



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
FACULTAD DE MEDICINA  
SECRETARÍA DE DOCENCIA  
JEFATURA DE POSGRADO**

---

**CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES DE ENZIMAS  
DIGESTIVAS INVOLUCRADAS EN EL CONTROL  
DE LA OBESIDAD Y LA DIABETES EN  
*Ludwigia octovalvis.***

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN  
MEDICINA MOLECULAR  
QUE PRESENTA**

**IBT DULCE LOURDES MORALES FERRA**

**DIRECTOR DE TESIS: ALEJANDRO ZAMILPA ALVAREZ**

**CO-DIRECTOR DE TESIS: ARMANDO HERRERA  
ARELLANO**

**Cuernavaca, Morelos, México a abril de 2018**

El presente trabajo fue desarrollado desde enero del 2016 hasta diciembre del 2017 en los laboratorios de Biología Celular y Fitoquímica del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), así como en Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

### **MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN**

- Presidente: Dra. Vera Lucía Petricevich
- Secretario: Dr. Juan José Acevedo Fernández
- Primer vocal: Dra. Gabriela Castañeda Corral
- Segundo vocal: Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez
- Tercer vocal: Dr. Armando Herrera Arellano

Para la realización de los estudios de maestría se obtuvo apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por medio de la beca de posgrado con número de registro 598815, así como del IMSS mediante el apoyo económico complementario para la realización de estudios en de Maestría en Ciencias en el área de la salud con matrícula 99187804.

## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis: Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez y Dr. Armando Herrera Arellano. Por todo el apoyo, paciencia, estímulo y guía que me brindaron. Gracias sobreto por la oportunidad de ser su estudiante y compartir conmigo todo el conocimiento y consejo que les fue posible.

Al Dr. Guillermo Ramírez por guiarme en este proceso de crecimiento personal y profesional desde hace varios años. Gracias por todos los recursos que me ha brindado para no estancarme, gracias infinitas por enseñarme que en la ciencia todo cambia constantemente y la humildad es muy importante para no dejar de crecer.

A todos los miembros del comité tutorial y de revisión: Dra. Gabriela Castañeda Corral, Dr. Juan José Acevedo Fernández, Dra. Laura Álvarez Berber y Dra. Vera Lucía Petricevich. Por todo el tiempo dedicado a la revisión y corrección del presente documento. Gracias por sus prudentes observaciones que enriquecieron enormemente este trabajo.

Al Dr. Manases González Cortazar por toda su enseñanza en la elucidación estructural, parte fundamental de este proyecto.

A Jonathan Orduño y Arturo Pérez por todo el apoyo técnico, indispensable para el desarrollo de este trabajo.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá.

Eres el mejor ejemplo de entereza y sencillez.  
Me llenas siempre de tu contagioso entusiasmo.

A Edwin.

Siempre sacas lo mejor de mí, aun en los peores momentos.

A todos mis compañeros del CIBIS y la Facultad de Medicina.  
Su compañía es invaluable.

A todos quienes participaron de este maravilloso proceso de crecimiento.

Con cariño, Lulú.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS .....	VI
GLOSARIO .....	VIII
RESUMEN.....	X
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Metabolismo de carbohidratos y lípidos.....	1
1.1. Digestión y absorción de los carbohidratos.....	2
1.2. Destino metabólico de los carbohidratos .....	3
1.3. Digestión y absorción de los lípidos .....	3
1.4. Destino metabólico de los lípidos .....	5
2. Principales enfermedades relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos y lípidos.....	6
2.1. Sobrepeso y obesidad.....	6
2.1.1. Etiopatogenia del SPyO .....	7
2.1.2. Abordaje terapéutico del SPyO .....	8
2.2. Diabetes mellitus (DM).....	14
2.2.1. Etiopatogenia de la DMt2 .....	15
2.2.2. Abordaje terapéutico de la DM .....	17
3. <i>Ludwigia octovalvis</i> .....	22
3.1. Botánica.....	23
3.2. Aplicaciones etnomédicas .....	23
3.3. Fitoquímica.....	24
3.4. Farmacología.....	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
OBJETIVOS.....	32
HIPÓTESIS .....	33
MATERIAL Y MÉTODOS .....	34
1. Preparación de extractos .....	34
2. Separación líquido-líquido .....	34

3.	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta .....	35
4.	Análisis por HPLC .....	36
5.	Elucidación estructural por métodos espectroscópicos .....	37
6.	Cuantificación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática.....	37
7.	Cuantificación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de las $\alpha$ -glucosidasas .....	38
8.	Cálculo de la Concentración Inhibitoria Media.....	39
9.	Determinación gráfica del tipo de inhibición enzimática.....	39
RESULTADOS .....		41
1.	Preparación de extractos .....	41
2.	Fraccionamiento químico del extracto hidroalcohólico de <i>L. octovalvis</i> .....	43
3.	Fraccionamiento químico de la fracción orgánica.....	45
4.	Identificación de los compuestos con mayor inhibición de $\alpha$ -glucosidasas .....	48
4.1.	Fracción C1F17 .....	48
4.2.	Fracción C1F32 .....	50
5.	Identificación de los compuestos con mayor inhibición de lipasa pancreática .....	53
5.1.	Fracción C1F51' .....	53
5.2.	Fracción C1F65 .....	53
6.	Cuantificación de los compuestos más activos.....	60
7.	Caracterización farmacológica .....	63
7.1.	Determinación de la Concentración Inhibitoria Media .....	63
7.2.	Determinación gráfica del tipo de inhibición enzimática.....	65
DISCUSIÓN.....		68
CONCLUSIONES.....		74
PERSPECTIVAS .....		75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		76

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Clasificación taxonómica y fotografía de <i>Ludwigia octovalvis</i> .....	22
Figura 2.	Estructura química de los compuestos identificados en <i>L. octovalvis</i> : vitexina <b>1</b> , isovitexina <b>2</b> , orientina <b>3</b> , isoorientina <b>4</b> , ácido betulínico <b>5</b> , quercetina <b>6</b> , $\beta$ -sitosterol <b>7</b> .....	24
Figura 3.	Estructura química de los compuestos identificados en <i>L. octovalvis</i> : 23Z-cumaroilhederagenina <b>8</b> , 23E-cumaroilhederagenina <b>9</b> , 3Z-cumaroilhederagenina <b>10</b> , ácido oleanólico <b>11</b> , ácido ursólico <b>12</b> .....	25
Figura 4.	Estructura química de los compuestos identificados en <i>L. octovalvis</i> : ácido 2 $\alpha$ -hidroxi ursólico <b>13</b> , ácido tormentico <b>14</b> , daucosterol <b>15</b> , ácido elágico <b>16</b> , luteolina <b>17</b> , apigenina <b>18</b> , brevifolincarboxilato de metilo <b>19</b> , ácido gálico <b>20</b> , 3,4,8,9, dibenzo 10-polihidroxi [b,d] piran-6-ona <b>21</b> y maltol <b>22</b> .....	26
Figura 5.	Ejemplares de <i>L. octovalvis</i> resguardados en el Herbario HUMO del CIByC-UAEM.....	41
Figura 6.	Comparación de los cromatogramas y espectros UV de CsHA, galato de epigalocatequina <b>23</b> , catequina <b>24</b> y epicatequina <b>25</b> .....	42
Figura 7.	Esquema general del fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de <i>Ludwigia octovalvis</i> .....	43
Figura 8.	Cromatografía en capa fina del resultado de la separación líquido-líquido de LoHA.....	46
Figura 9.	Cromatografía en capa fina de las fracciones seleccionadas para la evaluación biológica.....	45
Figura 10.	Comparación de los cromatogramas, porcentaje de inhibición y espectro UV de las fracciones más activas.....	47
Figura 11.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de C1F17 y estructura del compuesto elucidado, galato de etilo.....	48
Figura 12.	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de C1F17 y estructura del compuesto elucidado, galato de etilo.....	49
Figura 13.	Cromatografía en capa fina de las fracciones con compuestos relacionados con el ácido gálico.....	50

Figura 14.	Cromatografía en capa fina de la purificación de ácido gálico a partir de la fracción C1F32.....	51
Figura 15.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de C2F1 y estructura del compuesto elucidado, ácido gálico.....	52
Figura 16.	Cromatografía en capa fina de las principales fracciones obtenidas a partir de C1F65.....	53
Figura 17.	Cromatografía en capa fina del resumen del aislamiento de isoorientina a partir de C1F65.....	54
Figura 18.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de C9F43 y estructura del compuesto elucidado, isoorientina.....	55
Figura 19.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C de C9F43 y estructura del compuesto elucidado, isoorientina.....	56
Figura 20.	Experimento COSY de la fracción C9F43.....	57
Figura 21.	Experimento HSQC de la fracción C9F43.....	58
Figura 22.	Experimento HMBC de la fracción C9F43.....	58
Figura 23.	Curvas de calibración de los compuestos más activos (A) galato de etilo, (B) ácido gálico, (C) isoorientina.....	61
Figura 24.	Curva concentración-respuesta de la lipasa pancreática para la determinación de la CI <sub>50</sub> .....	63
Figura 25.	Curva concentración-respuesta de las α-glucosidasas para la determinación de la CI <sub>50</sub> .....	64
Figura 26.	Determinación gráfica del tipo de inhibición enzimática de la isoorientina en lipasa pancreática.....	65
Figura 27.	Determinación gráfica del tipo de inhibición enzimática del (A) galato de etilo y del (B) ácido gálico en α-glucosidasas.....	66



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales tratamientos farmacológicos para el SPyO.....	9
Tabla 2.	Ensayos clínicos con orlistat como tratamiento para la obesidad.....	11
Tabla 3.	Principales tratamientos farmacológicos para la DMt2.....	18
Tabla 4.	Ensayos clínicos con acarbosa en pacientes con DMt2 o intolerancia a la glucosa.....	20
Tabla 5.	Estudios farmacológicos <i>in vitro</i> de diferentes extractos de <i>L. octovalvis</i> .....	27
Tabla 6.	Estudios farmacológicos <i>in vivo</i> de diferentes extractos de <i>L. octovalvis</i> .....	28
Tabla 7.	Estudios farmacológicos <i>in vivo</i> de extractos metanólicos de <i>L. octovalvis</i> .....	29
Tabla 8.	Sistema de gradiente de la fase móvil del procedimiento de HPLC.....	36
Tabla 9.	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática y de $\alpha$ -glucosidasas del extracto hidroalcohólico y las fracciones resultantes de la separación líquido-líquido.....	44
Tabla 10.	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática y $\alpha$ -glucosidasas de las subfracciones resultantes de la fracción orgánica.....	46
Tabla 11.	Datos de RMN $^1\text{H}$ y RMN $^{13}\text{C}$ de C1F17 y del galato de etilo reportado en la literatura.....	49
Tabla 12.	Actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasas de las fracciones C1F32 y C2F1.....	51
Tabla 13.	Datos de RMN $^1\text{H}$ de C2F1 y del ácido gálico reportado en la literatura.....	52
Tabla 14.	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática de C1F65 y sus subfracciones.....	54
Tabla 15.	Datos de RMN $^1\text{H}$ y RMN $^{13}\text{C}$ de C9F43 y de la isoorientina reportados en la literatura.....	59
Tabla 16.	Áreas bajo la curva de los picos correspondientes a los compuestos más activos a diferentes concentraciones.....	60
Tabla 17.	Cuantificación de los compuestos más activos en LoHA y LoAE.....	62

## SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
μv	Microvolt
ADA	American Diabetes Association
AGs	Ácidos grasos
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Aspartato aminotransferasa
AST	Alanino aminotransferasa
ATDG	Diacilglicerol aciltransferasa
CB1R	Receptor canabinoide tipo 1
CBM	Concentración Bactericida Mínima
CCF	Cromatografía en capa fina
CH	Carbohidratos
CI <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria media
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
cm	Centímetro
COSY	Espectroscopía de correlaciones
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMt2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DPP4	Dipeptidil péptidasa 4
ENAHG	Enfermedad no alcohólica del hígado graso
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
HbA1c	Hemoglobina glucosilada A1c
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear de un único cuanto

IMC	Índice de masa corporal
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ki	Constante de inhibición enzimática
Km	Constante de Michaelis-Menten
K <sub>mapp</sub>	Constante de Michaelis-Menten aparente
mL	Mililitro
mm	Milímetro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
nm	Nanómetro
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
RF	Factor de retención
RI	Resistencia a la insulina
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN	Resonancia magnética nuclear
RPN-PEG	Reactivo de Productos Naturales-Polietilenglicol
seg	Segundo
SGLT-1	Transportador ligado a sodio-glucosa 1
SPyO	Sobrepeso y obesidad
STZ	Streptozotocina
TG	Triacilgliceroles
tR	Tiempo de retención
UI	Unidades Internacionales
V <sub>0</sub>	Velocidad inicial
V <sub>máx</sub>	Velocidad máxima de reacción

## GLOSARIO

**Amilina:** Hormona peptídica secretada por las células  $\beta$ -pancreáticas, también llamada polipéptido amiloide de los islotes.

**Antera:** Parte superior del estambre de la flor que contiene el polen.

**Astringente:** Sustancia que con su aplicación tópica retrae los tejidos y puede producir una acción cicatrizante, antiinflamatoria y antihemorrágica.

**Axilar:** Situado en el tallo junto al punto de inserción de una hoja, bráctea o rama.

**Cáliz:** Cubierta exterior de la flor, formado por hojas reformadas llamadas sépalos.

**Caloría:** Unidad de energía térmica equivalente a la cantidad de calor necesaria para elevar 1 °C la temperatura de 1 gramo de agua.

**Carminativo:** Que favorece la expulsión de los gases del tubo digestivo.

**Colestasis:** Disminución o ausencia del flujo normal de la bilis.

**Comorbilidad:** Dos o más trastornos o enfermedades que ocurren en la misma persona.

**Condensación:** Reacción orgánica en la que dos moléculas se combinan para dar un único producto acompañado de la formación de una molécula de agua

**Emulsificación:** Descomposición de gotas de grasa grandes en partículas más pequeñas. En el sistema digestivo humano se realiza en el intestino delgado mediante los ácidos biliares.

**Endocarpio:** Capa más interna de la parte del fruto que rodea a las semillas.

**Enterocito:** Célula epitelial del intestino.

**Erisipela:** Enfermedad infecciosa que afecta la piel y el tejido subcutáneo, y se caracteriza por la aparición de placas rojas y brillantes y la presencia de fiebre.

**Esterificación:** Proceso por el cual se sintetiza un éster derivado de la reacción química entre un ácido carboxílico y un alcohol.

**Fitomedicamento:** Medicamento elaborado de partes estandarizadas de plantas, que tiene una presentación farmacéutica y que posee una acción terapéutica, preventiva, curativa o atenuante de una enfermedad, de una forma eficaz y segura.

**Glabrescente:** Casi desprovisto de pelos o que con el tiempo se vuelve glabro.

**Grelina:** Hormona secretada por las células del estómago que desencadena la sensación de hambre.

**Hemoptisis:** Expectoración de sangre proveniente de los pulmones o los bronquios causada por alguna lesión de las vías respiratorias.

**Hidrólisis:** Reacción de descomposición doble con agua como uno de los reactivos.

**Leptina:** Hormona producida por los adipocitos, el hipotálamo y los ovarios.

**Leucorrea:** Secreción genital blanquecina producida por la inflamación de la membrana mucosa del útero y la vagina.

**Liofilización:** Método que consiste en deshidratar mediante una rápida congelación y posterior eliminación del hielo usando la sublimación del agua a una muy baja presión.

**Lóculo:** Cavidad del fruto en la que están dispuestos los primordios seminales o las semillas

**Malabsorción:** Dificultad o pérdida de la capacidad del intestino delgado para la absorción normal de uno o más nutrientes durante la digestión.

**Metaanálisis:** Conjunto de herramientas estadísticas útiles para sintetizar los datos de una colección de estudios.

**Metileno:** Grupo funcional con la forma  $-CH_2$ .

**Metilo:** Grupo funcional con la forma  $-CH_3$ .

**Metino:** Grupo funcional con la forma  $-CH$ .

**Micela:** Partícula compuesta de moléculas usualmente anfipáticas unidas por enlaces secundarios.

**Oblongo:** Alargado, más largo que ancho.

**Orquitis:** Inflamación de testículo.

**Posprandial:** Estado fisiológico inducido por la ingesta de alimentos.

**Quilomicrón:** Lipoproteínas sintetizadas en el epitelio del intestino

**Subsésil:** Con la parte laminar de la hoja que se une al tallo casi inapreciable.

**Vermífugo:** Que mata o expulsa las lombrices intestinales.

## RESUMEN

La obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 son padecimientos con un elevado impacto social y económico, cuyos tratamientos farmacológicos actuales han sido insuficientes para lograr su adecuado control. Existe evidencia de que los inhibidores de enzimas digestivas son de los fármacos anti-obesidad y anti-diabéticos más eficaces y seguros, aunque sus efectos secundarios son poco tolerados por los pacientes, por lo que el desarrollo de nuevos inhibidores resulta necesario. En un estudio preliminar, *Ludwigia octovalvis* demostró importantes efectos inhibidores de lipasa pancreática y  $\alpha$ -glucosidasas, por lo que los objetivos del presente trabajo fueron aislar, identificar y cuantificar los compuestos con mayor actividad inhibitoria de estas enzimas, presentes en esta especie, así como calcular su concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) y determinar su tipo de inhibición enzimática.

A partir de un extracto hidroalcohólico de hojas de *L. octovalvis* (LoHA) se realizó un fraccionamiento biodirigido mediante cromatografía en columna empleando la evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria como método de seguimiento. Un extracto hidroalcohólico de *Camelia sinensis* (CsHA), y los fármacos acarbose y orlistat se emplearon como controles. Los compuestos con mayor actividad inhibitoria fueron elucidados mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y cuantificados en el extracto mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

A partir de LoHA se obtuvo una fracción orgánica (LoAE), de la cual se aislaron tres compuestos activos. Se identificó a la isoorientina como el compuesto que mostró mayor actividad inhibitoria de lipasa pancreática ( $CI_{50}=434 \mu\text{g/mL}$ , 55.1 %, inhibición acompetitiva), seguida de LoHA ( $CI_{50}=480 \mu\text{g/mL}$ , 23.6 %), CsHA ( $CI_{50}=587 \mu\text{g/mL}$ , 34.8 %) y LoAE ( $CI_{50}=718 \mu\text{g/mL}$ , 31.2 %). En relación con la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas, el galato de etilo fue el compuesto que mostró mayor inhibición enzimática ( $CI_{50}=165 \mu\text{g/mL}$ , 98.4 %, inhibición competitiva), seguido de LoAE ( $CI_{50}=250 \mu\text{g/mL}$ , 82.8 %), CsHA ( $CI_{50}=260 \mu\text{g/mL}$ , 80.8 %), el ácido gálico ( $CI_{50}=400 \mu\text{g/mL}$ , 98.9 %, inhibición competitiva) y LoHA ( $CI_{50}=700 \mu\text{g/mL}$ , 58.9 %). Los porcentajes de cada compuesto fueron 0.7 % y 4.6 % de galato de etilo, 1.9 % y 2.5 % de ácido gálico, 0.2 % y 0.1 % de isoorientina en LoHA y LoAE.

Estos resultados evidencian que la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas y lipasa pancreática de *L. octovalvis* se debe, al menos en parte, a los compuestos identificados. Además, en estudios anteriores se ha reportado que esta especie presenta actividad hipoglucemiante y antihiper glucémica *in vivo*, por lo que los datos obtenidos en este trabajo podrían ser útiles para el desarrollo de un fitomedicamento auxiliar en el tratamiento de la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2.

**Palabras clave:** *Ludwigia octovalvis*, inhibición enzimática, lipasa,  $\alpha$ -glucosidasas.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Metabolismo de carbohidratos y lípidos

Un ser humano promedio requiere alrededor de 1920 a 2900 kcal provenientes de la dieta cada día, dependiendo de su actividad física. Este requerimiento se satisface a partir de carbohidratos (del 40 al 60%), lípidos (del 30 al 40%) y proteínas (del 10 al 15 %) (1).

Los carbohidratos son las formas biológicas primarias de consumo y almacenamiento de energía, además de ser importantes precursores e intermediarios del metabolismo animal. De acuerdo a la cantidad de moléculas que intervienen en su formación los carbohidratos se clasifican en: 1) monosacáridos o carbohidratos, se decir, moléculas que no se pueden hidrolizar hacia carbohidratos más simples, como la glucosa y la fructosa 2) disacáridos, productos de la condensación de dos unidades de monosacárido, por ejemplo la maltosa, sacarosa y lactosa; 3) oligosacáridos, productos de la condensación de 3 a 10 unidades de monosacáridos, de los cuales casi ninguno es digerido por los enzimas humanos; y 4) polisacáridos, productos de la condensación de más de 10 unidades de monosacáridos, por ejemplo los almidones y las dextrinas. Además de los almidones y las dextrinas, los alimentos contienen polisacáridos no amiláceos, como la celulosa y la inulina; estos carbohidratos no son digeribles por los enzimas del ser humano y conforman el principal componente de la fibra en la dieta (1–3).

Los lípidos son un grupo de compuestos químicamente diverso que, atendiendo a que posean o no ácidos grasos (AGs), se clasifican en dos grupos principales: 1) lípidos saponificables (simples y complejos) y 2) lípidos no saponificables (terpenoides, esteroides y prostaglandinas). Los lípidos saponificables simples son aquellos que solo contienen carbono, hidrógeno y oxígeno, como los acilglicéridos y las ceras. Mientras que los lípidos saponificables complejos contienen otros elementos u otras biomoléculas, como es el caso de los fosfolípidos, las lipoproteínas y los glucolípidos (2). Aunque una gran variedad de lípidos son consumidos en la dieta, la mayor cantidad de ellos son triacilglicérolos (TG).

En promedio, la dieta occidental contiene de 100 a 150 g de TG, de 1 a 2 g de colesterol (y ésteres de colesterol) y de 10 a 20 g de fosfolípidos al día (1).



Las proteínas son grandes biopolímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Estas macromoléculas constituyen la fracción más grande (después del agua) de las células y desempeñan una gran cantidad de funciones (2). Su consumo en la dieta es indispensable, pero no por su aporte energético, sino porque provee al organismo de los aminoácidos esenciales, útiles para la formación de nuevas proteínas (4).

### **1.1. Digestión y absorción de los carbohidratos**

Exceptuando los monosacáridos y los carbohidratos no amiláceos, los carbohidratos deben ser hidrolizados por enzimas del tracto gastrointestinal para poder ser absorbidos. Las primeras enzimas que participan en esta degradación son las  $\alpha$ -amilasas salivales, que actúan en la cavidad oral, y las  $\alpha$ -amilasas pancreáticas, que actúan en el intestino; ambas enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -[1,4], respetando los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -[1,6]. Producto de la acción de estas enzimas, se originan los oligosacáridos maltosa, maltotriosa y dextrina (5).

