectivamente; los extractos de diclorometano de las plantas *Valeriana edulis ssp. procera*, *Hypericum philonotis* e *Hypericum silenoides* presentaron valores de CI_{50} de 201.246 µg/mL, 213.956 µg/mL y 262.797 µg/mL respectivamente.

Los extractos acuosos de las plantas *Hypericum philonotis* e *Hypericum silenoides* presentaron valores de CI_{50} son 341.455 µg/mL y de 403.701 µg/mL respectivamente.

Valoración de la actividad inhibitoria de lipasas con productos naturales.

La diligustilida aunque presentó actividad inhibitoria, no fue posible realizar el cálculo de la CI_{50} , ya que a la concentración más alta probada no inhibe el 50% de la producción del p-nitrofenol; por lo que se necesita más de 300 $\mu\text{g/mL}$ de compuesto para que se lleve a cabo el 50% de actividad inhibitoria. El orlistat, utilizado como control positivo, presentó una CI_{50} de 0.041 $\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 10. Concentración inhibitoria de los extractos y compuestos puros

Extractos	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm EEM
<i>Hypericum philonotis Cham. & Schlecht</i>	
Extracto Hexano	174.8 \pm 8.6317^b
Extracto Diclorometano	225.5 \pm 22.9398^b
Extracto Acuoso	324.1 \pm 41.0582^b
Extracto Metanol	No activo
<i>Hypericum silenoides Juss</i>	
Extracto Diclorometano	276.6 \pm 36.4849^b
Extracto Acuoso	403.7 \pm 78.2521^a
Extracto Hexano	No activo
Extracto Metanol	No activo
<i>Valeriana edulis ssp. procera</i>	
Extracto Hexano	151.977 \pm 16.3042^a
Extracto Diclorometano	201.246 \pm 29.0893^a
Extracto Acuoso	No activo
Extracto Metanol	No activo
<i>Thevetia thevetoides</i>	
Extracto Hexano	No activo
Extracto Diclorometano	No activo
Extracto Acuoso	No activo
Extracto Metanol	No activo
Diligustilida	No se calculó
Nerifolina	No activo
Orlistat	0.041 \pm 0.0028^a

a= Método lineal

b= Método de Hill

VIII. DISCUSIÓN

Como primer paso en el estudio de la evaluación de los extractos, se realizó la validación del método analítico para definir su confiabilidad y reproducibilidad. El método colorimétrico, para cuantificar la cantidad de ácidos liberados indirectamente, cumple con los parámetros establecidos en la validación de métodos analíticos (**Cuadro 9**).

Los extractos de *Hypericum philonotis* e *Hypericum silenoides* presentaron actividad inhibitoria dependiente de la concentración, en el modelo *in vitro* de la lipasa pancreática porcina (**Figura 15 y Figura 16**).

Las CI_{50} se obtuvieron a partir de una regresión lineal (Tallarida, 2000). El orden de potencia obtenido para los extractos de *Hypericum philonotis* (**Cuadro 10**) fueron hexano ($CI_{50}=174.8 \mu\text{g/mL}$) > diclorometano ($CI_{50}=225.5 \mu\text{g/mL}$) > acuoso ($CI_{50}=324.1 \mu\text{g/mL}$), mientras que el extracto de metanol no presentó actividad, con base en estos resultados, aparentemente la naturaleza química de los compuestos presentes activos de baja polaridad.

Los extractos de diclorometano y acuoso de *Hypericum silenoides*, presentaron efecto dependiente de la concentración. Las CI_{50} fueron $276.6 \mu\text{g/mL}$ para el extracto de diclorometano y $403.7 \mu\text{g/mL}$ para el acuoso. De acuerdo a estos resultados, la naturaleza de los compuestos activos de esta planta puede ser de baja polaridad.

Conforme a los resultados anteriores se sugiere que al tener una inhibición en la lipasa pancreática, no se lleva a cabo la hidrólisis del 50 al 70% del total de las grasas ingeridas y por consiguiente la absorción de los lípidos provenientes de la dieta (Carek y Dickerson, 1999); así mismo se puede dar un avance en el sustento científico al estudio realizado por Husain et al. (2011) en el cual se determinó que el extracto hidroalcohólico de *Hypericum perforatum* evaluado en ratas alimentadas con una dieta rica en carbohidratos y lípidos, cuya administración fue durante 15 días consecutivos, condujo a la disminución del peso corporal, así como a la disminución de parámetros lipídicos (colesterol total, LDL-C, triglicéridos); ya elevación de las lipoproteínas en plasma es el resultado de un incremento en la absorción de las grasas provenientes de la dieta (Ikonen, 2006), las dos especies de *Hypericum*, evaluadas en este trabajo, inhiben la actividad de la lipasa pancreática porcina. Esta información pudiera sugerir que en un modelo *in vivo*, dichas especies disminuyen la absorción de los ácidos grasos libres en el intestino, y que al igual que

Hypericum perforatum, disminuyen los parámetros lipídicos y una disminución en la ganancia de peso corporal.