Los oligosacáridos generados por las amilasas y los disacáridos ingeridos de la dieta, son hidrolizados por la acción de un conjunto de enzimas como la lactasa, la dextranasa y las  $\alpha$ -glucosidasas.

Las  $\alpha$ -glucosidasas son un grupo de enzimas pertenecientes a las glucósido-hidrolasas, que actúan sobre los residuos terminales no reductores 1-4 de los  $\alpha$ -glucósidos para liberar moléculas de glucosa; a este grupo pertenecen varias enzimas, entre ellas la dextrinasa, la glucoamilasa, la sacarasa, la trehalasa, la maltasa y la sacarasa-isomaltasa (6).

Finalizado el proceso de digestión, los principales monosacáridos que se absorberán a través de la membrana de los enterocitos son glucosa, fructosa y galactosa. Esta absorción se realiza a través de distintos mecanismos de transporte, que dependen de la estructura química del glúcido. La absorción de glucosa y galactosa se lleva a cabo mediante la acción de un co-transportador dependiente de sodio (SGLT-1) por el que ambas moléculas compiten; mientras que la absorción de fructosa se da por difusión facilitada.

Posteriormente, la glucosa, la fructosa y la galactosa pasan de los enterocitos a la sangre y de ahí a otros tejidos (como músculo o tejido adiposo) mediante los mecanismos previamente descritos. Finalmente la captación de glucosa por las células se realiza por medio de transportadores de glucosa o GLUTs (7).

### **1.2. Destino metabólico de los carbohidratos**

Los niveles de glucosa sanguínea (glucemia), se deben mantener en equilibrio para permitir el metabolismo de aquellos tejidos que utilizan la glucosa como sustrato primario, esto se logra mediante la regulación de la captación periférica de glucosa y su producción endógena. Esta regulación, se encuentra bajo control hormonal, siendo la insulina y el glucagón las principales hormonas responsables.

La hiperglucemia posprandial causa un incremento inmediato en la secreción intestinal del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), que a su vez estimula la producción pancreática de insulina y la disminución de la secreción de glucagón. La insulina estimula la captación y el metabolismo celular de la glucosa e inhibe la producción de la misma en el hígado (8). En cambio, la hipoglucemia, conlleva a la inhibición significativa de la secreción de insulina y al aumento de la secreción de glucagón, que actúa estimulando la producción de glucosa hepática (4,9).

De manera particular, la glucosa y sus metabolitos participan en la vía de las pentosas fosfato, es decir son la fuente de NADPH para la síntesis de AGs y de ribosa para la síntesis de ácidos nucleicos, a su vez, las triosas fosfato (producto intermedio de la glucólisis) dan lugar al glicerol, mientras que el piruvato y los intermediarios del ciclo del ácido cítrico son necesarios para la síntesis de aminoácidos (10).

### **1.3. Digestión y absorción de los lípidos**

La digestión de los TG comienza en el estómago, con la acción de la lipasa lingual y gástrica. Estas enzimas hidrolizan los TG en la posición sn-3, produciendo 1,2- diacilglicerol y AGs libres, mismos que promueven la emulsificación de la grasa con los jugos biliares y pancreáticos, con lo que los lípidos entran al intestino delgado en forma de pequeñas gotas.

Una vez en el lumen intestinal, se produce la mayor parte de la digestión de los TG, por medio de la lipasa pancreática (lipasa pancreática). Esta enzima actúa principalmente en las posiciones sn-1 y sn-3 del TG para liberar 2-monoacilglicerol y AGs libres. Debido a que las gotas de TG cubiertas con sales biliares no son accesibles para la lipasa pancreática, esta enzima requiere de un cofactor, denominado co-lipasa. La co-lipasa es una proteína termoestable sintetizada y secretada por el páncreas y activada en el intestino delgado que permite la unión del enzima con la interface lípido/acuosa (11).

Por su parte, la digestión de los fosfolípidos ocurre por hidrólisis en el intestino delgado, por acción del enzima fosfolipasa A2, que libera AGs a través de la ruptura del enlace en la posición sn-2.

En la digestión de los ésteres de colesterol, estos son hidrolizados a colesterol libre por acción del enzima colesterol esterasa, secretada por el páncreas. La colesterol esterasa humana tiene una amplia especificidad y puede hidrolizar TG, monoacilgliceroles, ésteres de colesterol, fosfoglicéridos y ésteres de vitaminas A y D (12).

Posteriormente, todos los productos de la digestión de los lípidos son emulsificados por medio de sales biliares en forma de micelas, para cruzar la capa de agua que recubre los enterocitos.

Para la absorción de todos estos productos, se han propuesto al menos dos mecanismos diferentes: la absorción pasiva y la absorción mediante acarreadores (12).

Una vez en el citosol del enterocito, los compuestos lipídicos son re-esterificados, empaquetados con proteínas y secretados hacia el torrente sanguíneo como quilomicrones. Posteriormente, los quilomicrones son hidrolizados en los tejidos que expresan lipoproteína-lipasa, liberándose principalmente AGs. La segunda fuente principal de AGs de cadena larga es la lipogénesis a partir de carbohidratos, que ocurre principalmente en el tejido adiposo y en el hígado (1,11).

#### **1.4. Destino metabólico de los lípidos**

Los AGs de cadena larga, pueden ser re-esterificados con glicerol, formando TG, moléculas que constituyen la principal reserva de combustible del cuerpo. La biosíntesis de los TG, se lleva a cabo por dos vías principales: 1) la vía del glicerol fosfato y 2) la vía del monoacilglicerol. Al final de ambas vías, un acil-Coenzima A graso o ácido graso activado (un ácido graso de cadena larga unido al coenzima A) y una molécula de diacilglicerol se unen covalentemente para formar el TG a través de la acción del enzima Diacilglicerol Aciltransferasa (ATDG) (13).

Los AGs también pueden ser degradados mediante  $\beta$ -oxidación para la obtención de acetil-Coenzima A. En general, todos los productos de la digestión de carbohidratos, lípidos y proteínas se metabolizan hacia este producto común. El acetil-Coenzima A puede ser oxidado por el ciclo del ácido cítrico y derivar en la formación de ATP por fosforilación oxidativa o fungir como el precursor de AGs, colesterol y otros esteroides (4).

## **2. Principales enfermedades relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos y lípidos**

### **2.1. Sobrepeso y obesidad**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (14), el Sobrepeso y la Obesidad (SPyO) se definen como una acumulación excesiva de grasa, y son consideradas a nivel mundial como la epidemia del siglo XXI (15,16).

Desde 1997, la OMS ha reconocido al SPyO como una epidemia global; sólo en los últimos 35 años la prevalencia mundial de obesidad casi se ha duplicado. En 2014, se publicó que alrededor del 39 % de la población adulta mundial presentaba sobrepeso, y un promedio del 13 % tenía obesidad (14) y de acuerdo con las proyecciones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) se estima que más de dos terceras partes de la población mundial padecerán sobrepeso u obesidad en el año 2020 (17).

En nuestro país, la prevalencia de SPyO en adultos es de más del 70% y de más del 30% en adolescentes, colocándolo como el segundo lugar en obesidad a nivel mundial (18). También, se sabe que las enfermedades crónicas no transmisibles derivadas del SPyO causaron el 75 % del total de las muertes y 68 % de los años de vida potencialmente perdidos.

Además de las repercusiones sociales, la obesidad tiene costos económicos bastante altos. Se calcula que un paciente obeso gasta en promedio 42 % más en su atención médica que un individuo de peso normal (15) y que el costo del SPyO y sus complicaciones en el 2008 fue de aproximadamente 67,000 millones de pesos (18).

Para determinar si alguien padece sobrepeso u obesidad se han desarrollado diferentes métodos, el más simple y utilizado, a pesar de ser una herramienta poco precisa, es el cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC). De acuerdo con la clasificación de la OMS, el sobrepeso se define con un  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$  y la obesidad con un  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$  (14). Además, la medición de la circunferencia de la cintura, y opcionalmente la cadera, puede ayudar a catalogar la obesidad en: subcutánea y visceral (19).

### **2.1.1. Etiopatogenia del SPyO**

A primera vista, el desequilibrio del peso y la composición corporal que llevan al SPyO son resultado de un simple desbalance entre la ingesta y el gasto de la energía en el organismo, sin embargo, estos procesos se encuentran estrictamente regulados por los sistemas nervioso y endócrino (20). Además, existen varios factores genéticos, fisiológicos, ambientales y psicosociales que modifican estos procesos regulatorios. Por lo que la etiología de estos padecimientos es mucho más compleja (21).

Aunque la predisposición genética al SPyO no puede por sí sola explicar el reciente aumento de la prevalencia de este padecimiento (22), los estudios genéticos han hecho evidente que estos padecimientos son el resultado de la interacción de varios genes que favorecen la susceptibilidad, efectos intergeneracionales intrauterinos, y un estilo de vida obesogénico (22,23).

Algunos de los procesos más importantes involucrados en la ingesta de energía, como el hambre, la saciedad, la termogénesis y el almacenamiento de grasas están controlados por interacciones complejas entre neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas, citocinas, la cantidad y calidad de los nutrientes, y los ritmos circadianos (19). Ejemplo de esto es el sistema endocannabinoide, que participa en varios procesos fisiológicos, como la regulación emocional, la percepción del dolor y la sensación de saciedad alimenticia, comunicando al sistema nervioso central con el resto del organismo, principalmente por medio del receptor cannabinoide tipo 1 (CB1R) y cuya sobreactividad se ha relacionado con el SPyO y otros desordenes metabólicos (24,25).

Debido a que la capacidad de nuestro organismo para almacenar carbohidratos o proteínas es muy limitada, mientras que los lípidos si pueden almacenarse en grandes cantidades en los adipocitos, el crecimiento y proliferación de estas células son el principal origen de la obesidad (26).

El adipocito es una célula con tres funciones básicas: almacenaje de lípidos, termogénesis y función endocrino-metabólica. Esta última se lleva a cabo mediante la secreción de adipocinas, que tienen un papel primordial en la homeostasis de varios procesos fisiológicos, como la ingesta de alimentos, la regulación del equilibrio energético, el metabolismo de la glucosa, la sensibilidad a la insulina, la vascularización, la regulación de la presión arterial y la coagulación (27).

La hiperplasia (incremento anormal del número de células) e hipertrofia (aumento anormal del tamaño celular) de los adipocitos, características del SPyO, afecta la difusión de oxígeno del tejido adiposo, afectando la modulación de los genes implicados en la expresión de algunas adipocinas, induciendo con ello un estado de inflamación sistémica y alterando algunos de los procesos anteriormente mencionados (26–28).

Debido a esto, el SPyO se considera un factor de riesgo importante para varias enfermedades crónicas no transmisibles, que representan los problemas médicos más frecuentes y costosos de la salud pública (22). Ejemplo de esto, son la hiperlipidemia, la enfermedad no alcohólica del hígado graso (ENAHG), la diabetes mellitus tipo 2 (DMt2), la hipertensión arterial, la cardiomiopatía diabética y un mayor riesgo de padecer diversos tipos de cáncer (27,29–31). Además, estos padecimientos tienen un efecto sustancial en el bienestar emocional, la autoestima y la salud psicosocial (32).

### **2.1.2. Abordaje terapéutico del SPyO**

Aunque mediante la combinación adecuada de actividad física y restricción calórica, aunada a tratamientos conductuales, pueden conseguirse pérdidas del 5 % al 10% del peso en un período de 4 a 6 meses (33), el cambio en el estilo de vida no es una medida fácil de llevar a cabo por los pacientes; por lo que también se han buscado activamente fármacos que ayuden al control de esta enfermedad y la prevención de sus complicaciones.

Los fármacos más utilizados en el tratamiento del SPyO se clasifican, con base en su mecanismo de acción, en los grupos que se describen brevemente en la Tabla 1. Además, los inhibidores de la lipasa pancreática y los productos derivados de *Camellia sinensis* se describen con más detalle.

**Tabla 1.-** Principales tratamientos farmacológicos para el SPyO.

Clasificación		Ejemplo de fármaco	Mecanismo de acción	Efectos secundarios	Ref.
Fármacos que disminuyen la ingesta de energía	Adrenérgicos	Fentermina, dietilpropión, benzfetamina, mazindol.	Actúan a nivel central sobre la re-captación de neurotransmisores, disminuyendo el apetito o aumentando la sensación de saciedad.	Valvulopatías, hipertensión pulmonar, infartos, hemorragia subaracnoidea, exacerbación de la manía y pérdida reversible de memoria	(33–35)
	Serotoninérgicos	Fenfluramina, sertralina, sibutramina.			
	Antagonistas del CB1R (Aún en investigación)	Rimonabant	Disminuyen la actividad del sistema endocannabinoide, contrarrestando su efecto orexigénico.	Náuseas, mareos, depresión y ansiedad.	(24,25)
Inhibidores del vaciado gástrico	Agonistas del receptor del GLP-1	Exenatida, liraglutida, lixisenatida, albiglutida, dulaglutida	Desaceleran el vaciado gástrico, produciendo un aumento de la sensación de saciedad.	Náuseas, vómitos, hipoglucemia, hipersensibilidad, angioedema, deshidratación, somnolencia, estreñimiento, eructos y flatulencia.	(20,36)
	Análogos de amilina	Pramlintida			
Inhibidores de enzimas digestivas	Inhibidores de la lipasa pancreática	Orlistat, cetilistat	Inhiben la lipasa pancreática en la luz intestinal, impidiendo la absorción de los TG.	Flatulencias con descarga fecal, heces grasas, aumento de defecación e incontinencia fecal, dolor abdominal. y potencial daño al hígado	(35,37–40)
Inhibidores de la ATDG1		T863, PF-04620110, AZD7687, LCQ908.	Disminuyen la biosíntesis de TG y, por lo tanto, la hipertrofia de los adipocitos.	Náuseas, diarrea y vómitos	(41,42)
Fármacos que incrementan el gasto energético	Catecolaminérgicos	Efedrina, cafeína	Aumentan la termogénesis.	Temblores, incremento de la presión arterial, hiperglucemia, complicaciones cardiovasculares y neurológicas, como hipertensión, arritmias, infartos, convulsiones y fiebre mayor a 42 °C.	(43,44)
	Desacoplantes de la cadena transportadora de electrones	2,4-dinitrofenol			
Sensibilizadores de la insulina	Biguanidas	Metformina	Aumentan la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina.	Irritación del tracto gastrointestinal, disminución de la absorción de vitamina B12 y riesgo de acidosis láctica.	(45)



Otro abordaje terapéutico efectivo, aunque reservado exclusivamente para el obeso mórbido o con comorbilidades, es la cirugía bariátrica o cirugía metabólica (19). Desafortunadamente, los costos e infraestructura requeridos para este procedimiento son altos para la mayoría de los pacientes, además de que sus riesgos quirúrgicos son elevados (46).

#### **2.1.2.1. Inhibidores de la lipasa pancreática**

Existen pocos fármacos aprobados con este mecanismo de acción. La inhibición de la lipasa pancreática ocurre cuando el fármaco se une a la lipasa pancreática en la luz intestinal con lo que impide: 1) la escisión de los TG en AGs libres y monoglicéridos y 2) la absorción de aproximadamente el 30% de las grasas ingeridas, que entonces son eliminadas con las heces (37).

El principal compuesto con esta actividad, aprobado por la FDA en 1998, es el inhibidor irreversible tetrahidrolipstatina u orlistat. Este fármaco es un derivado oxigenado de la lipstatina, producto natural producido por *Streptomyces toxytricini*, y comercializado a nivel mundial como Xenical® de Laboratorios Roche y como Redustat® de Laboratorios Liomont en México.

El orlistat es uno de los fármacos anti-obesidad más estudiados. En este sentido se han realizado diversos con varios ensayos clínicos aleatorizados y metaanálisis enfocados en la evaluación de su efectividad en la pérdida de peso, así como sus beneficios metabólicos en adultos. Además es el único fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la obesidad en niños menores de doce años (47).

En la Tabla 2 se resumen algunos ensayos clínicos con orlistat como tratamiento para la obesidad.

**Tabla 2.-Ensayos clínicos con orlistat como tratamiento para la obesidad.**

Nombre y duración del estudio	Número y tipo de pacientes	Tratamiento	Medidas de eficacia	Resultados encontrados	Ref.
XENDOS 4 años	3305 obesos (IMC $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup> )	Cambio en el estilo de vida y orlistat o placebo 120 mg, tres veces al día.	Peso corporal. Tiempo hasta el inicio de la DM	Mayor permanencia en el ensayo (52 contra 34 %), reducción en la incidencia de DM (6.2 contra 9 %) y mayor pérdida de peso (5.8 contra 3 kg) respecto al grupo placebo.	(48)
Ensayo del grupo europeo de estudios de obesidad y orlistat. 2 años	668 obesos (IMC 28-43 kg/m <sup>2</sup> )	Intervención dietética y orlistat o placebo 60 o 120 mg, tres veces al día.	Peso corporal. Perfil lipídico. Control glucémico. Presión arterial. Calidad de vida. Seguridad y tolerabilidad del fármaco.	Mayor pérdida de peso (8.6 y 9.7 % contra 6.6 %), mayor mantenimiento de la misma <sup>1</sup> (29 y 28.2 % contra 18.6 %) y mejora de los factores de riesgo asociados con la obesidad <sup>2</sup> con las dos dosis de orlistat respecto al placebo. Buena tolerabilidad al orlistat (solo 6% de los pacientes se retiraron debido a sus efectos adversos).	(49)
Roche-Escandinavia 3 años	309 pacientes obesos (IMC 30-45 kg/m <sup>2</sup> ) con factores de riesgo metabólico <sup>3</sup>	Orlistat o placebo 120 mg, tres veces al día.	Mantenimiento de la pérdida de peso durante los 3 años posteriores a una pérdida de peso $\geq$ 5% inducida por una dieta de hipocalórica. Desarrollo de DMt2.	Disminución del peso recuperado (5.4 contra 8.6 kg), aumento del número de pacientes que lograron una pérdida de peso $\geq$ 5 % (67 contra 56 %), reducción del diámetro de cintura (7.7 contra 5.4 cm) y disminución de la incidencia de DMt2 (5.2 contra 10.9 %) en el grupo con orlistat respecto al grupo placebo.	(50)
Estudio suizo de multimorbilidad 1 año	376 obesos (IMC 28-38 kg/m <sup>2</sup> ) con DMt2, hipercolesterolemia y / o hipertensión	Intervención dietética y orlistat o placebo 120 mg, tres veces al día.	Peso corporal, circunferencias de cintura y cadera, presión arterial, perfil lipídico sérico, glucosa en ayunas y HbA1c <sup>4</sup>	Aumento de la pérdida de peso (5.9 contra 4.6 %), aumento del número de pacientes que mantuvieron la pérdida de peso (54.2 contra 40.9 %), mejora de los factores de riesgo asociados con la obesidad <sup>5</sup>	(51)

<sup>1</sup> En el primero y segundo año, respectivamente. Tomando en cuenta solo pérdidas de peso de más del 10%.

<sup>2</sup> Colesterol total, lipoproteína de baja densidad, lipoproteína [a], presión arterial diastólica, glucosa en ayunas e insulina en ayunas.

<sup>3</sup> Dislipidemia, alteración de la glucosa en ayunas o diabetes tipo 2 tratada con dieta.

<sup>4</sup> Hemoglobina glicosilada A1c.

<sup>5</sup> Colesterol total, lipoproteína de baja densidad, glucosa en ayunas y HbA1c.

En el ensayo clínico XENDOS, se evaluó el efecto de un cambio en el estilo de vida y orlistat o placebo en 3305 participantes obesos (21 % con prediabetes) durante 4 años. Se encontró que en el grupo tratado con orlistat se presentó una mayor permanencia en el estudio (52 contra 34 %). También se reportó una mayor pérdida de peso (5.8 contra 3 kg) y una reducción de 37.3 % el riesgo de desarrollar diabetes (48).

En otro estudio realizado con 688 pacientes, se reportó mayor pérdida de peso en el grupo que recibió orlistat respecto al grupo placebo (hasta 9.7 contra 6.6 %), así como un incremento del porcentaje de pacientes que lograron perder más del 10% de su peso corporal durante los 2 años que duró el estudio (29 % contra 18.6 %) (49).

De acuerdo con algunas revisiones (38,39,52), la mayoría de los ensayos clínicos concluyen que el tratamiento con orlistat resulta en disminución de peso corporal, diámetro de cintura, HbA1c, e incidencia de DMt2, así como mejoras en la presión arterial y el colesterol en sangre más allá de lo esperado para el nivel de pérdida de peso (52). La evidencia indica que el orlistat también puede ser útil para el tratamiento de la ENAHG (53).

Los efectos secundarios comúnmente observados son de naturaleza gastrointestinal y desaparecen con el uso prolongado. Estos efectos se presentan en alrededor del 16 al 40% de los pacientes (39) y en orden de frecuencia son: manchas oleosas procedentes del recto (27 %), flatulencia con descarga fecal (24 %), urgencia fecal (22 %), heces grasas (20 %), aumento de la defecación (11 %) e incontinencia fecal (8 %) (54). Otros efectos adversos (como cefalea, infección de vías respiratoria y de vías urinarias, fatiga, irregularidad menstrual, ansiedad, alteración de dientes o encías, entre otras) se presentan en menos del 5 % de los pacientes o no son estadísticamente significativos respecto al placebo (55).

Este fármaco, también puede disminuir la absorción de vitaminas liposolubles, efecto que puede subsanarse con la administración de suplementos vitamínicos y está contraindicado en caso de malabsorción, colestasis, alergia, lactancia o embarazo. Además en el 2009, la FDA envió un comunicado sobre la seguridad del medicamento, debido a un reporte de 32 casos de pacientes en Estados Unidos que refieren eventos adversos relacionados con un potencial daño al hígado (35).

El Cetilistat, otro inhibidor de la lipasa pancreática, es una benzoxazinona altamente lipofílica que actúa induciendo la pérdida moderada de peso, una mejoría en la glucosa sérica y el perfil de lípidos a través del mismo mecanismo que el orlistat. De acuerdo con un estudio presentado por Kopelman *et al.* (56), los eventos secundarios del Cetilistat son aproximadamente 30% que los presentados con orlistat, lo que favorece la adherencia al tratamiento. Además, el tratamiento por dos semanas con este fármaco, produjo una reducción de más del 5 % en aproximadamente 33 % de los pacientes. Así mismo redujo el diámetro de cintura (4.2 contra 2.4), comparadas con el placebo. Por su efectividad tanto en pacientes obesos diabéticos y no diabéticos, en 2013 este fármaco fue aprobado en Japón como un medicamento para el tratamiento de pacientes obesos con DMt2 y dislipidemia, aunque aún no es aprobada por la FDA (57).

#### **2.1.2.2. *Camellia sinensis***

Los productos derivados del té verde (*C. sinensis*) poseen algunos compuestos, principalmente polifenoles y xantinas, que actúan impidiendo parcialmente la acción de enzimas digestivas (amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas y lipasas) y activando la lipólisis de los TG (58,59). También posee muchos otros mecanismos de acción, como la actividad represora del apetito, termogénesis y regulación negativa de la adipogénesis (29), lo cual deriva en múltiples efectos beneficiosos en algunos trastornos metabólicos asociados al SPyO.

Por lo anterior, en el presente proyecto se empleó como control.

Sin embargo, algunos productos derivados de *C. sinensis* han mostrado inducción de daño hepático en humanos por un mecanismo aún desconocido en humanos y por el componente galato de epigalocaterol, uno de los principales compuestos de la forma farmacéutica comercial Exolise®, actualmente retirada del mercado europeo (60).

## 2.2. Diabetes mellitus (DM)

De acuerdo con la *American Diabetes Association* (61), la DM es un grupo de trastornos metabólicos caracterizados principalmente por hiperglucemia crónica como resultado de la incapacidad del cuerpo para utilizar la glucosa sérica, originada por defectos en la secreción de la insulina, su acción o ambas. La DM se clasifica en cuatro categorías principales: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2 (DMt2), diabetes gestacional y otros tipos específicos de DM, siendo la DMt2 el tipo más frecuente y el que origina más gasto de recursos económicos, sociales y humanos, y que además se asocia en un 90% de los casos al SPyO (31).

De acuerdo con las estimaciones de la Federación Internacional de Diabetes, actualmente la prevalencia mundial de DM es de 425 millones de individuos y se espera un incremento a 700 millones para el 2045 (62); por lo que podría considerarse, junto con la obesidad, la mayor epidemia de enfermedades crónicas en la historia de la existencia humana (63).

En el caso de México, el 9.4 % de la población entrevistada había sido diagnosticado con DM (18); sin embargo, tomando en cuenta los casos de individuos que desconocen padecer la enfermedad, es posible que cerca del 18 % de la población adulta mexicana sea diabética (64). De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, que proporcionó las predicciones esperadas en el 2045 para los 10 países con el mayor número de personas con diabetes en 2017, se estimaba que México era el quinto país con mayor número de diabéticos y que pasaría a la cuarta posición con casi el doble de casos confirmados (62). En cuanto a los índices de mortalidad, solo en el año 2015 un total de 98,521 defunciones por DM fueron registradas por el INEGI.

En cuanto a las complicaciones derivadas de la DMt2, se sabe que estas tienen un alto costo social y económico para el sistema de salud pública y la familia del paciente, siendo los medicamentos los insumos de mayor impacto (65), se calcula que en promedio un diabético gasta más del doble en su atención médica que un individuo no diabético.

### 2.2.1. Etiopatogenia de la DMt2

Aunque no se describe una causa concreta de la DMt2, se han descrito algunos factores fisiopatológicos responsables del desarrollo de esta enfermedad. Por ejemplo: la resistencia a la insulina (RI), la alteración del tejido adiposo y la lipotoxicidad, la hiper glucagonemia, la glucotoxicidad, la glucolipotoxicidad y la deficiencia o resistencia a las incretinas. Dichos factores se describen a continuación.

La RI (en tejido muscular, hepático y cerebral) se ha detectado desde las etapas previas a la DMt2 y desempeña un papel importante en el desarrollo de la falla  $\beta$ -pancreática. Esta condición se refiere a que se requieren concentraciones de insulina más altas de lo normal para mantener la glucemia en niveles normales. Aunque aún no se conocen los mecanismos por el que este fenómeno sucede, comúnmente se afirma que la célula  $\beta$ -pancreática, al ser forzada a hipersecretar insulina continuamente, eventualmente se desgasta. Sin embargo otra hipótesis sostiene que la causa de la RI es la misma que la de la falla  $\beta$ -pancreática, la lipotoxicidad (66).

Como se mencionó anteriormente, el tejido adiposo disfuncional (por hiperplasia y/o hipertrofia de los adipocitos) presenta alteración de la secreción de adipocinas que induce RI.

Los adipocitos hipertrofiados también tienen una capacidad disminuida para almacenar lípidos, por lo que estos se desbordan en las células  $\beta$ -pancreáticas, musculares y hepáticas, causando RI y secreción alterada de insulina (66). Al proceso patológico en el que la deposición excesiva de AGs libres en las células  $\beta$ -pancreáticas induce RI y disminución de la secreción de insulina se le conoce como lipotoxicidad. En conjunto, la lipotoxicidad y la deposición excesiva de lípidos en hígado y musculo, causan hiper gluconeogénesis (66,67).

De acuerdo con algunos autores, la hiperglucagonemia podría estar relacionada con estados de RI previos al desarrollo de la DMt2. Esta hiperglucagonemia podría ser causada por defectos de la señalización del glucagón en la célula  $\alpha$ -pancreática, de aparición anterior o concomitante al inicio del defecto secretor de insulina en las células  $\beta$ -pancreáticas y que también podría participar de la hipergluconeogénesis y por lo tanto de la hiperglucemia crónica característica de la DMt2. Sin embargo, aún se requiere mayor investigación del papel de las células  $\alpha$ -pancreáticas en la etiología de la DMt2 (68).

La hiperglucemia crónica también afectan la función de la célula  $\beta$ , proceso conocido como glucotoxicidad. Además, una vez que se ha desarrollado la DMt2, este estado de hiperglucemia crónica daña ampliamente otros tejidos, generando complicaciones macro y microvasculares, principales causas de morbilidad y mortalidad de esta enfermedad (69). Las complicaciones macrovasculares de la DMt2 comprenden enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular e insuficiencia circulatoria en los miembros inferiores (70,71); mientras que dentro de las complicaciones microvasculares, se encuentran la nefropatía, neuropatía y retinopatía diabéticas (72,73). Por lo tanto, el control estricto de la glucemia es esencial no solo para prevenir las complicaciones microvasculares de la DMt2 sino también para prevenir y tratar la glucotoxicidad (66,67).

Por otro lado, en la DMt2, las concentraciones de glucosa y AGs concomitantemente elevadas de forma crónica, también se vuelven citotóxicas y ocasionan alteraciones fenotípicas en la célula  $\beta$ -pancreática que derivan incluso en muerte celular. Este proceso es conocido como glucolipototoxicidad y hasta ahora no se han desarrollado tratamientos farmacológicos eficientes para tratarlo (74,75).

Además de todos estos factores, las incretinas, como el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y el GLP-1, que son un grupo de hormonas producidas en el intestino en respuesta a la ingesta de alimentos, sobre todo los alimentos ricos en lípidos y/o carbohidratos, también forman parte del proceso etiopatológico de la DMt2.

Uno de sus efectos más importantes de las incretinas es la secreción de insulina por las células  $\beta$ -pancreáticas, el retraso en el vaciamiento gástrico y la absorción de las grasas (76). En el inicio de la historia natural de la DMt2, se observa una deficiencia de GLP-1, así como resistencia a su efecto estimulante de insulina en la célula  $\beta$ -pancreática, fenómenos que empeoran conforme progresa la enfermedad. En cambio, los niveles plasmáticos del GIP comenzaran a elevarse al mismo tiempo que también se genera resistencia a su efecto estimulante de insulina en las células  $\beta$ -pancreáticas. Debido a esto, la inhibición de la dipeptidil péptidasa 4 (DPP4), el enzima encargado de la degradación del GIP y el GLP-1, es la diana farmacéutica de algunos medicamentos antidiabéticos (66).

### **2.2.2. Abordaje terapéutico de la DM**

Al igual que en el tratamiento del SPyO, una dieta y actividad física adecuadas, son el pilar para el control de la DM (61), pero nuevamente la adherencia al cambio en el estilo de vida no es una medida fácil de llevar a cabo por los pacientes.

Además de los tratamientos farmacológicos anti-obesidad, previamente descritos, que también se utilizan para el control de la DM (antagonistas de CB1R, agonistas del receptor del GLP-1, inhibidores de la lipasa pancreática y biguanidas), existen numerosas familias de fármacos antidiabéticos que se describen brevemente en la Tabla 3, de los cuales, los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas se describen con más detalle.



**Tabla 3.-** Principales tratamientos farmacológicos para la DMt2.

Clasificación		Ejemplo	Mecanismo de acción	Efectos secundarios	Ref.
Secretagogos de la insulina	Sulfonilureas	Clorpropamida, glipizida, glibenclamida (gliburida), gliquidona, glimepirida	Estimulan la secreción pancreática de insulina.	Agotamiento de las células $\beta$ , hipoglucemia severa, infección del tracto respiratorio superior, dolor de espalda, diarrea y dolor de cabeza	(45,77)
	Inhibidores de la DPP4 (Gliptinas)	Sitagliptina, saxagliptina, linagliptina, alogliptina		Náuseas y, de forma poco frecuente, pancreatitis.	
	Agonistas del receptor del GLP-1	Exenatida, liraglutida, lixisenatida, albiglutida, dulaglutida		Náuseas, vómito, hipoglucemia, angioedema, hipersensibilidad, deshidratación, somnolencia, estreñimiento, eructos y flatulencias.	
	Meglitinidas	Repaglinida, nateglinida		Hipoglucemia y aumento de peso.	
Sensibilizadores de la insulina	Tiazolidinedio -nas	Pioglitazona, rosiglitazona	Aumentan la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina.	Incrementan el riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva y/o inducir cáncer vesical y aumento de peso.	(45)
Inhibidores de la recaptura de glucosa	Gliflozinas	Canagliflozina, dapagliflozina, empagliflozina	Inhibición del co-transportador sodio-glucosa tipo 2 renal. Actúan como cardioprotectores.	Infecciones micóticas, infecciones del tracto urinario, nasofaringitis, mayor incidencia de cáncer de vejiga y aumento en la incidencia de eventos cardiovasculares.	(45)
Inhibidores de enzimas digestivas	Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas	Acarbosa, voglibosa, miglitol	Inhiben las $\alpha$ -glucosidasas en la luz intestinal retardando la absorción de glúcidos a escala intestinal.	Flatulencias, dolor abdominal y diarrea	(78-80)

### 2.3.1.1. Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas

Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, actúan retardando la absorción intestinal de monosacáridos, reduciendo así el aumento de glucosa posprandial en sangre y la conversión de la misma a TG. Actualmente, los únicos fármacos aprobados con este mecanismo de acción son la acarbosa, la voglibosa y el miglitol. Sin embargo, el uso de estos últimos no se encuentra muy difundido y requiere mayores investigaciones (81). En la Tabla 4 se resumen algunos ensayos clínicos con acarbosa.

En general, los estudios clínicos con acarbosa (un pseudo-tetrasacárido que actúa como un inhibidor competitivo de las  $\alpha$ -glucosidasas), muestran resultados contradictorios respecto al efecto significativo en la pérdida de peso corporal (82,83). En concordancia, el metaanálisis Cochrane, mostró una reducción significativa del IMC, aunque no se encontró ningún efecto sobre el peso corporal. Sin embargo, en otro metaanálisis se observó una reducción de 0,96 kg en el grupo experimental. Además, una revisión de los datos de los estudios mundiales de acarbosa informó una reducción de peso de 0,98 kg en pacientes con sobrepeso y de 1,67 kg en obesos después de 3 meses de tratamiento de forma independiente al control de la glucemia (88).

Aunque los estudios sobre la eficacia en el tratamiento del SPyO con acarbosa concluyen que éste fármaco no provocan una reducción de peso tan efectiva como otros fármacos, pero si generan beneficios en la regulación de otros parámetros metabólicos y cardiovasculares, por lo que es utilizado en la prevención (en pacientes pre-diabéticos) (86,87) y en el tratamiento de la DMt2, especialmente aquellos con control basal adecuado pero con hiperglucemia postprandial persistente (78,89). Esto es particularmente importante porque aunque la hiperglucemia en ayunas es un problema recurrente en la DM, el conocimiento de los mecanismos moleculares que la regulan han permitido desarrollar estrategias farmacológicas medianamente efectivas (66). Sin embargo, un conjunto más complejo de mecanismos (mediados principalmente por la acción simultánea de insulina, amilina, GLP-1, glucagón, grelina y leptina, entre otras moléculas) desempeñan un papel importante durante la ingesta de alimentos, por lo que el control de la hiperglucemia posprandial continua siendo una de las principales necesidades insatisfechas en el tratamiento de la DM (89).

**Tabla 4.-**Ensayos clínicos con acarbosa en pacientes con DMt2 o intolerancia a la glucosa.

Nombre y duración del estudio	Número y tipo de pacientes	Tratamiento	Medidas de eficacia	Resultados encontrados	Ref.
OPENING 16 semanas	172 pacientes con DMt2	Insulina 0.3-0.4 UI/kg y metformina $\geq$ 1000 mg/día o acarbosa $\geq$ 150 mg/día <sup>2</sup>	Peso corporal, glucosa en ayunas, HbA1c y dosis diaria de insulina	Los pacientes que alcanzaron HbA1c <7 %, la disminución de los niveles de glucosa, la incidencia de hipoglucemia y el incremento de peso corporal fueron mejores que los valores basales, pero estadísticamente iguales en ambos grupos. Sin embargo, el consumo de insulina fue mayor en el grupo con metformina (33 contra 30 UI).	(82)
MARCH 24 semanas	784 pacientes recién diagnosticados con DMt2	Acarbosa 100 mg tres veces al día o metformina 1500 mg/día	Peso corporal, cambios en el GLP-1	Se encontró incremento del GLP-1 y la pérdida de peso (y su asociación directa) solo en el grupo con acarbosa.	(83)
Wang <i>et al.</i> 24 semanas	50 pacientes con DMt2 con 8 semanas de monoterapia con metformina 500 mg tres veces al día.	Acarbosa 100 mg tres veces al día o glibenclamida 5 mg tres veces al día por 16 semanas.	Fluctuación glucémica de 72 horas y HbA1c	Se observó disminución (o mejora) de la fluctuación glucémica en 72 horas solo en el grupo con acarbosa. Además esta mejora se correlaciona con la reducción de HbA1c ( $\geq$ 1 %).	(84)
SMART 24 semanas	488 pacientes con DMt2 con monoterapia con meformina	Saxagliptina 5 mg/día o acarbosa 50-100 mg tres veces al día.	HbA1c < 7.0 % sin eventos gastrointestinales	Ambas terapias tuvieron perfiles de eficacia similares (HbA1c: -0.82 con saxagliptina contra -0.78 % con acarbosa). Sin embargo, la saxagliptina se asoció con menos eventos adversos (37 contra 28 % de pacientes) respecto a la acarbosa.	(85)
STOP-NIDDM 3.3 (1.2) años	1368 pacientes con intolerancia a la glucosa	Pacebo o acarbosa 100 mg, tres veces al día	Desarrollo de eventos cardiovasculares <sup>1</sup> e hipertensión.	Reducción del 49 % en el riesgo relativo de desarrollar eventos cardiovasculares, principalmente infarto al miocardio y del 34 % en el riesgo relativo de desarrollar hipertensión.	(86)
ACE 5 años	Pacientes con intolerancia a la glucosa y enfermedad coronaria establecida.	Acarbosa o placebo 50 mg tres veces al día	Frecuencia de eventos cardiovasculares <sup>3</sup> e incidencia de DMt2	La incidencia de DMt2 fue 18 % menor en el grupo con acarbosa. Para el resto de los parámetros no se encontraron diferencias significativas.	(87)

<sup>1</sup> Enfermedad coronaria, muerte cardiovascular, insuficiencia cardíaca congestiva, evento cerebrovascular y enfermedad vascular periférica.

<sup>2</sup> UI = Unidades internacionales.

<sup>3</sup> Infarto de miocardio fatal o no fatal, accidente cerebrovascular fatal no fatal, ingreso hospitalario por angina inestable e ingreso hospitalario por insuficiencia cardíaca.

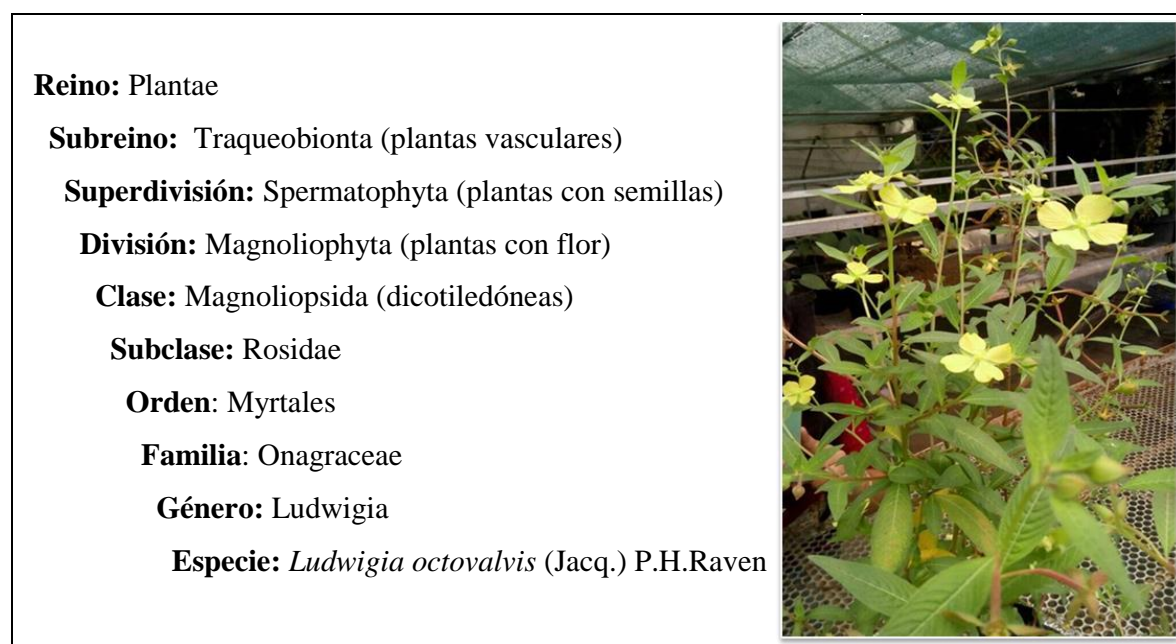
En general, el tratamiento con acarbosa ha demostrado proporcionar beneficios sobre los niveles de lípidos, presión arterial, factores de coagulación, grosor de la capa intima de la carótida, disfunción endotelial, HbA1c, glucosa sérica (en ayunas y postprandial) y los niveles de insulina postprandial (88).

En cuanto al miglitol, cada vez hay más pruebas de que no solo es efectivo en el control glucémico, sino también en la disminución de la RI y la reducción de peso corporal, llegando a considerarse un sustituto útil del tratamiento de SPyO con orlistat en pacientes con síndrome de malabsorción crónica o colestasis. Sobre este último efecto se han formulado algunas hipótesis sobre otros mecanismos de acción, diferentes a la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas, que aún se continúan investigando (81). Respecto a la voglibosa, se ha reportado que tiene un efecto inhibitorio menor sobre la  $\alpha$ -glucosidasas en comparación con la acarbosa y el miglitol. Sin embargo, tiene la ventaja de tener menos efectos adversos gastrointestinales y puede usarse en pacientes con enfermedad renal crónica. A pesar de ello se requieren más estudios clínicos sobre su seguridad (90).

Pese a sus múltiples beneficios, los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas tienen efectos secundarios gastrointestinales, como flatulencias, dolor abdominal y diarrea debido a la acción de las bacterias en los carbohidratos no digeridos, lo cual resulta en el abandono de la terapia por algunos pacientes, por lo que la búsqueda de agentes efectivos pero con menos efectos secundarios aún continúa (80).

### 3. *Ludwigia octovalvis*

*Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P.H.Raven [syn: *Jussiaea suffruticosa* L., *Jussiaea pubescens* L., *Jussiaea angustifolia* Lamk], conocida comúnmente en el estado de Morelos como “Clavillo”, es una planta acuática (helófito) muy común en lugares húmedos, especialmente en las orillas de canales de riego (91) (Figura 1). Por su rápido crecimiento, su alta producción de semillas y su capacidad de crecimiento a partir de especímenes cortados hasta la raíz, esta maleza es considerada una amenaza significativa para la producción de ciertos cultivos como el arroz (92).



**Figura 1.**-Clasificación taxonómica y fotografía de *Ludwigia octovalvis*.

Las fuentes consultadas no especifican de donde es originaria, aunque las bases de datos norteamericanas la clasifican como nativa. En México se ha registrado su distribución en los estados de Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Veracruz y Yucatán (93). También se ha registrado su presencia en las islas del Pacífico, Asia Meridional y Central, Australia y gran parte de África (94).

### **3.1. Botánica**

*L. octovalvis* es una hierba erecta de 40 a 90 cm de alto, con tallo cilíndrico, glabrescente hasta variadamente piloso en las ramas jóvenes. Tiene hojas oblongo-lanceoladas de 10 cm de largo, subsésiles, ligeramente pilosas y flores solitarias, axilares; cáliz de 4 sépalos variadamente pilosos; corola con 4 pétalos amarillos, cuneiforme-obovados y 8 estambres; anteras oblongas. Su fruto es una cápsula variadamente pilosa, claviforme, con semillas pluriseriadas en cada lóculo, no rodeadas por el endocarpio persistente (95).

### **3.2. Aplicaciones etnomédicas**

Casi todas las partes de la planta reportan varios usos medicinales, las hojas se utilizan en forma de emplasto, en el tratamiento de la orquitis, el dolor de cabeza, glándulas en el cuello, y enfermedades nerviosas. La planta entera, reducida a pulpa y remojada en suero de leche, se utiliza en el tratamiento de diarrea y disentería; mientras que la decocción funciona como astringente (en la hemoptisis y leucorrea), carminativo, diurético y vermífugo, y el jugo de la planta entera es útil para tratar la fiebre, ictericia y diabetes (96,97).

De acuerdo con otras fuentes también se utiliza para tratar edema, nefritis, hipertensión (98) y en África, la planta es utilizada para tratar artritis reumatoide.