Cabe mencionar que este trabajo es la primera evidencia experimental en donde se demuestra que los extractos de *Hypericum philonotis* e *Hypericum silenoides* actúan como inhibidores de la lipasa pancreática porcina en un modelo *in vitro*.

Won (2010), reportó que las saponinas, polifenoles, flavonoides y cafeína inhiben a la lipasa pancreática. El género *Hypericum* contiene un gran número de constituyentes químicos con actividad biológica documentada incluyendo polifenoles y flavonoides glucósidos (Lavie et al., 1995). Es posible que estos compuestos estén presentes en las dos especies de *Hypericum* estudiadas en este trabajo y que dichos compuestos sean los responsables de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática porcina presentada. Así mismo es importante seguir con esta línea de investigación, ya que no existen estudios de ninguna índole acerca de estas plantas (*Hypericum philonotis* e *Hypericum silenoides*), y por consiguiente tampoco en relación a las lipasas, con lo cual se da un avance en el soporte científico acerca de su uso tradicional. No obstante se deben realizar otros estudios que demuestren y confirmen dicha actividad, así como la identificación de los compuestos responsables del efecto de inhibición presentes en estas plantas, no descuidando los estudios de toxicidad de los extractos empleados en este trabajo.

Parte de este trabajo consistió en la evaluación de la actividad de los valepotriatos, compuestos característicos de la *Valeriana edulis* ssp. *procera*, y que se encuentran en los extractos de baja polaridad. El extracto de hexano y diclorometano presentaron actividad inhibitoria de la lipasa pancreática porcina las CI_{50} fueron 151.977 $\mu\text{g/mL}$ y 201.246 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (**Cuadro 10**). Los valepotriatos son compuestos terpénicos con esqueleto furanopiranoide, muy reactivos e inestables ya que contienen dentro de su estructura un grupo epóxido. Posiblemente este grupo se una al sitio catalítico de la lipasa pancreática porcina; de la misma manera como actúa el orlistat, cuyo mecanismo de acción consiste en una unión covalente entre el centro activo de la enzima (serina 152) y el anillo β -lactámico del orlistat, evitando la absorción intestinal de las grasas provenientes de la dieta (Hauptman, et al., 1992). Sin embargo, aunque se presentó efecto para la inhibición de lipasas, no se pueden considerar fitofármacos debido a su inestabilidad (Navarrete et al., 2006); ya que en cuanto a su efecto de mutación presente en altas concentraciones, $\geq 500\mu\text{g/mL}$, (Déciga-Campos et al., 2007) no

interfiere, ya que en las concentraciones en las que se inhibe a las lipasas significativamente, es menor a 500µg/mL. Este estudio fue con el fin de determinar que los valepotriatos son capaces de inhibir a las lipasas, que es un blanco farmacológico en el tratamiento de obesidad y en los que se pueda apreciar una disminución en el peso corporal.

La diligustilida, extraída de la planta *Ligusticum porteri*, presentó actividad inhibitoria a las concentraciones más altas (**Figura 19**). Este compuesto contiene un anillo lactónico en su estructura; es posible que este anillo se una covalentemente al sitio catalítico de la enzima, aunque dicho anillo es estable por la presencia de un doble enlace, sin embargo es un mecanismo que aún no se ha estudiado. No obstante, no se pudo cuantificar la CI_{50} , ya que la concentración más alta del compuesto (300µg/mL) no fue capaz de inhibir la actividad de la enzima pancreática porcina en un 50%.

Los extractos de *Thevetia thevetioides* no presentaron actividad inhibitoria en el modelo *in vitro* de la lipasa pancreática porcina (**Figura 18**). Las semillas de *Thevetia thevetioides* poseen una gran cantidad de compuestos cardiotónicos, principalmente la nerifolina (Cruz et al., 1977). Este compuesto no fue capaz de inhibir a la lipasa pancreática en un modelo *in vitro* (**Figura 19**), a pesar de que en su estructura contiene una lactona, que lo hace susceptible a reaccionar con el sitio catalítico de la enzima; por lo que esta reacción no se presentó en dicho compuesto. Esto sugiere que *Thevetia thevetioides* podría presentar un mecanismo de acción diferente al de la inhibición de la lipasa pancreática, para la disminución de peso corporal.