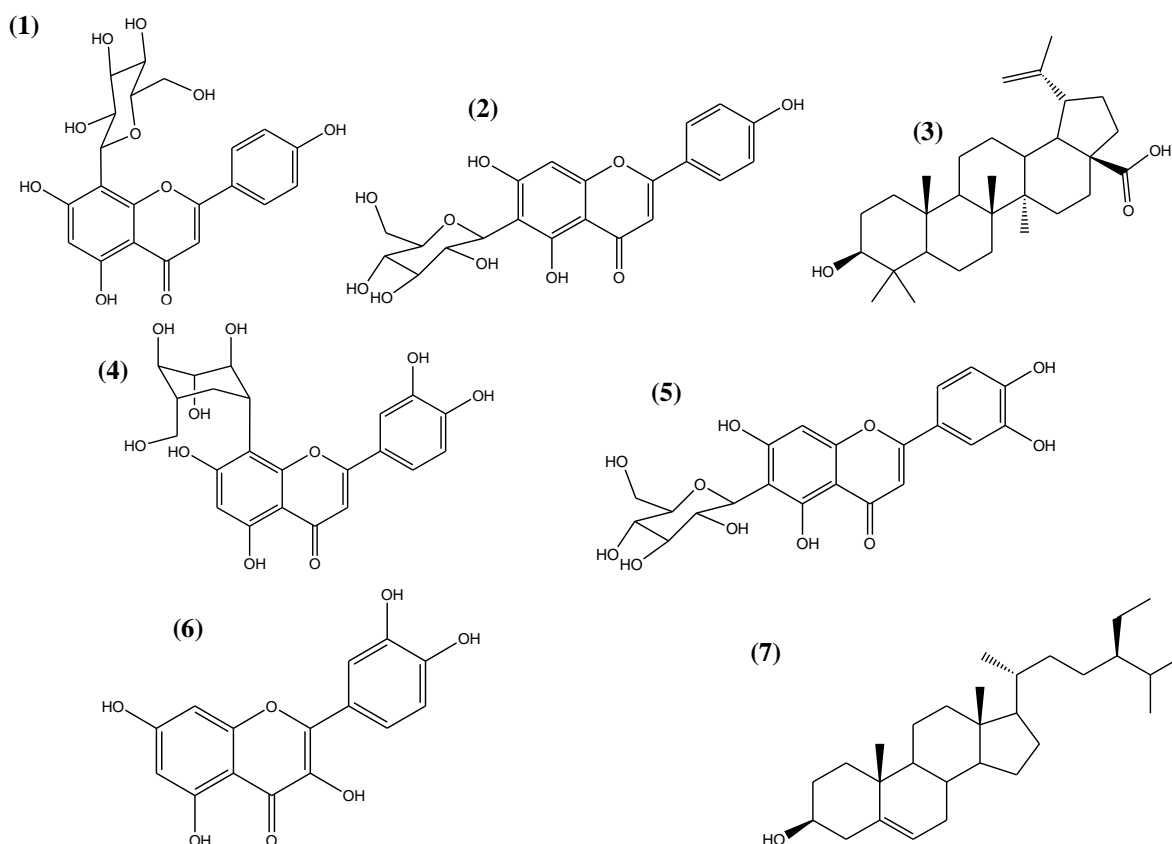
Los usos medicinales que se le atribuyen a esta planta en Morelos, Veracruz y Oaxaca, son el tratamiento de afecciones de la piel, como infecciones, erisipela, granos y roña. Para las infecciones de la piel, se aplican las hojas previamente calentadas y remojadas en alcohol; en casos de roña, se prepara una pomada con la planta macerada que se mezcla con manteca y azufre (99).

Además es utilizada como antidiabético por sanadores y distribuidores de plantas del sur del estado de Morelos, principalmente en los municipios de Xochitepec, Jojutla y Zacatepec (100).

### 3.3. Fitoquímica

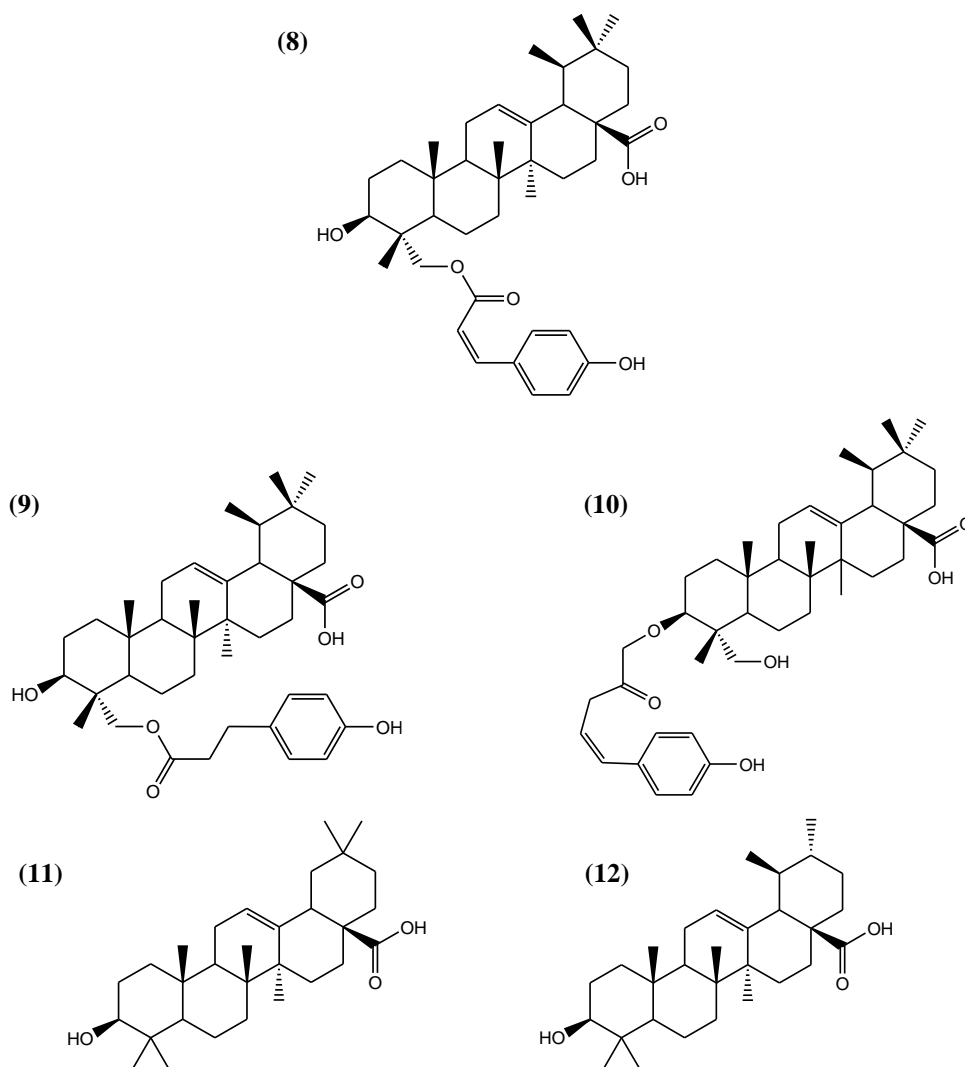
Esta especie ha sido estudiada químicamente en diversas ocasiones, encontrándose principalmente flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas, esteroides y taninos (101). También se han descrito una gran variedad de alcanos de cadena larga y AGs (94) además de compuestos volátiles inducidos por depredación de insectos (92).

Averett *et al.* (102) detectó la presencia de cuatro flavonoides: vitexina **1**, isovitexina **2**, orientina **3** e isorientina **4**. Posteriormente se reportó el aislamiento de ácido betulínico **5**, quercetina **6** y  $\beta$ -sitosterol **7** a partir de un extracto hidrometanólico al 80% (96). Las estructuras químicas de estos compuestos se representan en la Figura 2.



**Figura 2.**-Estructura química de los compuestos identificados en *L. octovalvis*: vitexina **1**, isovitexina **2**, orientina **3**, isorientina **4**, ácido betulínico **5**, quercetina **6** y  $\beta$ -sitosterol **7**.

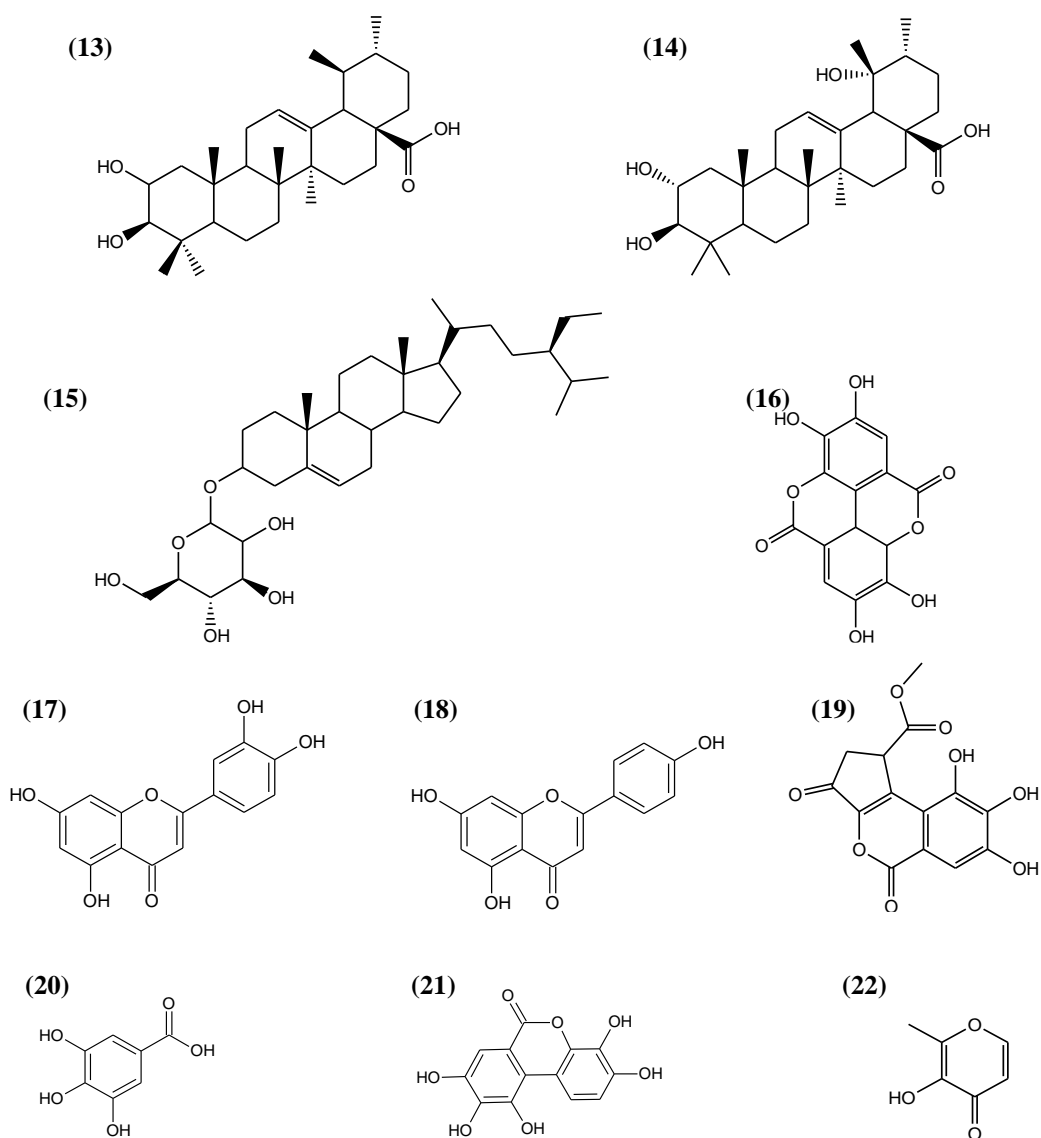
Posteriormente se reportaron tres triterpenos de tipo oleanano nuevos: 23Z-cumaroilhederagenina **8**, 23E-cumaroilhederagenina **9** y 3Z-cumaroilhederagenina **10**. Así como ácido oleanólico **11** y ácido ursólico **12** (103). Las estructuras químicas de estos compuestos se representan en la Figura 3.



**Figura 3.-** Estructura química de los compuestos identificados en *L. octovalvis*: 23Z-cumaroilhederagenina **8**, 23E-cumaroilhederagenina **9**, 3Z-cumaroilhederagenina **10**, ácido oleanólico **11** y ácido ursólico **12**.



En 2005 se describieron otros diez compuestos fitoquímico: ácido 2  $\alpha$ -hidroxi ursólico **13**, ácido tormentico **14**, daucosterol **15**, ácido elágico **16**, luteolina **17**, apigenina **18**, brevifolincarboxilato de metilo **19**, ácido gálico **20**, el 3,4,8,9, dibenzo 10-polihidroxi [b,d] piran-6-ona **21** y maltol **22** (104). Las estructuras químicas de estos compuestos se representan en la Figura 4.



**Figura 4.-** Estructura química de los compuestos identificados en *L. octovalvis*: ácido 2  $\alpha$ -hidroxi ursólico **13**, ácido tormentico **14**, daucosterol **15**, ácido elágico **16**, luteolina **17**, apigenina **18**, brevifolincarboxilato de metilo **19**, ácido gálico **20**, 3, 4, 8, 9, dibenzo 10-polihidroxi [b,d] piran-6-ona **21** y maltol **22**.

### 3.4. Farmacología

*Ludwigia octovalvis* ha sido estudiada mediante diversos modelos biológicos *in vitro* e *in vivo*, que se resumen en las Tablas 5, 6 y 7.

**Tabla 5.-**Estudios farmacológicos *in vitro* de diferentes extractos de *L. octovalvis*.

Extracto, fracción o compuesto evaluado	Concentración evaluada	Modelo farmacológico	Resultados	Ref.
Extracto hidroalcohólico (solo del rizoma)	1 mg/mL	Actividad antihepatotóxica con toxicidad inducida por tetracloruro de carbono o D-galactosamina.	<i>L. octovalvis</i> se encontró dentro de las 8 plantas que lograron más del 50 % de hepatoprotección en ambos modelos, de un total de 129 plantas evaluadas.	(105)
Tres triterpenos tipo oleanano (compuestos <b>8</b> , <b>9</b> y <b>10</b> )	1.2- 3.6 $\mu$ M	Citotoxicidad en las líneas celulares KB y HT29.	Los tres compuestos mostraron actividades similares al fármaco contra el cáncer Etoposido ( $\approx$ 1.1 y 2.3).	(103)
Extractos etanólico y acuoso	0 – 200 $\mu$ g/mL	Viabilidad celular (ensayo MTT) de adipocitos 3T3-L1	Los tratamientos con mayor actividad fueron el extracto etanólico (CI <sub>50</sub> = 43.17 $\mu$ g/mL), la fracción de acetato de etilo (CI <sub>50</sub> = 33.38 $\mu$ g/mL) y la clorofila a (CI <sub>50</sub> = 24 nM). La actividad de la clorofila a es considerada potente.	(91)
Fracciones de acetato de etilo y acuosa				
Clorofila a				
Extracto hidroalcohólico	0.5 mg/mL	Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas	El extracto mostró las actividades inhibitorias más altas en ambos modelos (CI <sub>50</sub> =202 y 288 $\mu$ g/mL) respecto a 22 extractos de otras especies.	(100)
	0.25 mg/L	Inhibición de lipasa pancreática		
Extractos hexánicos, clorofórmicos, de acetato de etilo y metanólicos. De tallos, hojas y raíces.	1 mg/mL en el método de difusión en disco. 1000-7.8 $\mu$ g/mL en el método de microdilución en caldo.	Actividad antibacteriana contra 6 especies de bacterias Gram positivas y 6 de Gram negativas.	El extracto metanólico de hojas dio la CIM y la CBM (62.5 y 125 $\mu$ g/mL) más bajas de los 12 extractos, contra <i>E. coli</i> y <i>Bacillus spizizenii</i> . Mientras que el extracto metanólico de raíz dio valores similares de CIM y CBM contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>1</sup> .	(106)
Extracto etanólico	0.38-100 $\mu$ g/mL	Captación de glucosa en células musculares.	El extracto mejoró la captación de glucosa en las células musculares y disminuyó la producción de glucosa en las células hepáticas. Mientras que el $\beta$ -sitosterol solo tuvo efecto en la captación de glucosa.	(107)
$\beta$ -sitosterol <b>7</b>		Producción de glucosa en células hepáticas.		

<sup>1</sup> CIM = Concentración Inhibitoria Mínima; CBM = Concentración Bactericida Mínima.

**Tabla 6.-**Estudios farmacológicos *in vivo* de diferentes extractos de *L. octovalvis*.

Extracto, fracción o compuesto evaluado	Concentración o dosis evaluada	Modelo farmacológico	Resultados	Ref.
Extracto etanólico	0.1 g/kg de peso corporal	Curva de tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos inducidos por STZ <sup>1</sup> o por dieta alta en grasas. Reconocimiento de objetos en ratones diabéticos inducidos con dieta alta en grasas	En los ratones diabéticos inducidos por STZ, tanto el extracto como el $\beta$ -sitosterol indujeron un efecto antihiper glucémico comparable al de la metformina. El extracto también mejoró el control glucémico y el rendimiento de la memoria de los ratones alimentados con la dieta alta en grasas.	(108)
$\beta$ -sitosterol 7	0.04 g/kg de peso corporal			
$\beta$ -sitosterol 7 y escualeno	200 o 400 mg/kg de peso corporal durante una semana antes de la infección y 14 días después.	Infección de ratones con <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y posterior análisis de las inmunoglobulinas G y M.	Incremento significativo de la inmunoglobulina A, a partir del día 7 con 400 mg/kg.	(109)
Extracto etanólico	Soluciones a 50, 100, y 1000 $\mu$ g/mL (sobre el alimento) <i>ad libitum</i> .	Reconocimiento de objetos en ratones SAMP8.	El extracto a 50 y 100 $\mu$ g/mL aumentó la memoria de forma similar a la restricción dietética a partir de los 3 meses de tratamiento.	(107)
		Ensayos de vida útil y asociación Pavloviana de memoria olfativa a corto plazo en <i>D. melanogaster</i> con dieta alta y baja en calorías.	Todas las concentraciones del extracto extendieron la vida útil, de forma similar a la restricción dietética.	
$\beta$ -sitosterol 7 y escualeno	Soluciones a 10 y 100 $\mu$ g/mL (sobre el alimento) <i>ad libitum</i> .		El $\beta$ -sitosterol 7 extendió la vida útil en el grupo sin restricción calórica de manera dosis dependiente. El escualeno no tuvo ningún efecto.	

<sup>1</sup> STZ = Estreptozotocina

**Tabla 7.-**Estudios farmacológicos *in vivo* de extractos metanólicos de *L. octovalvis*.

Dosis evaluada	Modelo farmacológico	Resultados	Ref.
200, 300 y 400 mg/kg de peso corporal	Medición de la ansiedad mediante: observación del comportamiento general y exploratorio, de la coordinación motriz y de la respuesta táctil, de sonido y al dolor en ratas y ratones. Medición del tiempo de sueño inducido por fenobarbital sódico en ratas y ratones.	El extracto causó una reducción en la actividad espontánea, en el comportamiento exploratorio, en la coordinación motriz. También potenció el tiempo de sueño inducido por fenobarbital.	(110)
100, 200 y 300 mg/kg peso corporal	Pirexia inducida por levadura en ratas	EL extracto ocasionó una reducción significativa de la pirexia de forma dosis dependiente y comprable con el efecto del paracetamol.	(111)
100, 200 y 300 mg/kg peso corporal	Diarrea inducida por aceite de ricino en ratas. Diarrea producida por la prostaglandina E2. Prueba de motilidad gastrointestinal con carbón en ratas.	El extracto mostró actividad antidiarreica significativa dosis dependiente en ambos modelos y a la dosis más alta es comparable con el difenoxilato. También mostró una reducción significativa en la motilidad gastrointestinal.	(112)
200 y 400 mg/kg de peso corporal	Medición de glucosa en ratas normales y ratas diabéticas inducidas con aloxano.	El extracto presentó actividad hipoglucémica y anti-hiperglucémica comparable con la glibenclamida en ambos modelos.	(113)
200 y 400 mg/kg de peso corporal	Tos inducida por gas de dióxido de azufre en ratones.	El extracto mostró disminución del reflejo de tos (48.52% y 59.8 %) en ambas concentraciones, comparables con el efecto del fosfato de codeína.	(114)
5000 mg/kg de peso corporal	Toxicidad aguda en ratones BALB/c	No se produjo mortalidad, morbilidad o modificación de las características histológicas <sup>1</sup> . Aumento en el recuento de leucocitos y disminución de los niveles de ALT, AST y ALP <sup>2</sup> con 400 mg/kg.	(101)
200, 400 y 800 mg/kg de peso corporal, 1 vez al día durante 28 días	Toxicidad subaguda en ratones BALB/c	Disminución del colesterol total con 800 mg/kg.	

<sup>1</sup> De hígado, riñón, bazo, pulmón y corazón.

<sup>2</sup> ALT = Aspartato aminotransferasa; AST = Alanino aminotransferasa; ALP = Fosfatasa alcalina.

Además de las actividades descritas en las Tablas 5, 6 y 7, de acuerdo con Murugesan *et al.* el extracto metanólico de *L. octovalvis* también inhibe la replicación del virus HIV-I (IIIB) en células MT-4, tiene actividad como diurético y anti-inflamatorio (en el edema inducido por carragenina y serotonina así como en el granuloma inducido por algodón) en ratas (96).

Con relación a la toxicidad de *L. octovalvis*, en un estudio reportado en 2012, se investigó la toxicidad aguda y subaguda de un extracto metanólico de hojas de *L. octovalvis* en ratones, encontrándose que la administración vía oral de 5000 mg/kg, en el modelo de toxicidad aguda, y hasta 800 mg/kg, en el modelo de toxicidad subaguda, no ocasionó letalidad, efecto toxicológico o cambios significativos en los órganos internos. Sin embargo, una de sus dosis aumentó significativamente el recuento de glóbulos blancos y al mismo tiempo disminuyó la ALT, AST y ALP (101). Estos resultados podrían indicar actividad hepatoprotectora, que correlaciona con un reporte anterior en el que esta especie fue una de las más activas en dos modelos *in vitro* (105).

Una de las actividades más sobresalientes reportadas para *L. octovalvis* que se relacionan con el tratamiento del SPyO y la DMt2, son la actividad anti-proliferativa en adipocitos 3T3-L1 (91). Además, en años recientes, se describieron los efectos anti-envejecimiento, protectores del deterioro cognitivo y de mejora en el control glucémico (por actividad hipoglucemiante y antihiper glucémica) del extracto etanólico de *L. octovalvis*, en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, especialmente en los que se indujo dieta hipercalórica, además se determinó que el efecto se debe, al menos en parte, a la activación de AMPK (106,107). Los efectos sobre la glucemia de esta especie ya habían sido reportados anteriormente (113), lo que corrobora aún más este efecto.

En cuanto a su actividad inhibitoria de enzimas involucradas en la absorción de nutrientes, Ramírez *et al.* (100) reportaron el efecto inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasas y lipasa pancreática de 23 plantas medicinales reportadas como tratamientos tradicionales para la DM, entre ellos *L. octovalvis*. Todos los extractos hidroalcohólicos de las plantas se evaluaron a 0.5 mg/mL para la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas y a 0.25 mg/mL para la actividad inhibitorias de lipasa, con los mismos métodos de evaluación empleados en el presente trabajo; como controles positivos también se utilizaron *Camellia sinensis* y acarbosa. *L. octovalvis* mostró la más alta inhibición de los 23 tratamientos evaluados para ambas enzimas, con un 61.3 % de inhibición y una  $CI_{50}=202$  mg/mL para la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas y 31.4 % de inhibición y una  $CI_{50}=288$  mg/mL para la actividad de la lipasa. *C. sinensis* mostró una inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas del 67.3 % con una  $CI_{50}=299$  mg/mL, mientras que para lipasa mostró inhibición de 45 % y una  $CI_{50}=310$  mg/mL.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante las últimas décadas, a nivel global, se ha visto un incremento alarmante en el número de pacientes obesos o con sobrepeso y con DMt2, considerando estos padecimientos como una epidemia desde la década de los 90s. El uso de una dieta balanceada, realizar actividad física regular y el uso de los fármacos disponibles en el sector salud no han sido suficientes para frenar estas tendencias en el incremento de la obesidad, la DMt2 y sus complicaciones.