Con respecto al control positivo empleado, orlistat (extraído de las cápsulas de Xenical®), resulto ser muy potente con respecto a la inhibición de lipasas, ya que con una pequeña concentración (0.041 µg/mL) se puede inhibir al 50% la actividad de la lipasa pancreática porcina, esto como resultado de la unión covalente entre la serina 152 (que es el sitio catalítico de la enzima) y el anillo β-lactámico de la estructura del orlistat. Aunque existe una gran diferencia entre las CI_{50} de los extractos y la CI_{50} del orlistat, no quiere decir que los componentes (inhibidores de la lipasa pancreática porcina) presentes en las plantas, muestren una potencia menor si se encuentran aislados y purificados; así mismo puede ser que esta actividad se presente por la mezcla de metabolitos presentes en las plantas, pudiendo no existir un principio activo. Este trabajo sólo muestra un indicio

de los extractos en los cuales se encuentra la actividad inhibitoria, para iniciar la búsqueda de nuevos principios activos que actúen de manera similar al orlistat.

Es importante que se preste atención a los extractos con actividad inhibitoria, para que se puedan identificar, aislar y purificar a los componentes responsables de la inhibición en la actividad enzimática, y así iniciar una línea de investigación para obtener nuevos fármacos de plantas mexicanas, para así desarrollar fitofármacos que ayuden en el tratamiento de la obesidad, ya que actualmente sólo se cuenta con un medicamento aprobado en México (orlistat), y dicho padecimiento constituye uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial.

IX. CONCLUSIONES

Los extractos de hexano, diclorometano y acuoso de *Hypericum*, así como los extractos de diclorometano y acuoso a partir *Hypericum silenoides* presentaron la mayor potencia como inhibidores de la lipasa pancreática porcina.

Los extractos menos polares (hexano y diclorometano) obtenidos a partir de *Valeriana edulis ssp. procera*, presentaron la mayor potencia en la inhibición de la actividad enzimática.

El compuesto diligustilida mostró ser poco potente ya que se necesitan más de 300 µg/mL para inhibir 50% de la actividad de la lipasa porcina.

Thevetia thevetioides y su metabolito nerifolina no presentaron actividad inhibitoria en la lipasa pancreática porcina.

El método utilizado para medir la actividad inhibitoria de lipasas cumple con todos los parámetros que se requieren en la validación de métodos analíticos.

X. PERSPECTIVAS

Identificar, aislar y purificar los compuestos presentes en los extractos con actividad inhibitoria.

Determinar el tipo de inhibición que presentan dichos compuestos responsables de la inhibición de la lipasa pancreática porcina.

Utilizar un modelo diferente *in vitro* para cuantificación de ácidos grasos en forma directa.

Utilizar los compuestos identificados, aislados y purificados en un modelo *in vivo*.

XI. ANEXO

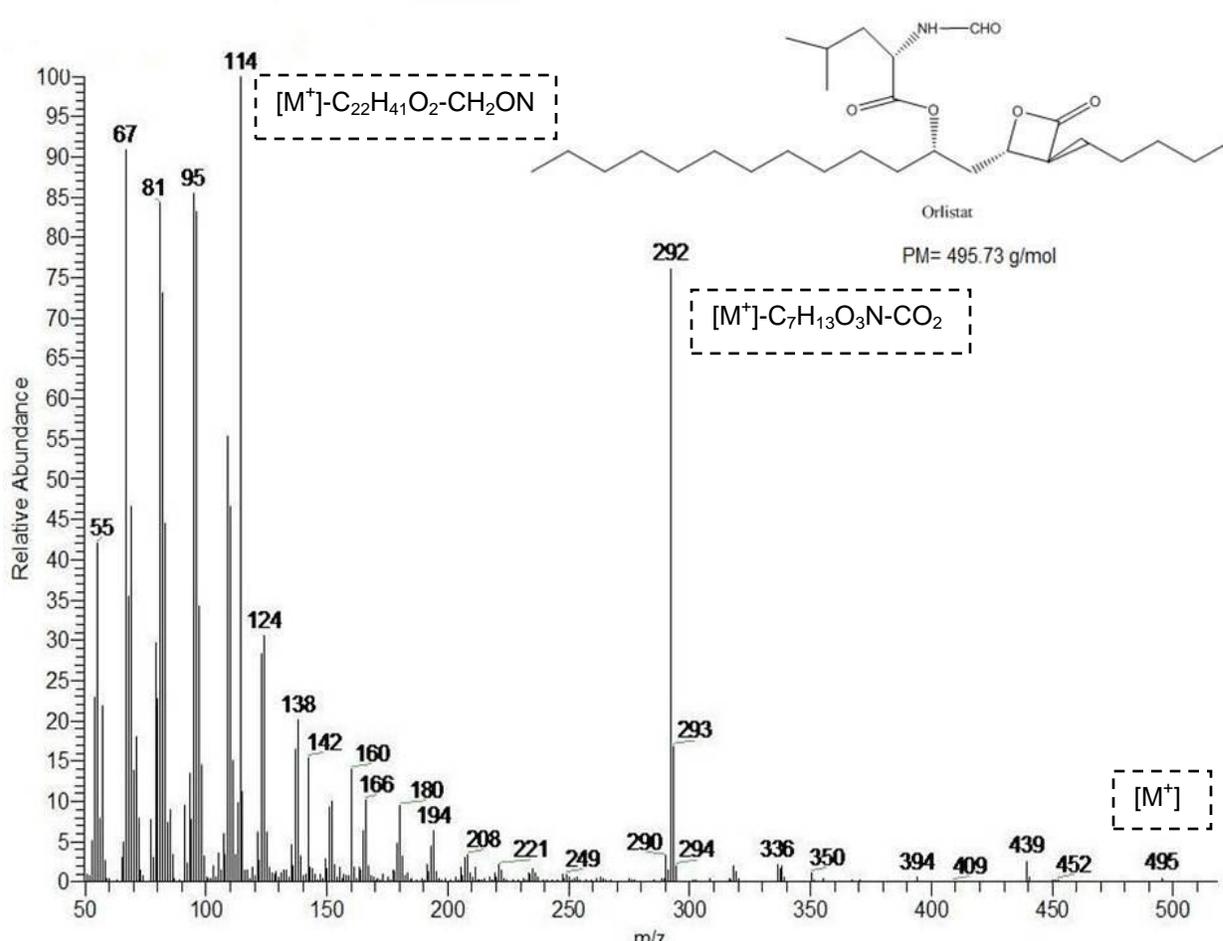


Figura 20. Espectro de masas de orlistat obtenido por impacto electrónico (Columna capilar DB5 de Agilent; 10 m x 0.18 mm de diámetro interno; espesor de película 0.18 μ m).

Orlistat

EMIE: m/z (Int. Rel.): 495(1; M^+), 292(76; $M^+ - C_7H_{13}O_3N - CO_2$), 114(100; $M^+ - C_{22}H_{41}O_2 - CH_2ON$), 67(91), 95(85), 81(84), 55(42), 124(31), 293(17).