La elevada problemática social y económica que genera la obesidad y la DMt2 en los diferentes gobiernos del mundo, así como las comorbilidades de esta nueva epidemia, requiere que se sigan buscando nuevas alternativas que coadyuven en su terapia en conjunto con los tratamientos actuales, entre los que destacan los inhibidores de los enzimas digestivos, como las  $\alpha$ -glucosidasas y la lipasa pancreática, encargados de la absorción de azúcares y lípidos en el sistema entérico.

*L. octovalvis* es una planta que se usa ampliamente en la medicina tradicional, algunos de sus aplicaciones etnomédicas incluyen su uso como antidiabético. Estudios científicos han demostrado que algunos extractos etanólicos de esta especie tiene actividad anti-proliferativa de adipocitos y anti-hiperglucémica, además un extracto metanólico también reportó actividad anti-hiperglucémica además de hipoglucemiante. Además, el extracto hidroalcohólico de *L. octovalvis* mostró la más alta actividad inhibitoria de lipasa y  $\alpha$ -glucosidasas en un cribado de 23 plantas medicinales reportadas como tratamientos tradicionales para la DM.

Debido a esto es importante continuar con el estudio sistemático de esta especie, determinando la identidad de los compuestos químicos responsables de estas actividades biológicas y caracterizándolos farmacológicamente. Debido a que, a futuro, esto permitiría diseñar un fitomedicamento, capaz de inhibir la absorción de carbohidratos y lípidos, efectivo y seguro para el manejo del SPyO y de la DMt2, estandarizado en el o los compuestos más activos.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo general

Aislar, elucidar estructuralmente y caracterizar la molécula con mayor actividad inhibitoria de lipasa pancreática y la molécula con mayor actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas en el extracto hidroalcohólico de *L. octovalvis*.

### 2. Objetivos específicos

- Diseñar una estrategia biodirigida para el fraccionamiento químico del extracto hidroalcohólico de hojas de *L. octovalvis* mediante la evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de lipasa pancreática y la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas.
- Identificar y aislar el compuesto o grupo de compuestos responsables de la actividad inhibitoria de lipasa pancreática y el compuesto o grupo de compuestos responsables de la actividad inhibitoria de las  $\alpha$ -glucosidasas.
- Elucidar la estructura química del compuesto o grupo de compuestos responsables de la actividad inhibitoria de lipasa pancreática y del compuesto o grupo de compuestos responsables de la actividad inhibitoria de las  $\alpha$ -glucosidasas.
- Cuantificar el compuesto con mayor actividad inhibitoria de lipasa pancreática en el extracto hidroalcohólico y el compuesto con mayor actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas en el extracto hidroalcohólico.
- Calcular la  $CI_{50}$  del compuesto más activo responsable de la actividad inhibitoria de lipasa pancreática y del compuesto más activo responsable de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas.
- Identificar el tipo de inhibición enzimática del compuesto más activo responsable de la actividad inhibitoria de lipasa pancreática y del compuesto más activo responsable de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas.

## **HIPÓTESIS**

Debido a que el extracto hidroalcohólico de *L. octovalvis* produce un efecto inhibidor de la lipasa pancreática y de las  $\alpha$ -glucosidasas su estudio químico biodirigido permitirá el aislamiento, elucidación estructural y caracterización de al menos un compuesto químico responsable de estos efectos biológicos.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Preparación de extractos**

El material vegetal fue colectado en Xochitepec, Morelos. (18°47'40.70" N y 99°11'49.27" W, 1,185 msnm). Se prepararon los correspondientes ejemplares para herbario, cuya identificación taxonómica fue realizada por el M. en C. Gabriel Flores Franco, quien funge como curador del herbario HUMO en el Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIByC-UAEM), los ejemplares fueron asignados a los números de folio 34667 y 34668.

Para la elaboración del extracto se emplearon únicamente las hojas de la planta, que fueron secadas a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad y trituradas en un molino eléctrico. Posteriormente se realizó el proceso de extracción mediante maceración en una solución 40:60 agua/etanol a temperatura ambiente, por un periodo de 24 horas, repitiéndose el proceso en dos ocasiones. El extracto fue filtrado y concentrado mediante destilación a presión reducida hasta un volumen mínimo para su posterior secado por liofilización. Después de calcular el rendimiento, el extracto se almacenó en un frasco sellado, hasta su posterior uso.

Como control vegetal positivo de la evaluación de las dos actividades inhibitorias, se utilizó un extracto hidroalcohólico de *Camelia sinensis* (CsHA), utilizando hojas secas, adquiridas en una presentación comercial (Yamamotoyama, Pomona, EUA), que fue preparado utilizando el mismo procedimiento de extracción que se utilizó para *L. octovalvis*.

### **2. Separación líquido-líquido**

El extracto hidroalcohólico de *L. octovalvis* (LoHA) fue sometido a un proceso de fraccionamiento líquido-líquido usando agua y acetato de etilo como disolventes inmiscibles. La fracción orgánica fue concentrada a sequedad mediante el proceso de destilación a presión reducida (rotaevaporador) y la fracción acuosa se secó mediante liofilización. Ambos tratamientos fueron almacenados en frascos sellados hasta que se realizaron las evaluaciones biológicas.

### 3. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta

La fracción que resultó más activa en la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas y de lipasa pancreática, se sometió a un proceso de fraccionamiento químico mediante la técnica de cromatografía en columna abierta.

Para la primera cromatografía en columna se utilizó sílica gel 60 como fase estacionaria y un sistema de gradiente diclorometano/metanol como fase móvil. Para el resto de las columnas se utilizó sílica gel de fase reversa como fase estacionaria y una mezcla de agua/acetonitrilo como fase móvil.

En ambos casos se utilizó la cromatografía en capa fina (CCF) para llevar a cabo el seguimiento del fraccionamiento químico así como para decidir cuáles de las fracciones podían agruparse con base en su contenido químico. Para ello se utilizaron láminas de aluminio con Sílica gel 60 RP-18 F254s (105560-Merck KGaA).

Las placas de CCF fueron analizadas bajo luz ultravioleta (UV) a 254 y 360 nm. Como sistema de detección química se utilizó el Reactivo de Productos Naturales-Polietilenglicol (RPN-PEG), que consiste en una solución metanólica de difenilboriloxietilamina al 1 % seguida de una solución de polietilenglicol (USP, 1546580) al 5 %. Este reactivo es útil para la detección de varios compuestos fitoquímicos, especialmente flavonoides mediante el cambio de coloración de la muestra sobre la placa (115). También se utilizó una solución de sulfato cérico (359009, Aldrich) al 1% en ácido sulfúrico (339741, Aldrich) 2N para la detección de compuestos fitoquímicos en general (116).

Al finalizar el proceso de fraccionamiento, las fracciones con mezclas diferentes de compuestos se prepararon para su evaluación en los modelos de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas y lipasa pancreática.

La fracción más activa fue nuevamente sujeta a este proceso químico-bio-dirigido hasta encontrar el principio activo responsable de las actividades inhibitorias.

#### 4. Análisis por HPLC

Los análisis por cromatografía líquida de alta eficacia o *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) se realizaron en un equipo marca Waters equipado con un detector de arreglo de fotodiodos Waters 2996 UV (900) a 280 nm, empleando el software Empower Pro y una columna empacada SUPELCOSIL (LC-F®, 25 cm x 4.6 mm; 5 µm). Como fase móvil se utilizó un sistema de gradiente de ácido trifluoroacético al 0.5 % y acetonitrilo, que se detalla en la Tabla 8, a un flujo de 0.9 mL/min y un volumen de inyección de 10 µl.

**Tabla 8.-**Sistema de gradiente de la fase móvil del procedimiento de HPLC

Tiempo (minutos)	% ácido trifluoroacético al 5 %	% acetonitrilo
0-1	100	0
2-3	95	5
4-7	70	30
8-22	50	50
23	20	80
24-26	0	100
27-30	100	0

Para la cuantificación de los compuestos más activos, se inyectaron cuatro concentraciones de cada compuesto (25, 50, 100 y 200 µg/mL) y se analizaron sus perfiles cromatográficos a 270 nm para obtener por triplicado el área bajo la curva de cada pico, construir sus respectivas curvas de calibración y obtener ecuaciones que permitan relacionar las áreas bajo la curva con la concentración. El extracto hidroalcohólico y la fracción orgánica resultante de la bipartición de acetato también fueron analizados por HPLC a una concentración de 3 mg/mL y se obtuvo el área bajo la curva de los picos correspondientes a cada compuesto para calcular el porcentaje de compuesto en cada tratamiento.

## 5. Elucidación estructural por métodos espectroscópicos

Las estructuras de los compuestos aislados a partir de las fracciones que presentaron mayor actividad inhibitoria fueron elucidadas empleando el análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de una dimensión: RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ , además de RMN de dos dimensiones.

Para ello se usó un espectrómetro marca Agilent DD2 (Agilent Technologies, EUA) de 600 MHz, de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Para el análisis de los espectros se utilizó el software ACD/Labs y para la interpretación de los resultados se recurrió a la literatura (117).

## 6. Cuantificación *in vitro* de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática

Para este ensayo se prepararon todas las reacciones por triplicado y se incluyó un control negativo (disolvente de los extractos evaluados), un control vegetal positivo de *C. sinensis*, así como un fármaco control (orlistat) que fue purificado a partir del medicamento comercial Lysthin® (Psicopharma) y disuelto en etanol a una concentración de 40  $\mu\text{g/mL}$ .

Para la purificación del fármaco se trituró una tableta con 120 mg de orlistat, se añadieron 65 mL de etanol y se agitó durante 5 minutos; el precipitado se separó del sobrenadante por centrifugación y decantación. El sobrenadante fue concentrado hasta la cristalización mediante destilación a presión reducida.

Este ensayo fue adaptado por Ramírez *et al.* (100), del método espectrofotométrico indirecto reportado por Choi *et al.* (118), empleando el reactivo 2,3-dimercapto-1-propanol tributirato (DMPTB; 282413, Aldrich) 0.2 mM como sustrato y ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB; D-8130, Sigma) 0.8 mM. El cambio en la coloración de la reacción fue seguida con un espectrofotómetro a 412 nm.

Además, a la mezcla de reacción se le adicionó: NaCl 0.1M,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, Tritón X-100 0.04 % y 65  $\mu\text{g/mL}$  del enzima lipasa pancreática de cerdo tipo II (L3126, Sigma) y Tris-HCl pH = 7 en un volumen final de 1 mL.

El extracto vegetal a evaluar en cada reacción se añadió a una concentración final de 0.25 mg/mL (25  $\mu$ L), mientras que el orlistat se añadió a 2  $\mu$ M (1  $\mu$ g/mL; 25  $\mu$ L) estas concentraciones fueron previamente establecidas como concentraciones adecuadas para ver un aproximado de 50 % de inhibición en este ensayo por Ramírez *et al.* (100,119).

El cambio en la absorbancia de la mezcla de reacción, se registró cada 20 segundos y se graficó utilizando el programa Excel. La pendiente de la gráfica representa la velocidad inicial ( $V_0$ ) de la reacción enzimática, de acuerdo con la teoría de Michaelis-Menten (120). La actividad inhibitoria se reportó como el porcentaje residual de actividad enzimática, considerando como el 100 % de actividad enzimática la  $V_0$  del control negativo.

#### **7. Cuantificación *in vitro* de la actividad inhibitoria de las $\alpha$ -glucosidasas**

Para realizar este ensayo, la extracción del enzima, se llevó a cabo el método desarrollado en el CIBIS-IMSS por Ramírez *et al.* (100). De manera breve, se sacrificaron ratas Wistar hembras adultas con peso mayor a 200 g, se extrajo su intestino delgado y se obtuvo la mucosa del mismo por raspado en frío; la mucosa se homogenizó y conservó a 4 °C.

Todas las reacciones se prepararon por cuadruplicado, incluyendo un control negativo (disolvente de los extractos evaluados), el extracto o fracciones a evaluar y un control vegetal positivo de *C. sinensis*, así como un fármaco control (acarbose).

Las soluciones de acarbose se prepararon a partir de un purificado del medicamento genérico Sincrosa® (Alpharma) disuelto en etanol a las concentraciones de 5 y 250 mg/mL. Para la purificación del fármaco se trituró una tableta con 100 mg de acarbose, se añadieron 65 mL de etanol y se agitó durante 5 minutos; el precipitado se separó del sobrenadante por centrifugación y decantación. El sobrenadante fue concentrado hasta la cristalización mediante destilación a presión reducida.

Cada reacción contenía una solución amortiguadora de fosfatos pH 7, una solución de almidón de maíz (SIGMA S-4186) a 25 mg/mL, la muestra a evaluar (16  $\mu$ L) a una concentración final de 0.6 mg/mL, o a 15  $\mu$ M (10  $\mu$ g/mL) en el caso del control negativo acarbose de acarbose (10  $\mu$ L), y 10  $\mu$ L del enzima, en un volumen de reacción de 250  $\mu$ L.

Posteriormente se incubó a 37 °C, deteniéndose la reacción con acarbosa 0.04 mg/mL (2 µL) al cabo de diez minutos. Las concentraciones de las muestras fueron previamente establecidas como concentraciones adecuadas para este ensayo por Ramírez *et al.* (100).

La determinación de la actividad enzimática se realizó midiendo la cantidad de glucosa liberada en la reacción, con un reactivo clínico de glucosa oxidasa (SPINREACT), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados se analizaron con ayuda de un lector de absorbancia a 505 nm. La actividad inhibitoria se reportó como el porcentaje residual de actividad enzimática, considerando como el 100 % de actividad enzimática a la reacción sin inhibidor.

#### **8. Cálculo de la Concentración Inhibitoria Media**

La inhibición enzimática de la lipasa pancreática y de las  $\alpha$ -glucosidasas fue cuantificada con diferentes concentraciones de cada compuesto a evaluar. Con los datos obtenidos se construyó una gráfica en Excel con el logaritmo de la concentración contra la actividad inhibitoria para obtener una estimación de la concentración de extracto que disminuye el 50 % de la actividad enzimática medida, o  $CI_{50}$ , para ambos casos.

Esta estimación se realizó despejando y calculando el valor  $x$  de la ecuación exponencial calculada para cada curva.

#### **9. Determinación gráfica del tipo de inhibición enzimática**

Las velocidades de reacción, expresadas en mmol de producto obtenido en el modelo de  $\alpha$ -glucosidasas y en porcentaje de actividad en el modelo de lipasa pancreática, fueron cuantificadas con diferentes concentraciones de sustrato con y sin el compuesto a evaluar a dos concentraciones fijas.

En el caso de la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas, se utilizó como sustrato maltodextrina grado alimenticio (Shandong Co.) para tener una mejor observación del comportamiento inhibitorio.

Con estos datos se construyeron gráficas de los inversos de concentración de sustrato y velocidad de reacción, o gráficas de Lineweaver-Burk, para cada caso.

Las rectas resultantes de la actividad con y sin fracción inhibitoria fueron extrapoladas hacia el origen y comparadas entre sí para determinar el tipo de inhibición que presenta cada compuesto. En estas gráficas la intersección con el eje X representa la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) si no hay un inhibidor en la reacción o la  $K_m$  aparente ( $K_{m_{app}}$ ) en caso de haberlo, mientras que la intersección con el eje Y representa la velocidad máxima de reacción ( $V_{máx}$ ) (121).

La constante de disociación del complejo enzima-inhibidor, también llamada constante de inhibición enzimática ( $K_i$ ) se obtuvo para los inhibidores competitivos a partir del despeje de la siguiente ecuación (122):

$$K_{m_{app}} = K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

## RESULTADOS

### 1. Preparación de extractos

El material vegetal colectado fue identificado como *L. octovalvis* (Jacq.) P.H. Raven y dos ejemplares para herbario fueron asignados a los números de folio 34667 y 34668 (Figura 5), y a partir de 1.04 kg de hojas secas y molidas, se obtuvieron 337 g de extracto hidroalcohólico seco (rendimiento del 32.4 %).

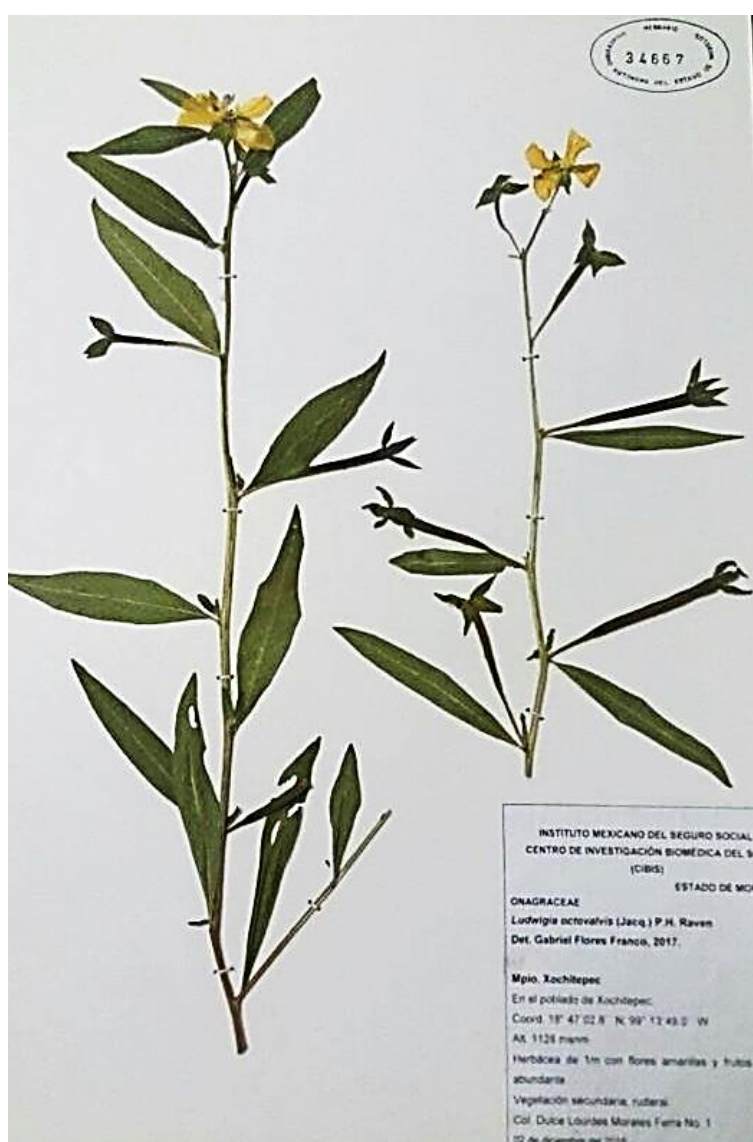
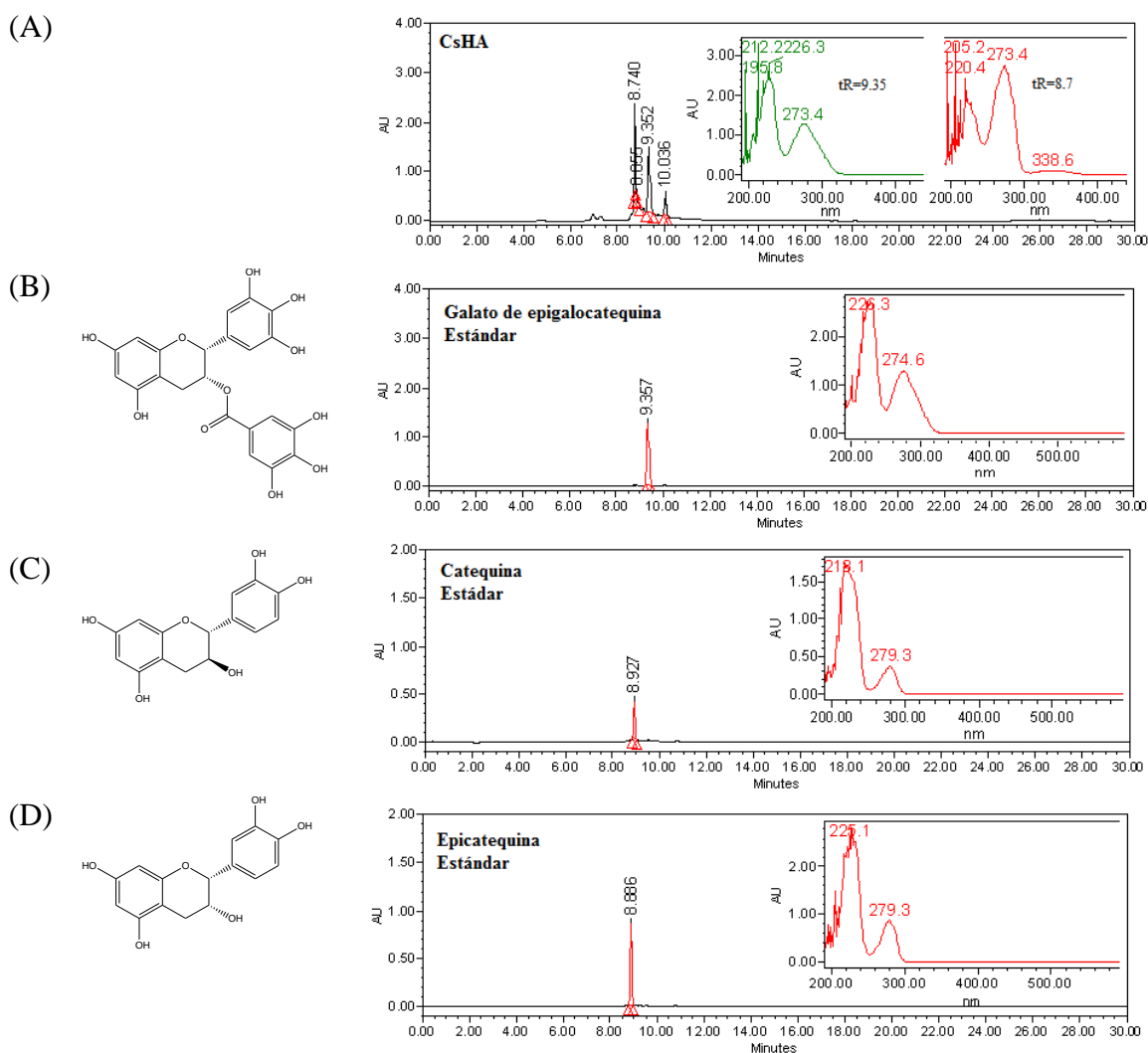


Figura 5.- Ejemplares de *L. octovalvis* resguardados en el Herbario HUMO del CIByC-UAEM.