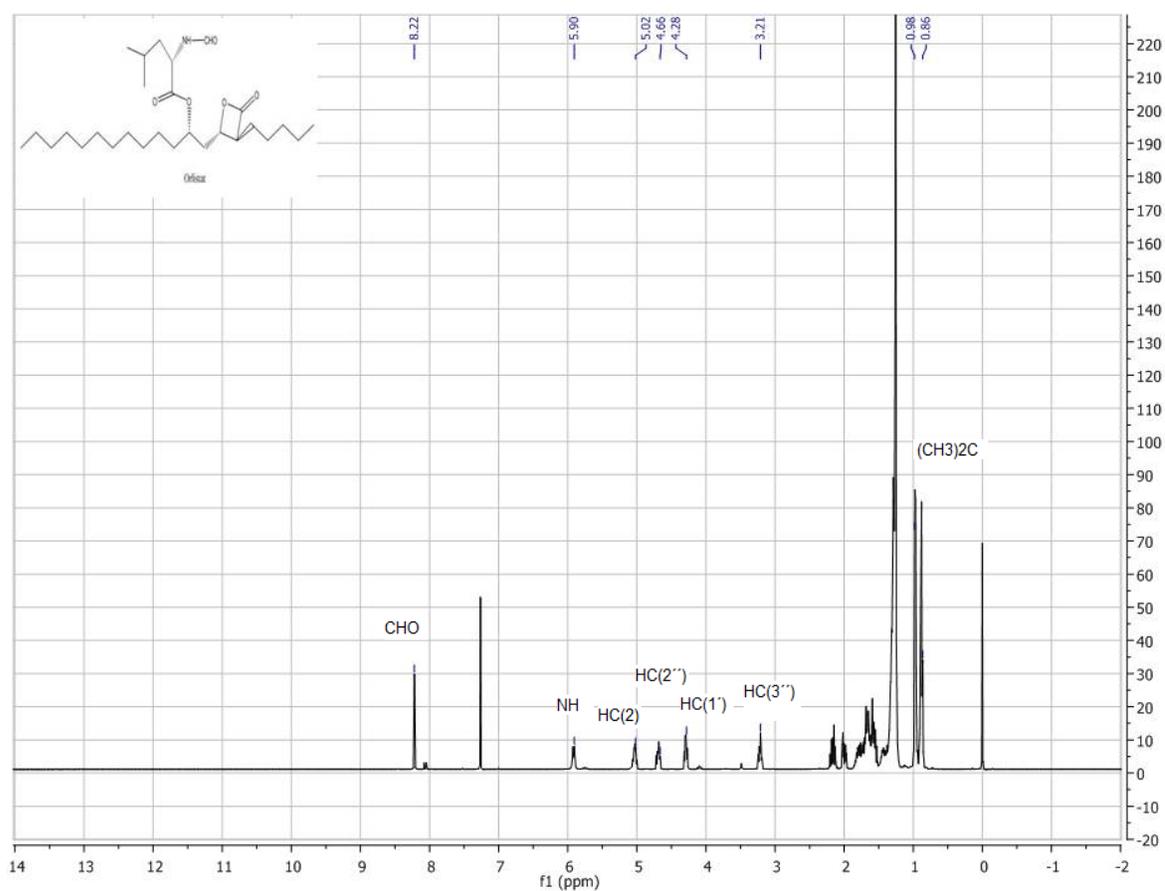


Figura 21. Espectro de resonancia magnética nuclear ¹H del orlistat (400 MHz, CDCl₃; TMS)

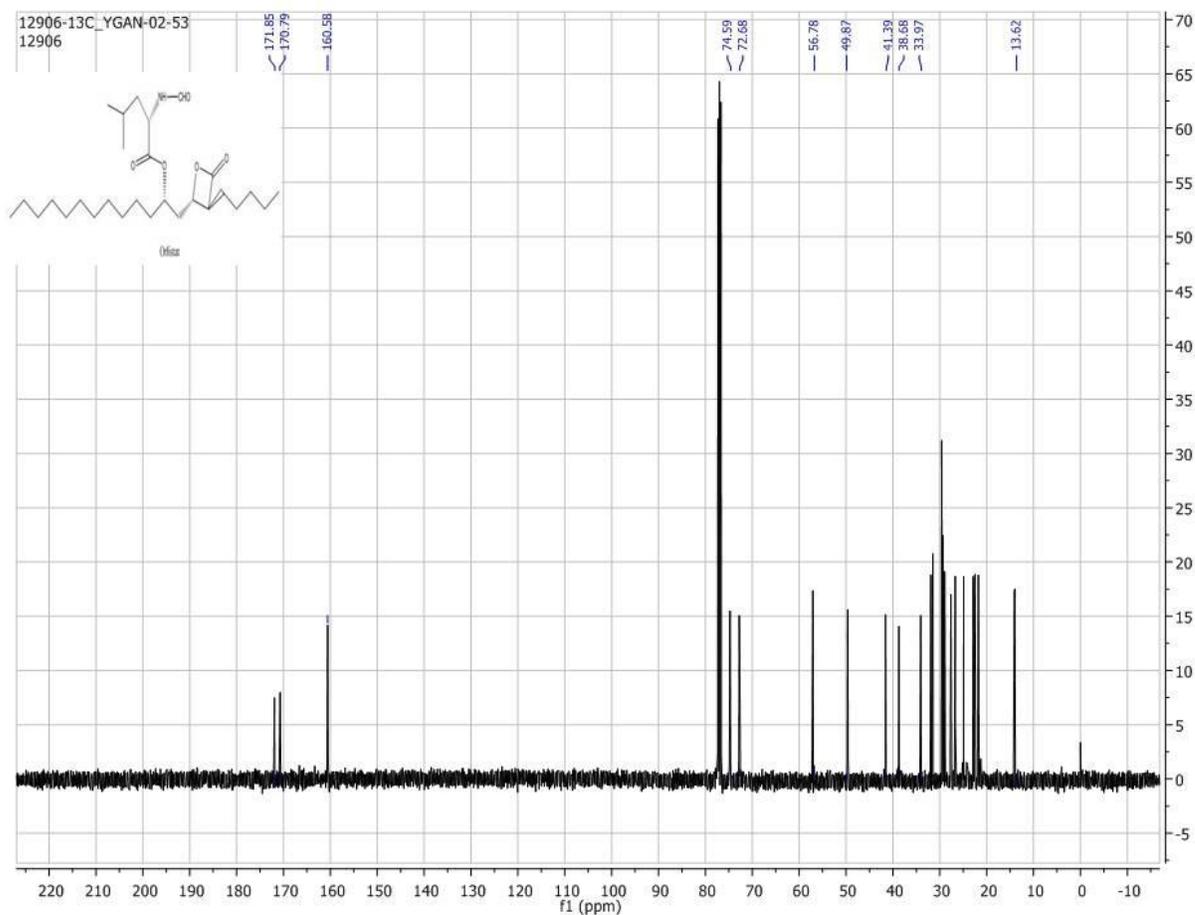


Figura 22. Espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C del orlistat (75 MHz, CDCl_3 ; TMS)

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Ambang Z., Ngho J. P., Essono G., Bekolo G., Chewachong G., Asseng A.A. (2010). Effect of *Thevetia peruviana* seeds extract on *in vitro* growth of four strains of *Phytophthora megakarya*. *Plant Omics Journal*; 3: 70-76.
- Appelt G.D. (1985). Pharmacological aspects of selected herbs employed in Hispanic folk medicine in San Luis Valley of Colorado. *Journal Ethnopharmacology*; 13: 51-5.
- Avenell A., Sattar N., Lean M. (2006). ABC of obesity: Management: part I-behaviour change, diet, and activity. *British Medical Journal*; 333: 740-743.
- Birari R.B. y Bhutani K.K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*; 12: 879-888.
- Bos R., Woerdenbag H.J., Hendriks H., Zwaving J.H., De Smet A.G.M.P., Tittel G., Wikström H.V., Schefer J.J.C. (1996). Analytical aspects of phytotherapeutics valerian preparations. *Phytichemical Analysis*; 7: 143-151.
- Bos R., Woerdenbag H.J., Pras N. (2002). Determination of valepotriates. *Journal of Chromatography A*; 967: 131-146.
- Brindis F., Rodríguez R., Bye R., González-Andrade M., Mata R. (2011). (Z)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -Glucosidase Inhibitor. *Journal of Natural Products*; 74: 314-320.
- Bult M.J., Van Dalen T., Muller A.F. (2008). Surgical treatment of obesity. *European Journal of Endocrinology*; 158: 135-145.
- Carek P.J., Dickerson L.M. (1999). Current Concepts in the Pharmacological Management of Obesity. *Drugs*; 57: 883-904.
- Cégiéla-carlioz P, Bessiére JM, Bruno David, Mariotte AM. (2005). Modulation of multi-drug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus* by Osha (*Ligusticum porteri*, Apiaceae) essential oil compounds. *Flavour and Fragrance Journal*; 20: 671-675.
- Chapus C., Rovey M., Sarda L., Verger R. (1988). Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie*; 70: 1223 -1234.

- Cruz A., García I., Iriate J., Muchowski J.M., Regla I.. (1977). Seeds of *Thevetia* Species as an Alternative Source of Digitoxigenin. *Journal of Organic Chemistry*; 42: 3580-3584.
- Déciga-Campos M., Rivero-Cruz I., Arriaga-Alba M., Castañeda- Corral G., Ángeles-López G.E., Navarrete A., Mata R. (2007). Actue toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*; 100: 334-342.
- Dolenc A., Govedarica B., Dreu R., Kocbek P., Srcic S., Kristl J. (2010). Nanosized particles of orlistat with enhancenced *in vitro* dissolution rate and lipase inhibition. *International Journal of Pharmaceutics*; 396: 149-155.
- Estrada- Soto S., Rivera-Leiva J., Ramírez-Espinoza J.J., Castillo-España P., Aguirre-Crespo F., Hernández-Abreu O. (2010). Vasorelaxant effect of *Valeriana edulis* ssp. *Procera* (Valerianaceae) and its mode of action as calcium channel blocker. *Journal of pharmacy and pharmacology*; 62: 1167-1174.
- Fernández J.A., Remesar X., Fox M., Alemany M. (2002). Pharmacological Approaches for the Treatment of Obesity. *Drugs*; 62: 915-944.
- García-García E., Kaufer-Horwitz M., Pardío J., Arroyo P. (2010). La obesidad. Perspectivas para su comprensión y tratamiento. Ed. Médica Panamericana México, págs. 51-120.
- Hauner H. (2001). Current pharmacological approaches to the treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*; 25(suppl 1): S102–S6.
- Haptuman J.B., Jeunet F.S., Hartmann D. (1992). Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647 (tetrahydrolipstatin). *American Journal of Clinical Nutrition*; 55: 309S- 313S.
- Hensrud D., Klein S. (2006). Extreme Obesity: A New Medical Crisis in the United States. *Mayo Clin Proceedings*; 81: S5-S10.
- Herrera- Arellano A., Luna V.G., Cuevas-Uriostegui M.L., Alvarez L., Vargas- Pineda G., Zamilpa-Alvarez A., Tortorilledo J. (2001). Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extracts in patients suffering from insomnia. *Planta medica*; 67: 28-31.
- Hersch M.P., (1999). Destino Común: los recolectores y su flora medicinal. Ed.Instituto Nacional de Antropología e Historia, pág. 122.