Con el objetivo de verificar la autenticidad de las hojas de *C. sinensis*, se realizó una comparación por HPLC de los compuestos mayoritarios del extracto hidroalcohólico (CsHA) con los cromatogramas y espectros UV de tres estándares de compuestos característicos de esta especie: el galato de epigalocatequina **23**, la catequina **24** y la epicatequina **25** (Figura 6). Lo anterior debido a que, de acuerdo con algunos autores (58,59), estos compuestos son los compuestos responsables de las actividades inhibitorias de lipasa pancreática y  $\alpha$ -glucosidasas de *C. sinensis*.

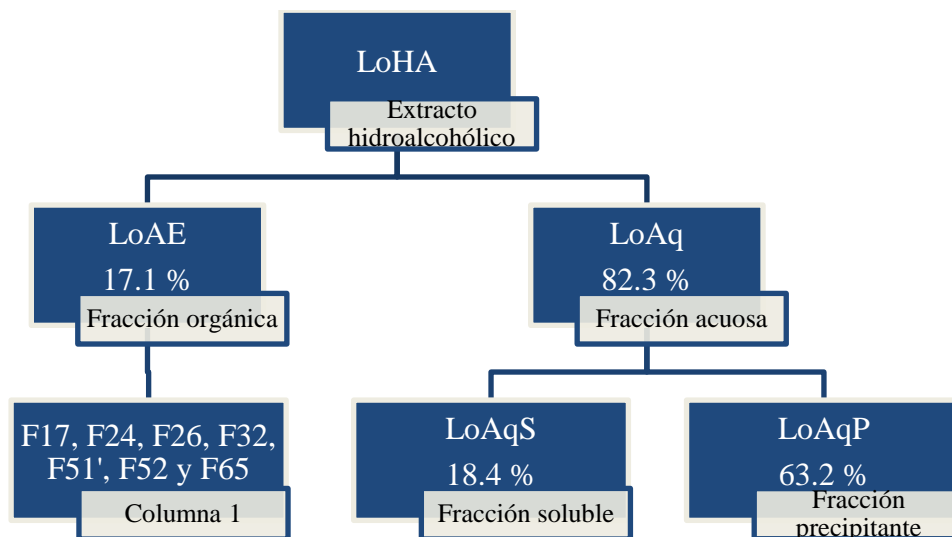


**Figura 6.-** Comparación de los cromatogramas y espectros UV de CsHA (A), galato de epigalocatequina **23** (B), catequina **24** (C) y epicatequina **25** (D).

Como se observa en la Figura 6, los espectros UV y tiempos de retención (tR) de dos de los tres compuestos principales de CsHA son muy parecidos a los de los tres estándares. Por lo tanto, la especie utilizada como control vegetal positivo, efectivamente corresponde a *C. sinensis*.

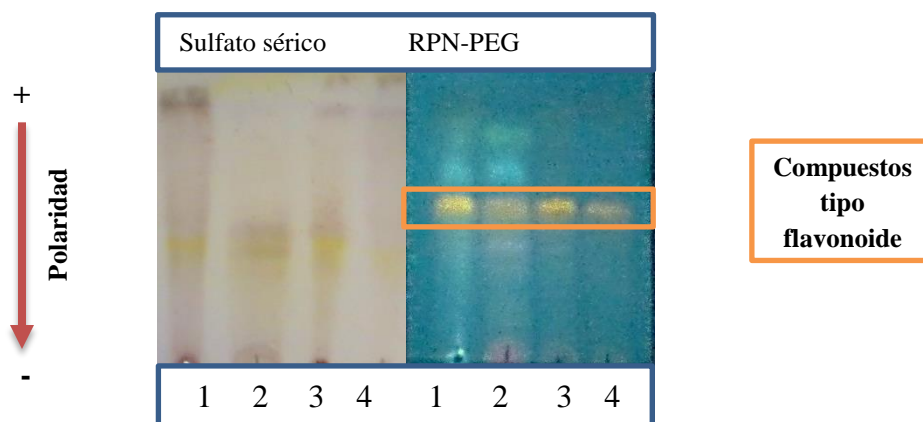
## 2. Fraccionamiento químico del extracto hidroalcohólico de *L. octovalvis*

El extracto hidroalcohólico integro (LoHA, 190 g) fue fraccionados como se muestra en el esquema de la Figura 7. Se obtuvieron 156.5 gramos de una fracción acuosa (LoAq) y 32.4 gramos de una fracción orgánica (LoAE) en peso seco. Posteriormente 155 g de LoAq fueron re-suspendidos en 500 mL de metanol, generando 35 gramos de una fracción soluble (LoAqS) y 120 gramos de un precipitado (LoAqP).



**Figura 7.-** Esquema general del fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de *L. octovalvis*.

En la Figura 8 se muestra el contenido químico de cada mezcla obtenida, mediante una comparación de las mezclas por CCF. En esta figura se aprecia, mediante el factor de retención (RF) de los compuestos observados, que tanto LoAE como LoAqS contenían a los compuestos químicos de menor polaridad.



**Figura 8.-** Cromatografía en capa fina del resultado de la separación líquido-líquido de LoHA. CCF Fase reversa, sistema Agua/Acetonitrilo 7:3 observado a 360 nm. 1.- LoHA 2.- LoAE 3.- LoAqS 4.-LoAqP.

El revelado químico con RPN-PEG (Figura 8A) permitió la observación de marcas de color amarillo y naranja, que indican la presencia de flavonoides, además de marcas de colores azul y verde, características de otro tipo de compuestos polifenólicos (115). Mientras que el revelado con sulfato cérico (Figura 8B) permitió observar la complejidad real de cada muestra mediante el revelado de compuestos químicos en general (116).

La evaluación biológica de las fracciones obtenidas (Tabla 9), permitió establecer que LoAE produce un mayor efecto inhibitorio de ambas enzimas, debido a esto, se decidió llevar a cabo el fraccionamiento químico biodirigido de esta fracción.

**Tabla 9.-**Actividad inhibitoria de lipasa pancreática y de  $\alpha$ -glucosidasas del extracto hidroalcohólico y las fracciones resultantes de la separación líquido-líquido.

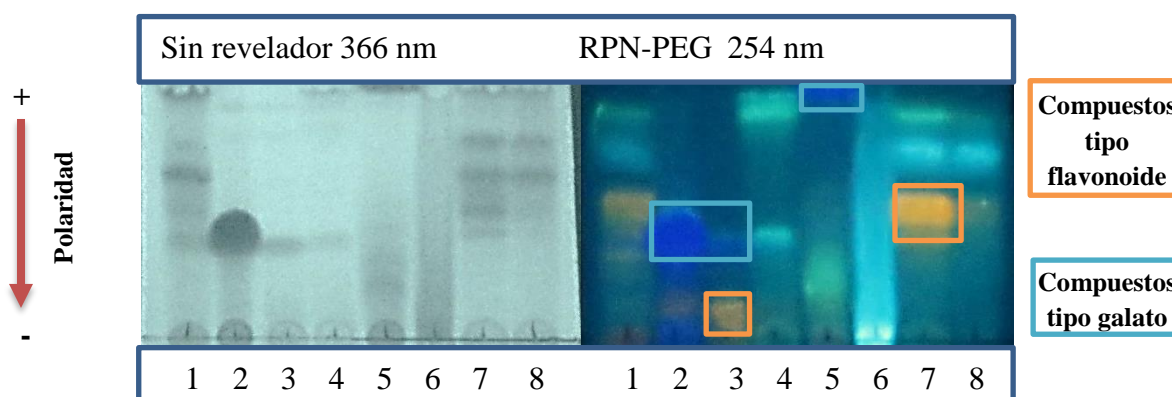
Extracto o fracción	% de inhibición	
	Lipasa pancreática (0.25 mg/mL)	$\alpha$ -glucosidasas (0.6 mg/mL)
Control farmacológico	57.0 $\pm$ 1.6 *	95.0 $\pm$ 6.0 *
<b>CsHA</b>	<b>34.8 <math>\pm</math> 2.5</b>	80.8 $\pm$ 1.1
LoHA	23.6 $\pm$ 2.5	58.9 $\pm$ 5.7
<b>LoAE</b>	31.2 $\pm$ 1.9	<b>82.8 <math>\pm</math> 3.6</b>
LoAqS	15.6 $\pm$ 2.5	76.8 $\pm$ 1.9
LoAqP	18.3 $\pm$ 1.2	69.1 $\pm$ 1.8

\* Los controles farmacológicos se evaluaron a 1  $\mu$ g/mL en el caso del orlistat y a 10  $\mu$ g/mL en el caso de la acarbosa.

### 3. Fraccionamiento químico de la fracción orgánica

La separación por cromatografía en columna abierta de LoAE generó 69 fracciones, que fueron agrupadas en función de su parecido químico en 20 fracciones, de las cuales se seleccionaron aquellas que no comparten compuestos químicos entre sí (C1F17, C1F24, C1F26, C1F32, C1F51', C1F52 y C1F65) para su evaluación biológica.

En la Figura 9, se presenta un resumen de la CCF de las fracciones seleccionadas. En esta figura se observa que C1F17 muestra un compuesto abundante de mediana polaridad que con RPN-PEG revela en color morado, característico de los compuestos de tipo galato, y trazas de un flavonoide de baja polaridad. En C1F24 se observa mayor concentración de este último flavonoide y trazas del compuesto de tipo galato. En C1F26 se observa un compuesto de mediana polaridad y uno de alta polaridad que no pertenecen a los grupos de compuestos antes mencionados. En C1F32 se observa un compuesto de baja polaridad que con el RPN-PEG revela en color verde y un compuesto similar al compuesto mayoritario de C1F17 pero más polar. En C1F51' se aprecia un compuesto muy abundante que revela en color azul después del revelado con RPN-PEG. Finalmente C1F52 y C1F65 comparten al menos cinco compuestos, pero en diferente proporción, C1F52 parece tener una mayor concentración de compuestos de tipo flavonoide (que revelan en color naranja con el RPN-PEG).



**Figura 9.-** Cromatografía en capa fina de las fracciones seleccionadas para la evaluación biológica. Fase reversa, sistema Agua/Acetonitrilo 7:3.  
1.-LoAE 2.-C1F17 3.-C1F24 4.-C1F26 5.-C1F32 6.-C1F51' 7.- C1F52 y 8.-C1F65.

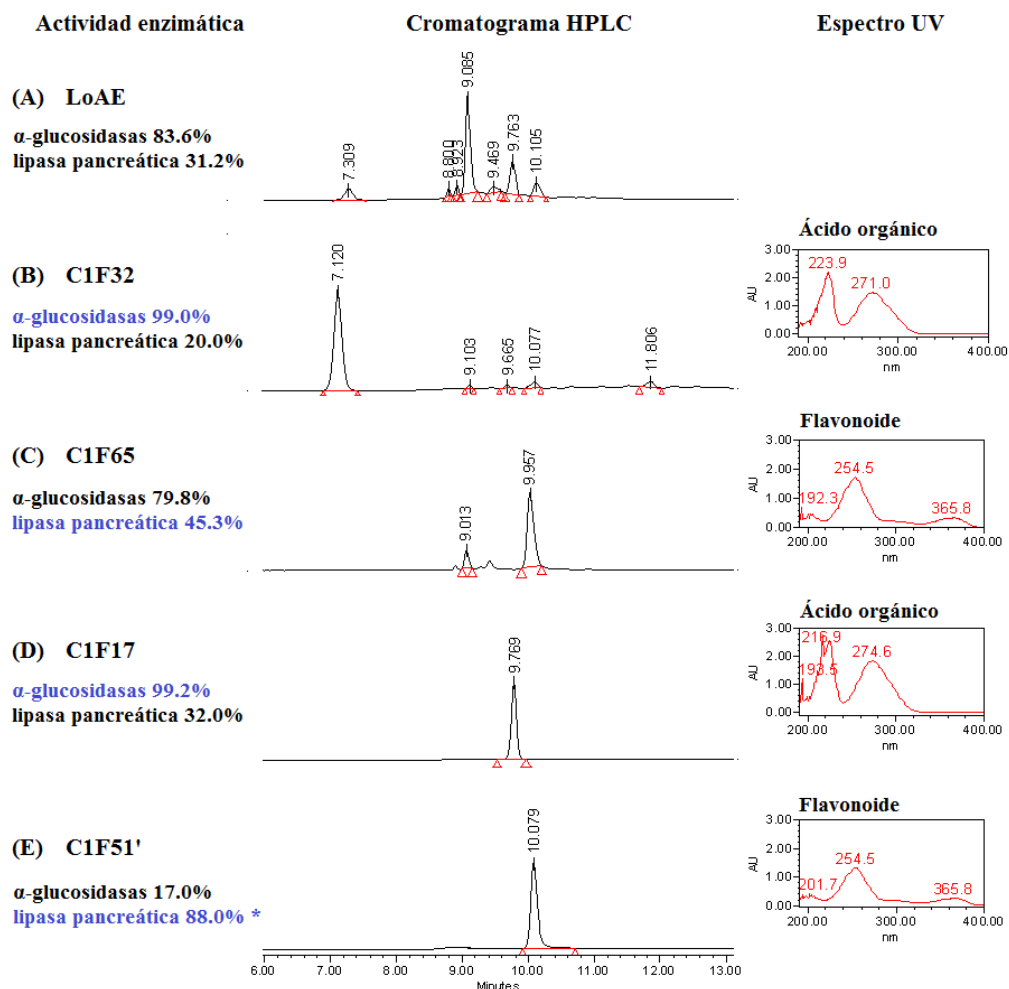
En la Tabla 10 se muestran los porcentajes de inhibición de la actividad de las  $\alpha$ -glucosidasas y de la lipasa pancreática para las fracciones evaluadas. Se observa que las fracciones con mayor actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas fueron la fracción C1F17 y C1F32, ambas con  $\geq 98$  % de inhibición, frente a 80.8 % del control positivo. Mientras que las fracciones con mayor actividad inhibitoria de lipasa fueron la fracción C1F51' y C1F65, con 88 % y 45.3 % de inhibición frente a 34.8 % del control vegetal positivo.

**Tabla 10.-** Actividad inhibitoria de lipasa pancreática y  $\alpha$ -glucosidasas de las subfracciones resultantes de la fracción orgánica.

Fracción	% de inhibición	
	Lipasa pancreática (0.25 mg/mL)	$\alpha$ -glucosidasas (0.6 mg/mL)
Control farmacológico	57.0 $\pm$ 1.6 *	95.0 $\pm$ 6.0 *
CsHA	34.8 $\pm$ 2.5	80.8 $\pm$ 1.1
LoAE	31.2 $\pm$ 1.9	82.8 $\pm$ 3.6
<b>C1F17</b>	23.2 $\pm$ 3.0	<b>98.4 <math>\pm</math> 2.0</b>
C1F24	22.5 $\pm$ 3.6	60.1 $\pm$ 5.5
C1F26	4.3 $\pm$ 3.5	39.9 $\pm$ 5.6
<b>C1F32</b>	20 $\pm$ 2.3	<b>98.9 <math>\pm</math> 1.6</b>
<b>C1F51'</b>	<b>88 <math>\pm</math> 0.3 *</b>	19.4 $\pm$ 5.3
C1F52	28.2 $\pm$ 2.7	84.2 $\pm$ 5.3
<b>C1F65</b>	<b>45.3 <math>\pm</math> 0.6</b>	79.8 $\pm$ 3.8

\* Los controles farmacológicos se evaluaron a 1  $\mu$ g/mL en el caso del orlistat y a 10  $\mu$ g/mL en el caso de la acarbosa. Mientras que la fracción C1F51' se evaluó a 0.15 mg/mL.

Las cuatro fracciones más activas; C1F17, C1F32, C1F51' y C1F65, fueron sometidas a análisis por HPLC y comparadas con LoAE (Figura 10). Este análisis permitió observar la separación de compuestos químicos a partir de LoAE (panel A), así como establecer un grado aproximado de pureza de los compuestos mayoritarios en cada una de las fracciones y determinar a qué grupo de compuestos fitoquímicos corresponde estos compuestos por medio del análisis de su espectro UV y su tR.



**Figura 10.-** Comparación de las actividades inhibitorias, cromatogramas y espectros UV de las fracciones más activas.

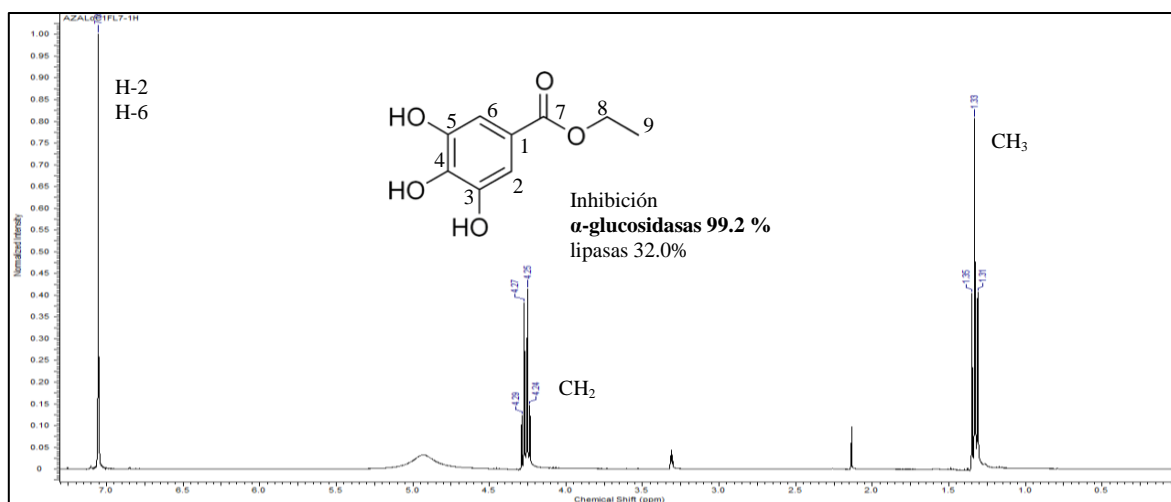
En el cromatograma de C1F32 (panel B) se observó que el compuesto principal tiene un tR aproximado de 7.12 min y presenta un espectro UV característico de los ácidos orgánicos. La forma y longitud del espectro UV del compuesto presente en C1F17 (panel D) también presenta la forma característica de los ácidos orgánicos, sin embargo, su tR es de 9.769 min, por lo que se trata de un compuesto similar pero de menor polaridad (123).

En el cromatograma de C1F65 se observa una mezcla de al menos cuatro compuestos. De acuerdo con la forma y longitud del espectro UV del compuesto mayoritario, este compuesto pertenece al grupo de los flavonoides, al igual que el único compuesto visible en C1F51' (123).

## 4. Identificación de los compuestos con mayor inhibición de $\alpha$ -glucosidasas

### 4.1. Fracción C1F17

De acuerdo con la CCF, C1F17 contenía un compuesto prácticamente puro que fue sometido a RMN. En el análisis del espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 11), se observó que a campo bajo aparece una señal singulete que integra para dos protones ( $\delta=7.04$  ppm, s, 2H) característica de los protones aromáticos. Por otro lado, en  $\delta=4.29$  se observó una señal cuarteto que integra para dos protones (q, 2H,  $J=11.0$ , 6 Hz) y que corresponde a un metileno unido a oxígeno. Este cuarteto presentó acoplamiento con la señal triplete que integra para tres protones (t, 3H,  $J=6$  Hz) ubicada en  $\delta=1.33$  ppm y que corresponde a un metilo acoplado a un metileno.



**Figura 11.-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de C1F17 y estructura del compuesto elucidado, galato de etilo.

En el experimento de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 12) se confirmó la presencia de un anillo aromático por la presencia de las señales en  $\delta=110.1$  ppm (2 CH),  $\delta=146.6$  ppm (2 C-O),  $\delta=139.7$  ppm (1 C-O) y  $\delta=121.9$  ppm (1C). Estas señales en conjunto con el carbonilo ubicado en  $\delta=168.8$  ppm (1C=O) indicaron la presencia de galato de etilo **26**, que se confirma por la comparación con los datos reportados en la literatura (124) (Tabla 11).

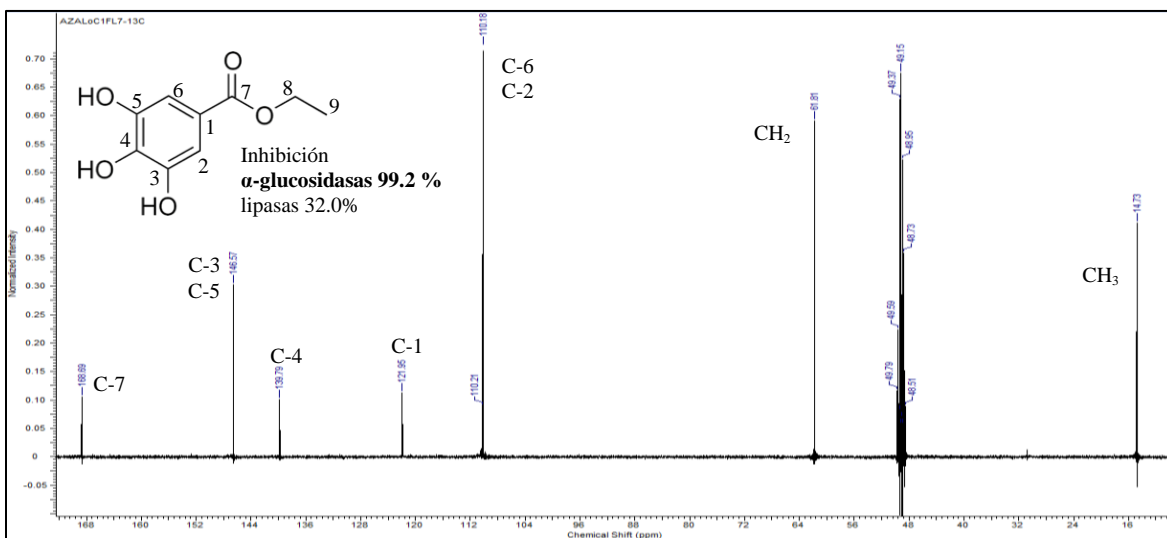


Figura 12.- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de C1F17 y estructura del compuesto elucidado, galato de etilo.