- Houghton P. (1988). The biological activity of valerian and related plants. *Journal of Ethnopharmacology*; 22: 121-142.
- Husain G.M., Singh P.N., Kumar V. (2008). Anti-diabetic activity of Indian *Hypericum Perforatum* L. on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacologyonline*; 3: 889-894.
- Husain G.M., Singh P.N., Kumar V. (2009). Beneficial effects of a standardized *Hypericum perforatum* extract in rats with experimentally induced hyperglycemia. *Drugs Discoveries and Therapeutics*; 3: 215-220.
- Husain G.M., Chatterjee S.S., Singh P.N., Kumar V. (2011). Hypolipidemic and antiobesity-like activity of standardized extract of *Hypericum perforatum* L. in rats. *ISRN Pharmacology*; vol. 2011, Article ID 505247, 7 pages, 2011. doi:10.5402/2011/505247.
- Hvizdos K.M., Markham A. (1999). Orlistat. A review of its use in the management of obesity. *Drugs*; 58: 743-760.
- Ibiyemi S.A., Fradipe V.O., Akinremi O.O., Bako S.S. (2002). Variation in Oil Composition of *Thevetia Peruviana* Juss 'Yellow Oleander' Fruit Seeds. *Journal of Applied Sciences & Environmental Management*; 6: 61-65.
- Ikonen E. (2006). Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and humans disease. *Physiological Reviews*; 86: 1237-1261.
- International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of metabolic syndrome. Bruselas: IDF Comunications; 2006. 23/sep/2010. Disponible en: <http://www.idf.org/node/1271?unode=1120071E-AACE-41D2-9FA0-BAB6E25BA072>
- Jakicic J.M., Otto A.D. (2005). Physical activity considerations for the treatment and prevention of obesity. *American Journal of Clinical Nutrition*; 82: S226-S229.
- Kivimäki M., Hamer M., Batty G.D., et al. (2010). Antidepressant medication use, weight gain, and risk of type 2 diabetes: a population-based study. *Diabetes Care*; 33: 2611-2616.
- Kral J.G. (2006). ABC of obesity. Management: part III-surgery. *British Medical Journal*; 333: 900-903.
- Kumar V., Singh P.N., Jaiswal A.K., Bhattacharya S.K. (1999). Antidepressant activity of Indian *Hypericum perforatum* Linn in rodents. *Indian Journal of Experimental Biology*; 37: 1171-1176.

- Lavie G., Mazur Y., Lavie D., Meruelo D. (1995). The chemical and biological properties of Hypericin- A compound with a broad spectrum of biological activities. *Medicinal Research Reviews*; 15: 111.
- Lean M., Finer N. (2006). ABC of obesity. Management: part II-drugs. *British Medical Journal*; 333: 794-797.
- Lewis G.F., Carpentier A., Adeli K., Giacca A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*; 23: 201-229.
- Li Z., Maglione M., Tu W., Mojica W., Arterburn D., Shugarman L.R. (2005). Meta-analysis: pharmacologic treatment of obesity. *Annals of Internal Medicine*; 142: 532-546.
- Linares E., Bye R. (1987). A study of four medicinal plant complexes of México and adjacent United States. *Journal Ethnopharmacology*; 19: 153–198.
- Manzanero-Medina G.I., Flores-Martínez A., Sandoval-Zapotitla E., Bye-Boettler R. (2009). Etnobotánica de siete raíces medicinales en el mercado de Sonora de la Ciudad de México. *Polibotánica*; 27: 191-228.
- Margesin R., Feller G., Hammerle M., Stegner U., Schinner F.A. (2002). Colorimetric Method for the Determination of lipase Activity in Soil. *Biotechnology Letters*; 24: 27-33.
- Martorell R., Khan L., Hughes M., Grummer-Strawn L. (1998). Obesity in Latin American women and children. *Journal of Nutrition*; 128: 1464-1473.
- Martínez M.E., Moreno L.A., Luna M., Magos G.A., Aguilar A., Campos A.E. (2002). Acute Toxicity of *Thevetia peruviana* in Rodents. *Proc. Western Pharmacology Society*; 45: 131-133.
- McLaughlin J.L., Freedman B. Powell R.G., Smith C.R. (1980). Neriifolin and 2' - Acetylneriifolin: Insecticidal and Cytotoxic Agents of *Thevetia thevetioides* Seeds. *Journal of Economic Entomology*; 73: 398-402.
- McNeely W., Benfield P. (1998). Orlistat. *Adis New Drug Profile*; 56: 241-249.
- Mesa-García M.D., Aguilera-García C.M., Gil-Hernández A. (2006). Importancia de los lípidos en el tratamiento nutricional de las patologías de base inflamatoria. *Nutrición Hospitalaria*; 21: 30-43.

- Monroy O.C., Castillo E.P. (2007). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Ed. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, págs. 53-54.
- Moreno D.A., Ilic N., Poulev A., Raskin I. (2006). Effects of *Arachis hypogaea* nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters. *Life Sciences*; 78: 2797–2803.
- Moro C.O., Basile G. (2000). Obesity and medicinal plants. *Fitoterapia*; 71: S73-S82.
- Navarrete A., Avula B., Choi Y.W. (2006). Chemical fingerprinting of *Valeriana* species: Simultaneous determination of valerenic acids, flavonoids, and phenylpropanoids using liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of AOAC International*; 89: 8-15.
- Neovius M., Narbro K. (2008). Cost-effectiveness of pharmacological anti-obesity treatments: a systematic review. *International Journal of Obesity*; 32: 1752–1763.
- Olaiz-Fernández G., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Rojas R., Villalpado-Hernández S., Henández-Ávila M., Sepúlveda-Amor J. (2006). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Olaiz G., Rojas R., Barquera S., Shamah T., Aguilar C., Cravioto P. et al. (2003). Encuesta Nacional de Salud 2000. T.2: La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Omolaro O., Ibiyemi S.A. (2007). Extractability of *Thevetia peruviana* glycosides with alcohol mixture. *African Journal of Biotechnology*; 6: 2166-2170.
- Organización Mundial de la Salud. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Ginebra: WHO; 1999. WHO technical report series, mun. 894.
- Padwal R.S., Majumdar S.R. (2007). Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramina, and romonabant. *New Drug Class*; 369: 71-77.
- Rayalam S., Della- Fera M.A., Baile C.A. (2008). Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *Journal of Nutritional Biochemistry*; 19: 717–726.
- Rodríguez C. (1996). Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 45. INECOL A.C.
- Schmid R.D., Verger R. (1998). Lipases: Interfacial Enzymes whit Attractive Applications. *Angewandte Chemie International Edition*. 37: 1608-1633.

- Secretaria de Salud. Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria. Estrategia contra el sobrepeso y la obesidad. México:SSA; 2010.
- Secretaria de Salud. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas 1993. México: SSA; 1995.
- Slanc P., Doljak B., Kreft S., Lunder M. (2009). Screening of Selected Food and Medicinal Plant Extracts for Pancreatic Lipase Inhibition. *Phytother Res*; 23: 874-877.
- Tallarida R.J. (2000). Drug synergism and dose-effect data analysis. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC Press.
- Tiss A., Lengsfeld H., Carrère F., Verger R. (2009). Inhibition of human pancreatic lipase by tetrahydrolipstatin: Further kinetic studies showing its reversibility. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; 58: 41-47.
- Tsujita T., Takaichi H., Takaku T., Sawai T., Yoshida N., Hiraki J. (2007). Inhibition of lipase activities by basic polysaccharide. *Journal of Lipid Research*; 48: 358-365.
- UNAM. Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. 24/sep/2010. Disponible en:
http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Thevetia_thevetioides&id=7808
- Waizel B.J. (2007). Plantas empleadas popularmente en el tratamiento de verrugas. *Revista de Fitoterapia*, 7: 153-170.
- Weigle D.S. (2003). Pharmacological Therapy of Obesity: Past, Present and Future. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 88: 2462–2469.
- Won Y.J. (2010). Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. *Phytochemistry*; 71: 1625-1641.
- Won S.R., Kim S.K., Kim Y.M., Lee P.H., Ryu J.H., et al. (2007). Licochalcone A: A lipase inhibitor from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Food Research International*; 40: 1046–1050.