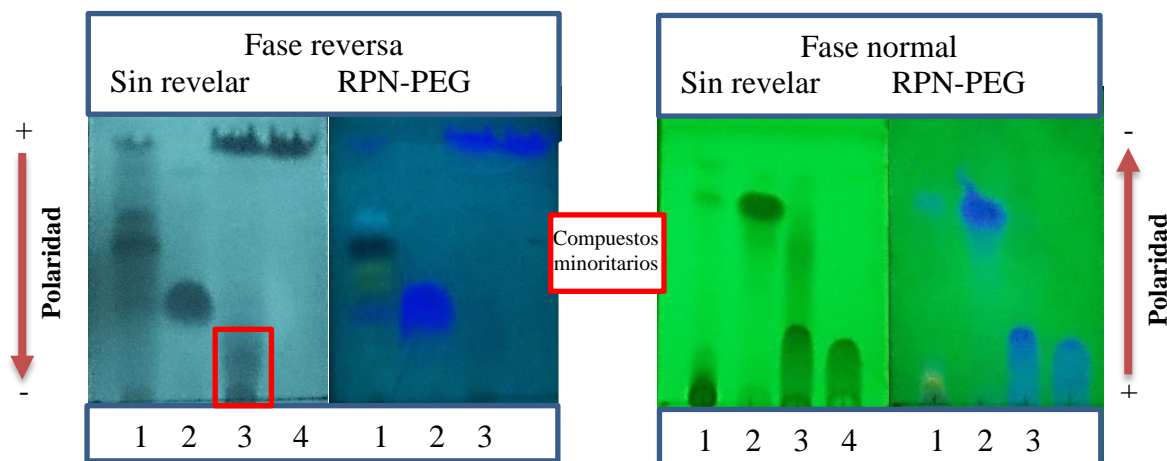
Tabla 11.- Datos de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  de C1F17 y del galato de etilo reportado en la literatura (124).

Posición	$\delta$ (ppm)			
	RMN $^1\text{H}$		RMN $^{13}\text{C}$	
	Galato de etilo	C1F17	Galato de etilo	C1F17
C-1	-	-	121.9	121.95
CH-2	7.04 (s)	7.05 (s)	110.1	110.18
CH-6				
C-3	-	-	146.4	146.57
C-5				
C-4	-	-	139.6	139.79
C-7	-	-	168.6	168.69
CH <sub>2</sub>	4.25 (q, J=7.8 Hz)	4.29 (q, J=6 Hz)	61.6	61.81
CH <sub>3</sub>	1.32 (t, J=7.8 Hz)	1.33 (t, J=6 Hz)	14.6	14.73



## 4.2. Fracción C1F32

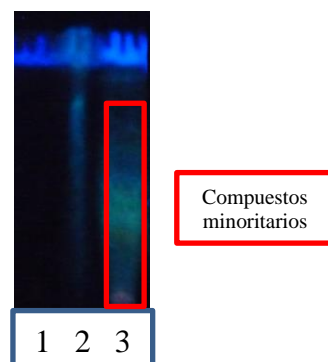
El análisis cromatográfico de LoAE, indicó que el compuesto mayoritario de C1F32 se encuentra estructuralmente muy relacionado con el galato de etilo **26** pero con mayor polaridad, por lo que se comparó por CCF con un estándar comercial de ácido gálico **20** (Figura 13) para corroborar la presencia de este ácido trihidroxibenzoico.



**Figura 13.-** Cromatografía en capa fina de las fracciones con compuestos relacionados con el ácido gálico. Fase reversa, Agua/Acetonitrilo 7:3 y Fase normal, Diclorometano/Metanol 85:15 observadas a 360 nm. 1.-LoAE 2.-C1F17 3.-C1F32 4.-Estándar de ácido gálico.

En la Figura 13 se observa que el RF, la forma y el color (después del revelado con RPN-PEG) del compuesto mayoritario de C1F32 son idénticos a los del estándar de ácido gálico **20**. Sin embargo, En C1F32 se aprecia la presencia de otros compuestos minoritarios mucho menos polares, que no presentan coloración alguna con el RPN-PEG.

Con el objetivo de purificar el compuesto mayoritario de la fracción C1F32, esta mezcla se sometió a una cromatografía en columna abierta de fase reversa, con un sistema de elución Agua/Acetonitrilo. En este proceso se obtuvieron 69 fracciones que fueron reunidas por su similitud química en 10 fracciones. En la fracción C2F1 se observó un único compuesto (Figura 14), por lo que esta muestra fue enviada a RMN  $^1\text{H}$ .



**Figura 14.-** Cromatografía en capa fina de la purificación de ácido gálico a partir de la fracción C1F32. Fase reversa, Agua/Acetonitrilo 7:3 con RPN, a 254 nm. 1.-Estándar de ácido gálico 2.-C2F1 3.-C1F32.

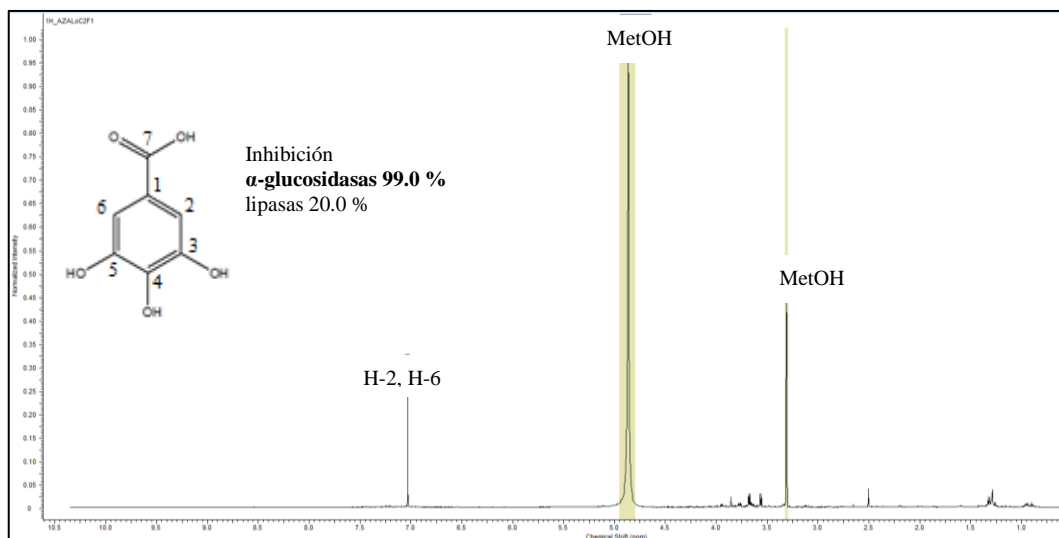
Para determinar si el compuesto de C2F1 es el responsable de la actividad inhibitoria de C1F32, ambas fracciones fueron evaluadas en el modelo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas. Como se puede observar en la Tabla 12, la fracción C2F1 conservó prácticamente la misma actividad inhibitoria que C1F32, lo que confirma que es el único compuesto contenido en C2F1 el responsable de dicha actividad.

**Tabla 12.-** Actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas de las fracciones C1F32 y C2F1.

Fracción	% de inhibición (0.6 mg/mL)
Acarbosa	95.0 $\pm$ 6.0*
CsHA	80.8 $\pm$ 1.1
LoAE	82.8 $\pm$ 3.6
C1F32	98.9 $\pm$ 1.6
<b>C2F1</b>	<b>99.0 <math>\pm</math> 1.3</b>

\* La acarbosa se evaluó a 1  $\mu$ g/mL.

El análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de C2F1 (Figura 15 y Tabla 13) corroboró que se trata del ácido gálico **20** ya que en el espectro solo se observa una señal singulete en  $\delta = 7.05$  ppm, que es característica de este compuesto fenólico y coincide con los datos reportados en la literatura (124).



**Figura 15.-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de C2F1 y estructura del compuesto elucidado, ácido gálico.

**Tabla 13.-** Datos de RMN  $^1\text{H}$  de C2F1 y del ácido gálico reportado en la literatura (124).

Posición	$\delta$ (ppm)	
	Ácido gálico	C1F17
CH-2	7.03 (s)	7.05 (s)
CH-6		

## 5. Identificación de los compuestos con mayor inhibición de lipasa pancreática

### 5.1. Fracción C1F51'

Para identificar al compuesto que presenta mayor inhibición de la lipasa pancreática, la fracción C1F51' fue sometida a análisis por CCF. Se utilizaron como reveladores: 4-hidroxibenzaldehído, reactivo de Dragendorff (para identificar alcaloides) y ninhidrina (para identificar aminoácidos). El análisis de CCF mostró resultados negativos para todos ellos.

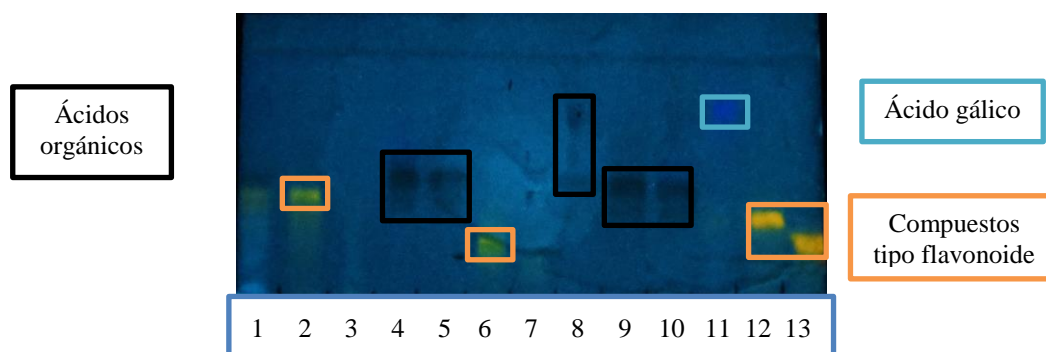
Además, la baja solubilidad de C1F51' no permitió obtener señales en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  y no mostró ningún cambio al someterse a fuego directo.

Estos resultados sugieren que esta fracción podría contener un compuesto mayoritario de naturaleza inorgánica con trazas de flavonoides y otros compuestos fitoquímicos.

### 5.2. Fracción C1F65

Para realizar la separación de los compuestos mayoritarios de esta fracción, se realizaron múltiples re-fraccionamientos por cromatografía en columna. El fraccionamiento fue monitoreado a través de la actividad biológica.

Este procedimiento permitió obtener 13 sub-fracciones que al ser analizadas por CCF (Figura 16) mostraron la presencia de ácidos orgánicos y flavonoides (Figura 16).



**Figura 16.-** Cromatografía en capa fina de las principales fracciones obtenidas a partir de C1F65.

Fase reversa, sistema Agua/Acetonitrilo 7:3 con RPN-PEG, observado a 254nm.

1.-C1F65 2.-Estándar de isoorientina 3.-C2F58 4.-C8F18 5.-C8F27 6.-C8F47 7. -C8F52

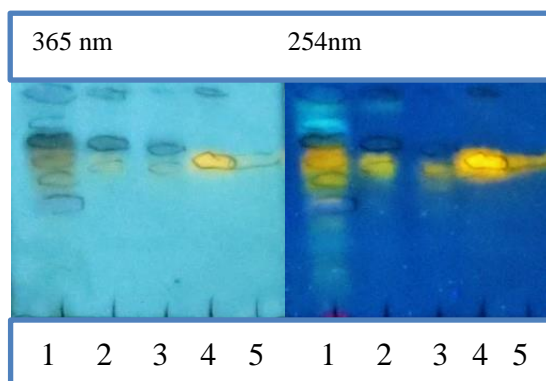
8.-C9F28 9.-C9F38 10.-C9F40 11.-C9F47 12.-C9F51 13.-C11F23.

El seguimiento de la actividad biológica mostró que las fracciones más activas fueron C9F43 con  $55.1 \pm 3.1$  % y C9F51 con  $53.5 \pm 3.7$  % (Tabla 14). Sin embargo, se obtuvo una cantidad menor de C9F51 ( $\approx 6$  mg) respecto a C9F43 ( $\approx 12$  mg), por lo que la elucidación estructural por RMN solo pudo realizarse en C9F43.

**Tabla 14.-** Actividad inhibitoria de lipasa pancreática de C1F65 y sus subfracciones.

Extracto o fracción	% de inhibición
	Lipasa pancreática (0.25 mg/mL)
C1F65	$45.3 \pm 0.6$
C2F58	$10.9 \pm 0.3$
C8F18	$29.3 \pm 3.6$
C8F47	$43.5 \pm 4.3$
C8F52	$36.4 \pm 4$
C9F28	$41.4 \pm 3.2$
C9F34	$16.6 \pm 4.5$
C9F40	$45.8 \pm 5.1$
<b>C9F43</b>	<b><math>55.1 \pm 3.1</math></b>
C9F51	$53.5 \pm 3.7$
C11F23	$49.1 \pm 3.8$

El comportamiento de C9F43 en los análisis de CCF (RF y color revelado con RPN-PEG) se asemejaba al comportamiento de los flavonoides glicosilados. Por lo que se realizó una CCF comparando C9F43 y un estándar de un flavonoide glicosilado previamente reportado en esta especie (isoorientina **4**), que se muestra en la Figura 17.



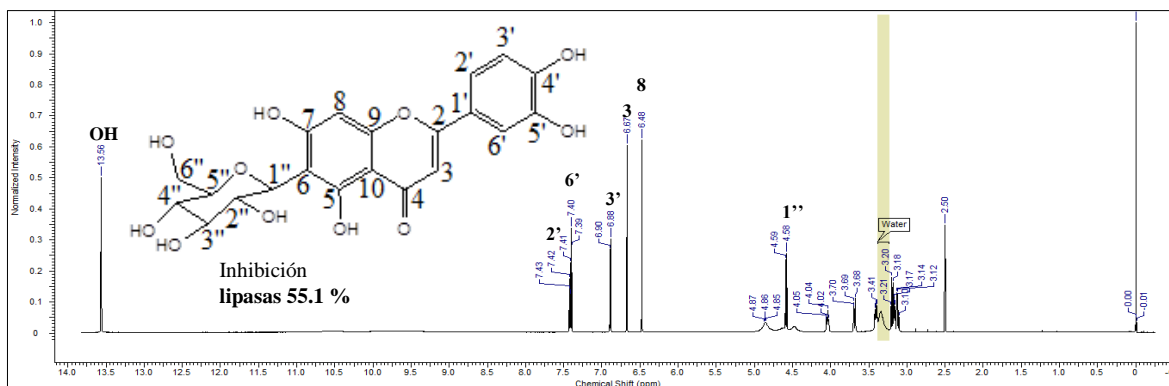
**Figura 17.-** Cromatografía en capa fina del resumen del aislamiento de isoorientina a partir de C1F65. Fase reversa, sistema Agua/Acetonitrilo 7:3 con RPN-PEG.  
1.-C1F65 2.-C2F28 3.-C3F38 4.-C9F43 5.-Estándar de isoorientina.

Como se aprecia en la Figura 17, el RF y color revelado con RPN-PEG de C9F43 es idéntico a los que presenta el estándar de isoorientina **4**. Debido a esto, la elucidación estructural por RMN comenzó suponiendo que C9F43 corresponde a un compuesto parecido a la isoorientina **4**, como la vitexina **1**, isovitexina **2** u orientina **3**.

En el análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 18) se observó que a campo bajo aparece una señal singlete ( $\delta=13.56$ , s, 1H) característica de los grupos hidroxilos. Por otro lado, en  $\delta=7.43$  se observó una señal doble de doble (dd,  $J=2.58$  Hz, 8.5 Hz) que hace acoplamiento con las señales dobles  $\delta=7.39$  ppm (d,  $J=2.58$  Hz) y  $\delta=6.89$  ppm (d,  $J=8.5$  Hz) que corresponden a protones de anillo aromático en las posiciones meta y orto, respectivamente. Que indican que el compuesto no corresponde ni a vitexina **1** ni a isovitexina **2**.

En  $\delta=6.67$  y  $\delta=6.48$  se observaron señales singlete características de los compuestos fenólicos unidos a grupos hidroxilo, que indican que el compuesto no corresponde a un flavonol o un flavanol, sino a una flavona. Estas señales también descartan la posibilidad de que el compuesto sea orientina **3** pero son concordantes con los protones no sustituidos en la molécula de isoorientina **4**.

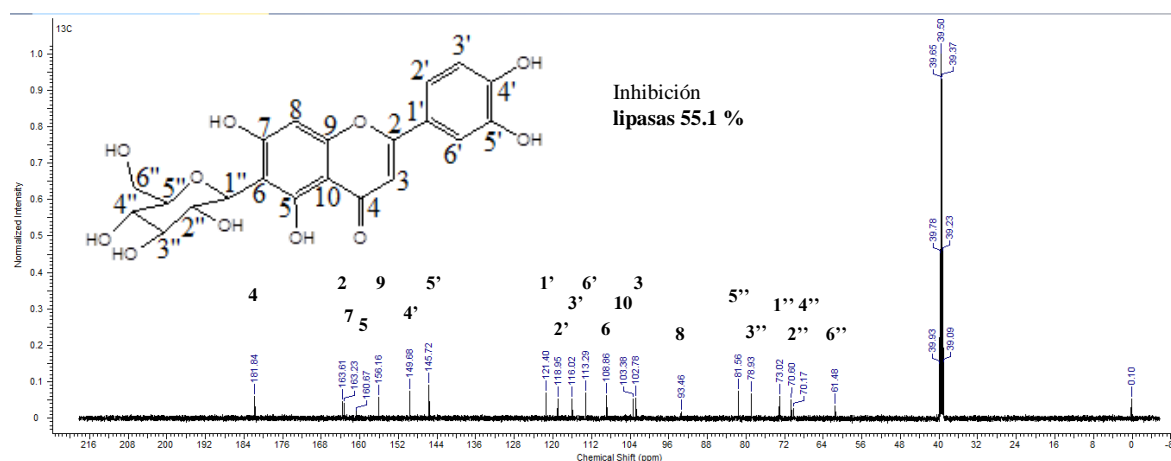
Por último, a campo bajo se observan varias señales con  $\delta$  característico de los azúcares, entre ellas una señal en  $\delta=4.58$  ppm (d,  $J=10.0$  Hz), correspondiente a un metino unido a un oxígeno y dos protones vecinos, que nuevamente concuerda con la estructura de la isoorientina **4**.



**Figura 18.-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de C9F43 y estructura del compuesto elucidado, isoorientina.

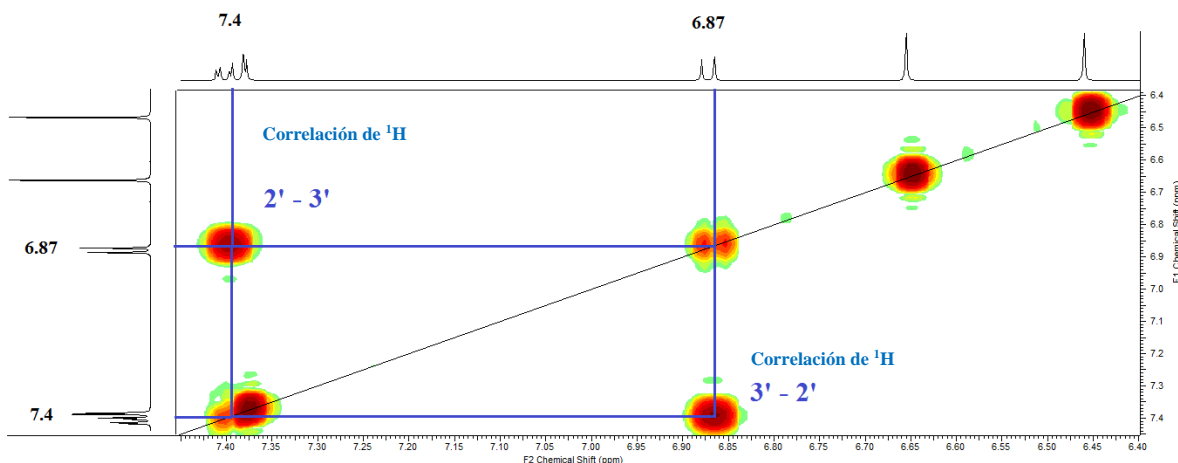
En el experimento de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 19) se confirmó la presencia de anillos aromáticos debido a la presencia de señales en  $\delta= 163.23$  ppm (1 C-O), 160.67 ppm (1 C-O), 156.16 ppm (1 C), 149.8 ppm (1 C-O), 145.72 ppm (1 C-O), 121.4 ppm (1 C), 118.95 ppm (1 CH), 116.02 ppm (1 CH), 113.29 ppm (1 CH), 108.86 ppm (1 C), 103.38 (1 C) ppm y 93.46 ppm (1 CH). También se observaron señales en  $\delta=163.61$  ppm (1 C) y  $\delta=102.78$  ppm (1 CH) relacionadas con un doble enlace y además una señal tipo carbonilo, ubicada en  $\delta=181.84$  ppm (1 C=O), confirmando la presencia de un compuesto tipo flavona.

Por último se identificaron señales con  $\delta$  característico de azúcares en 70.6 ppm, 78.93 ppm, 70.17 ppm, 81.56 ppm y 61.48 ppm. Todas estas señales corresponden a carbonos unidos a un oxígeno. Además se observa una señal en  $\delta=73.02$  ppm (1 CH), característica de un carbono que une una molécula de azúcar con el flavonoide mediante un enlace C-glucosídico.



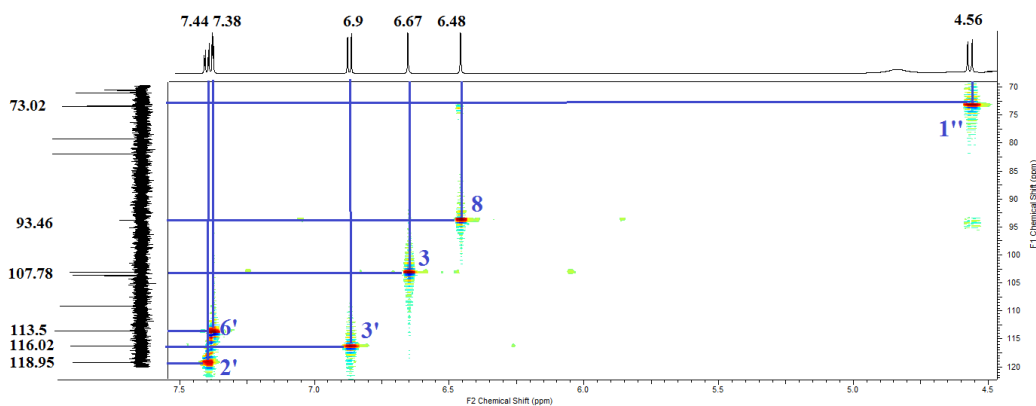
**Figura 19.-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de C9F43 y estructura del compuesto elucidado, isoorientina.

En cuanto a los experimentos bidimensionales, que sirven para establecer las correlaciones entre protones y carbonos de la molécula. El análisis de espectroscopía de correlaciones (COSY) en el área del flavonoide, mostró acoplamiento solo entre los protones 2' y 3' (Figura 20), es decir que estos protones son los únicos protones de la molécula que tienen un protón vecino a una ligadura, coincidiendo con lo esperado para la isoorientina **4**.



**Figura 20.-** Experimento COSY de la fracción C9F43. La correlación de entre las señales del espectro de RMN  $^1\text{H}$  se indica por medio de las líneas azules.

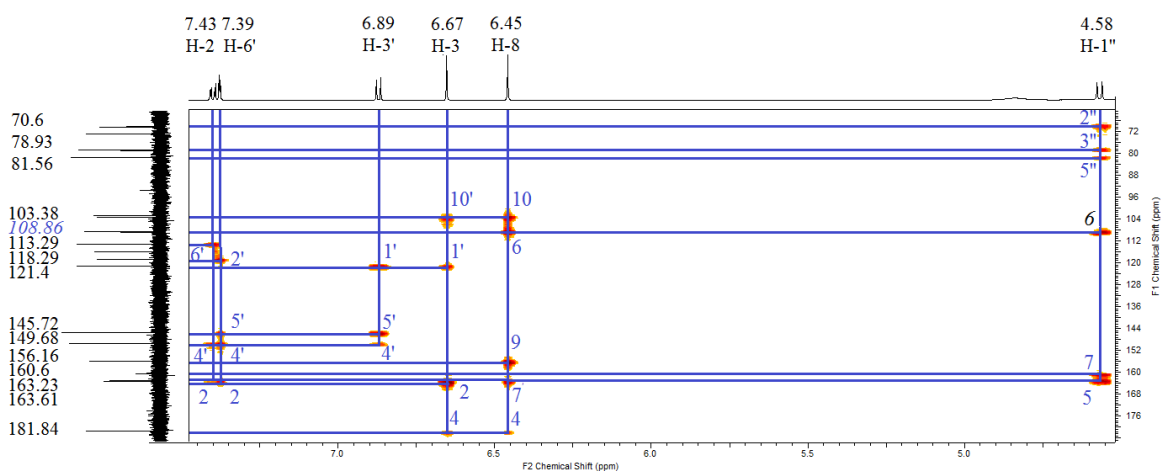
También en el análisis del experimento espectroscopía de correlación heteronuclear de un único cuanto (HSQC) se observó la correcta correlación entre las señales de carbonos y protones asignados en las posiciones CH-3, CH-8, CH-2', CH-3', CH-6' y CH-1'' (Figura 21), que concuerdan con los carbonos unidos al menos a un hidrógeno de la molécula de isoorientina **4**.



**Figura 21.-** Experimento HSQC de la fracción C9F43. La correlación entre las señales de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  se indica por medio de las líneas azules.



Además, en el experimento de correlación heteronuclear a múltiples enlaces (HMBC), la relación a más de un enlace se observó para el C-2 con CH-6' y C-4'; para el CH-6' con CH-2', C-5', C-4' y C-2; para el CH-3' con C-1', C-5' y C-4'; para el CH-3 con C-10, C-1', C-2 y C-4; para el CH-8 con C-10, C-6, C-9, C-7 y C-4; y para el C1'' con el C-2'', C-3'', C-5'', C-6, C-7 y C-5 (Figura 22). Estas correlaciones también coinciden con las correlaciones esperadas para la isoorientina **4**.



**Figura 22.-** Experimento HMBC de la fracción C9F43.

La correlación a más de un enlace entre las señales de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  se indica por medio de las líneas azules.

Estos resultados, en conjunto con la comparación de datos reportados en la literatura (125) (Tabla 15), indicaron que el compuesto principal de C9F43 corresponde a la flavona C-glicosilada isoorientina **4**.

**Tabla 15.-** Datos de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C de C9F43 y de la isoorientina reportados en la literatura (125).

Posición	δ (ppm)			
	RMN <sup>1</sup> H		RMN <sup>13</sup> C	
	Isoorientina	C9F43	Isoorientina	C9F43
C-2	-	-	163.44	163.61
CH-3	6.64 (s)	6.67 (s)	102.38	102.78
C-3	-	-	181.45	181.84
C-5	-	-	160.59	160.67
C-6	-	-	108.88	108.86
C-7	-	-	163.44	163.23
CH-8	6.64 (s)	6.48 (s)	93.73	93.46
C-9	-	-	156.27	156.16
C-10	-	-	102.79	103.38
C-1'	-	-	121.56	121.4
CH-2'	7.44 (dd, J=2.5, 9.0 Hz)	7.43 (dd, J=2.58, 8.5 Hz)	118.82	118.95
CH-3'	6.90 (d, J=9.0 Hz)	6.89 (d, J=8.5 Hz)	116	116.02
C-4'	-	-	150.44	149.68
C-5'	-	-	145.95	145.72
CH-6'	7.38 (d, J=2.5 Hz)	7.39 (d, J=2.58 Hz)	112.92	113.29
CH-1''	4.58 (d, J=10.0 Hz)	4.58 (d, J=9.8 Hz)	73.18	73.02
C-2''	-	-	70.50	70.6
C-3''	-	-	78.95	78.93
C-4''	-	-	70.19	70.17
C-5''	-	-	81.35	81.56
C-6''	-	-	61.34	61.48
OH	13.55 (s)	13.56 (s)	-	-

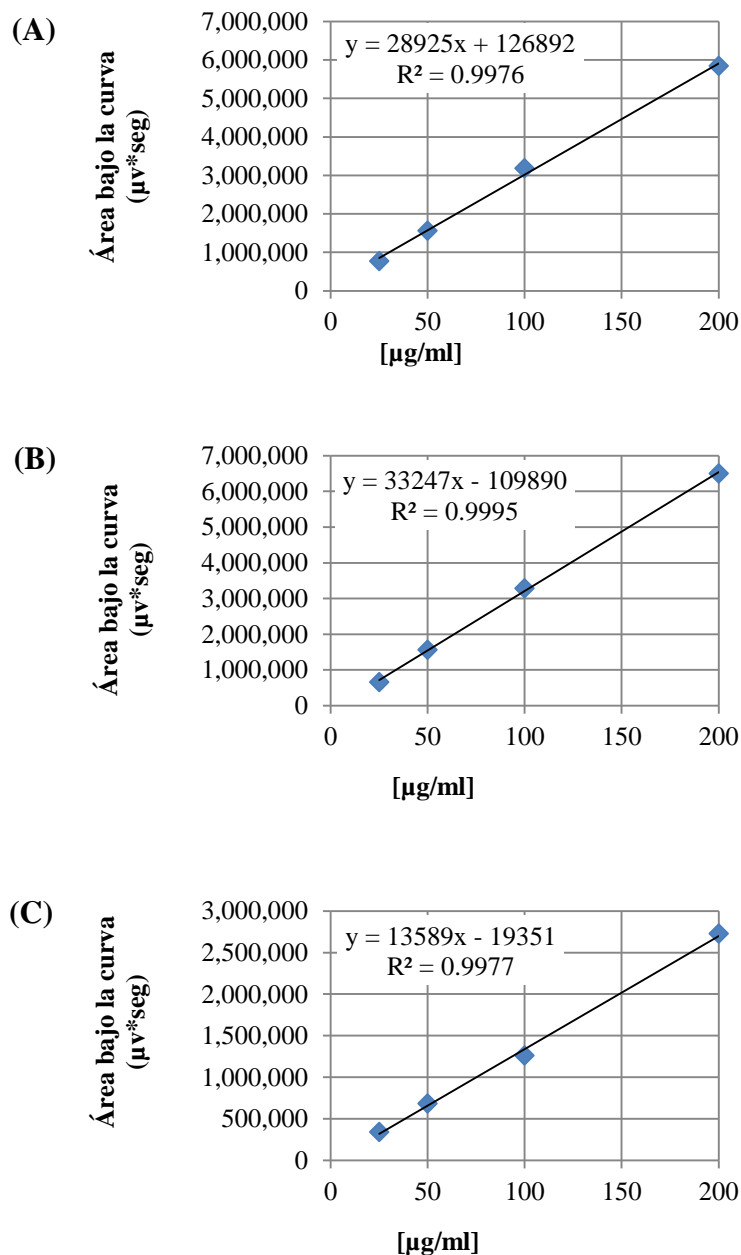
## 6. Cuantificación de los compuestos más activos

A partir del análisis de los perfiles cromatográficos a 270 nm del galato de etilo **26**, ácido gálico **20** e isoorientina **4**, evaluados a 25, 50, 100 y 200 µg/mL, se construyó la Tabla 16, con las áreas bajo la curva de los picos correspondientes a cada compuesto y concentración.

**Tabla 16.-** Áreas bajo la curva de los picos correspondientes a los compuestos más activos a diferentes concentraciones.

Compuesto	[µg/mL]	tR	Área bajo la curva (µv*seg)				
			A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	Desviación estándar	Promedio
Galato de etilo	25	9.97	812,152	746,929	746,924	37,658	768,668
	50	9.97	1,584,436	1,564,795	1,535,198	24,786	1,561,476
	100	9.98	3,329,856	3,161,642	3,046,258	142,617	3,179,252
	200	9.91	5,896,705	5,896,705	5,741,733	89,473	5,845,048
Ácido gálico	25	7.47	692,708	669,908	633,215	30,016	665,277
	50	7.47	1,632,026	1,579,061	1,494,267	69,490	1,568,451
	100	7.45	3,365,813	3,278,210	3,222,189	72,388	3,288,737
	200	7.53	6,526,352	6,399,267	6,590,667	97,400	6,505,429
Isoorientina	25	9.27	344,724	351,106	332,268	9,581	342,699
	50	9.28	687,523	664,821	701,637	18,574	684,660
	100	9.28	1,307,664	1,149,388	1,334,155	99,910	1,263,736
	200	9.29	2,782,874	2,722,748	2,677,007	53,096	2,727,543

Con los datos de la Tabla 16 se construyeron las curvas de calibración de cada compuesto (Figura 23) que relacionan área bajo la curva y concentración. Esto permitió obtener una ecuación con la forma  $y = mx + b$  (Figura 23) para cada compuesto. Todos los valores de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) fueron mayores a 0.9, lo que confirma la correlación lineal de los datos.



**Figura 23.-** Curvas de calibración de los compuestos más activos (A) galato de etilo, (B) ácido gálico, (C) isorientina.

El análisis de los perfiles cromatográficos de LoHA y LoAE permitieron obtener el área bajo la curva de los picos correspondientes al galato de etilo **26**, al ácido gálico **20** y a la isorientina **4** (empleando su tiempo de retención y espectro UV para identificarlos).

Utilizando la ecuación correspondiente, la concentración de cada compuesto fue determinada y con ella los porcentajes de cada compuesto se calcularon en LoHA y LoAE (Tabla 17). Los cuales son 0.7 % de galato de etilo **26**, 1.9 % de ácido gálico **20** y 0.2 % de isoorientina **4** en LoHA y 4.6 % de galato de etilo **26**, 2.5 % de ácido gálico **20** y 0.1 % de isoorientina **4** en LoAE.

**Tabla 17.-**Cuantificación de los compuestos más activos en LoHA y LoAE.

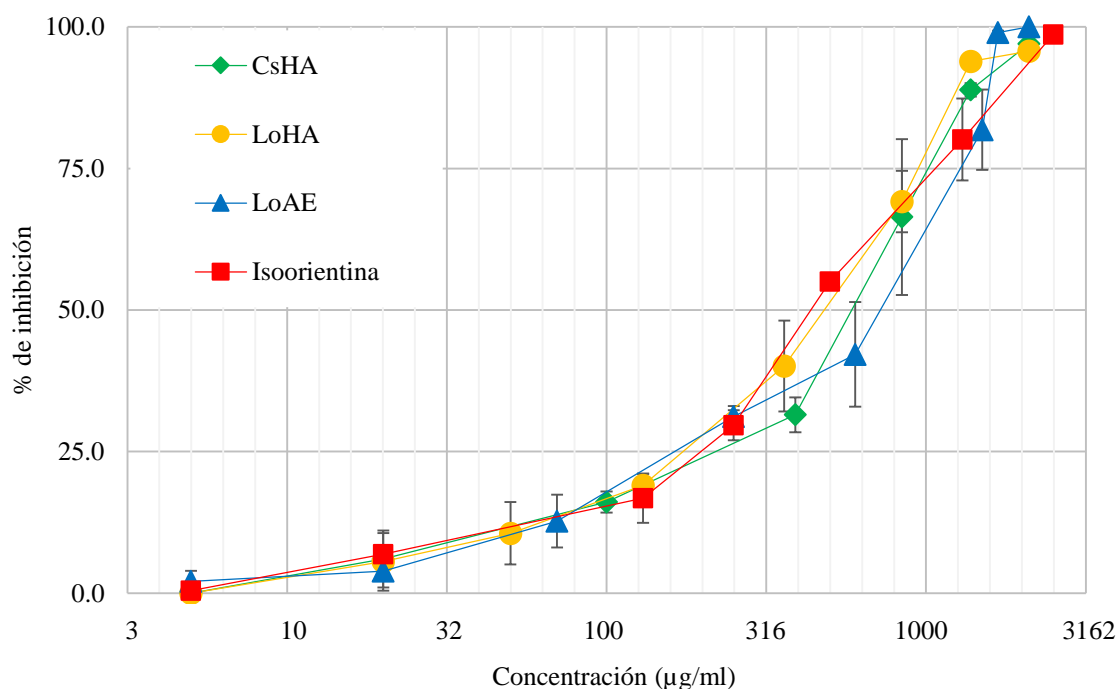
Compuesto	Fracción	tR	Área bajo la curva ( $\mu\text{v}\cdot\text{seg}$ )				[ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	[ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ]	%
			A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	Promedio			
Galato de etilo	LoHA	9.92	181,295	196,564	181,295	729,718	20.84	0.01	<b>0.7</b>
	LoAE	9.83	4,257,095	4,192,635	3,988,530	4,146,087	138.95	0.05	<b>4.6</b>
Ácido gálico	LoHA	7.48	1,825,271	1,773,557	1,774,015	1,790,948	57.17	0.02	<b>1.9</b>
	LoAE	7.22	2,524,173	2,429,459	2,334,789	2,429,474	76.38	0.03	<b>2.5</b>
Isoorientina	LoHA	9.36	49,831	47,535	48,814	48,727	5.01	0.00167	<b>0.2</b>
	LoAE	9.37	32,333	37,322	35,616	35,090	4.01	0.00134	<b>0.1</b>

## 7. Caracterización farmacológica

### 7.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media

#### 7.1.1. Lipasa pancreática

Las actividades inhibitorias de LoHA, LoAE, CsHA e isoorientina **4** fueron comparadas a diferentes concentraciones, desde 5 hasta 2500  $\mu\text{g/mL}$ , para obtener su  $\text{CI}_{50}$  en la actividad inhibitoria de lipasa pancreática (Figura 24).



**Figura 24.-** Curva concentración-respuesta de la lipasa pancreática para la determinación de la  $\text{CI}_{50}$ .

La isoorientina **4** mostró la  $\text{CI}_{50}$  más baja, de aproximadamente 434  $\mu\text{g/mL}$  o 200.7  $\mu\text{M}$ , seguida de LoHA con 480  $\mu\text{g/mL}$ , CsHA con 587  $\mu\text{g/mL}$  y la concentración más alta fue de LoAE con 718  $\mu\text{g/mL}$ . Utilizando el mismo método y bajo condiciones idénticas, se determinó la  $\text{CI}_{50}$  del orlistat en el 2016 por Ramírez *et al.* (119) obteniéndose un valor de 0.773  $\mu\text{g/mL}$  o 1.56  $\mu\text{M}$ . Esto significa una potencia relativa de 561.5:1 entre el mejor tratamiento (la isoorientina) y el orlistat.

### 7.1.2. $\alpha$ -glucosidasas

Para la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas (Figura 25), los mismos tratamientos se evaluaron a diferentes concentraciones, desde 6 hasta 3600  $\mu\text{g/mL}$ .

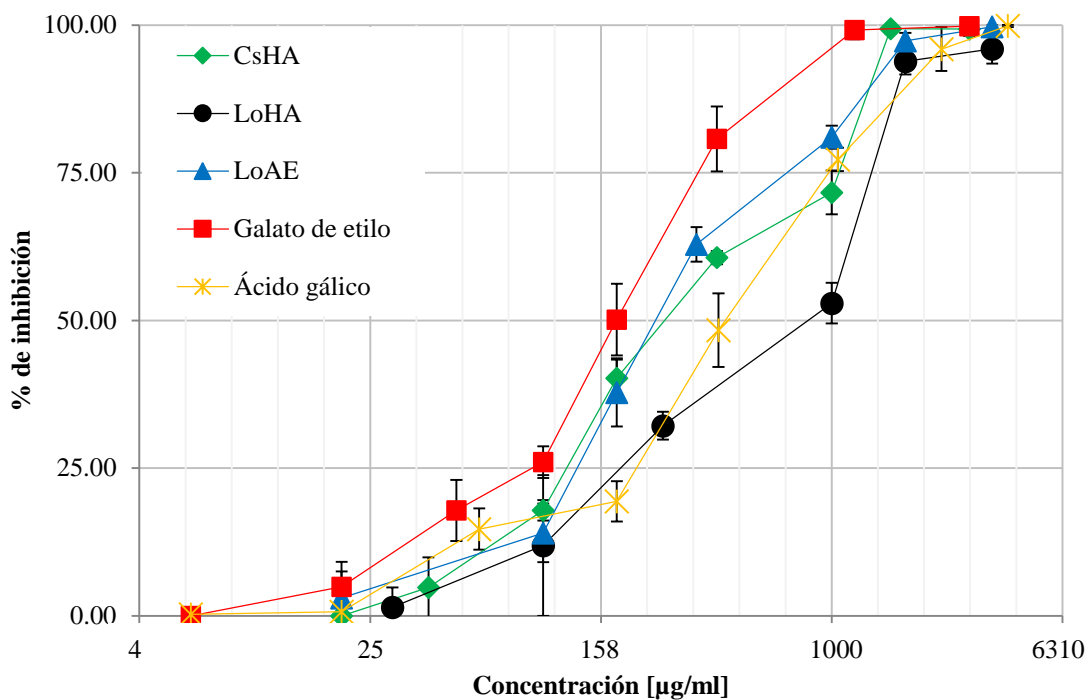


Figura 25.- Curva concentración-respuesta de las  $\alpha$ -glucosidasas para la determinación de la  $CI_{50}$ .

El galato de etilo **26** mostró la  $CI_{50}$  aparente más baja con 165  $\mu\text{g/mL}$  o 832  $\mu\text{M}$ , seguida de LoAE con 250  $\mu\text{g/mL}$ , CsHA con 260  $\mu\text{g/mL}$ , el ácido gálico **20** con 400  $\mu\text{g/mL}$  o 969  $\mu\text{M}$  y por último LoHA con 700  $\mu\text{g/mL}$ .

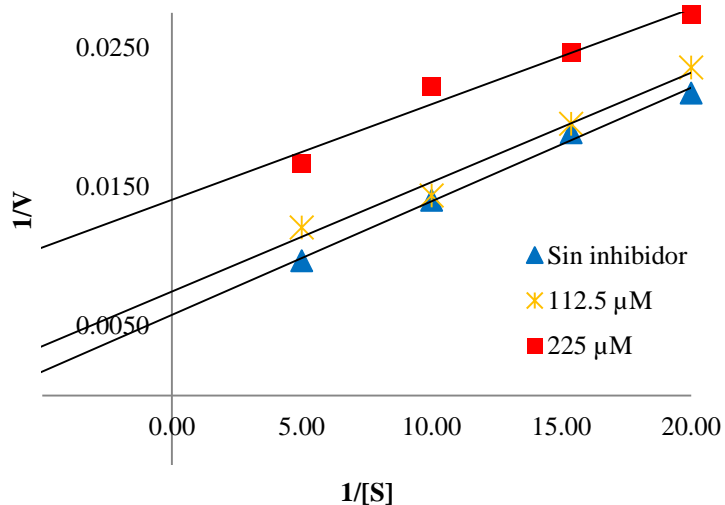
Utilizando el mismo modelo la acarbosa presenta más del 95 % de inhibición a 15.5  $\mu\text{M}$ .

## 7.2. Determinación gráfica del tipo de inhibición enzimática

### 7.2.1. Lipasa pancreática

La velocidad de reacción de la lipasa pancreática se determinó realizando una gráfica de Lineweaver-Burk con concentraciones crecientes de sustrato (0.05, 0.065, 0.1 y 0.2  $\mu\text{g/mL}$ ) sin el inhibidor y en presencia de isoorientina **4** a 112.5 y 225  $\mu\text{M}$ .

De acuerdo con el comportamiento de las rectas observadas en la gráfica obtenida (Figura 26), la isoorientina **4** hace que tanto  $V_{\text{máx}}$  como la  $K_m$  (las intersecciones con ambos ejes) cambien, lo que indica que este compuesto presenta una inhibición acompetitiva (121).



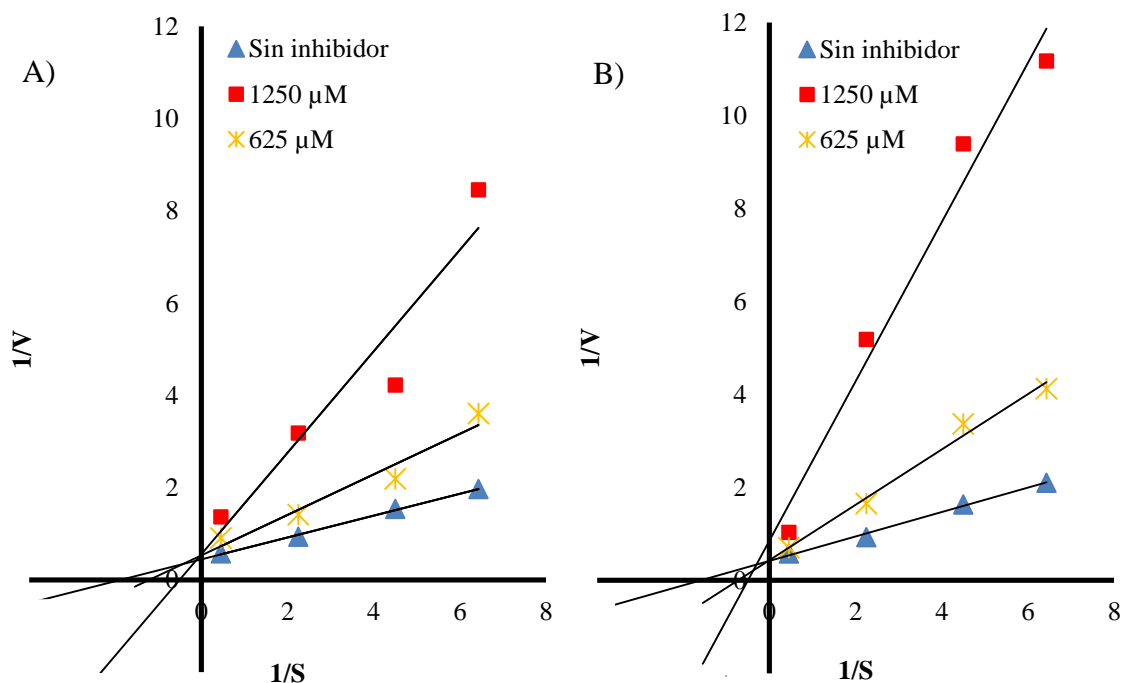
**Figura 26.-** Determinación gráfica del tipo de inhibición enzimática de la isoorientina en lipasa pancreática.



### 7.2.2. $\alpha$ -glucosidasas

La velocidad de reacción de las  $\alpha$ -glucosidasas se determinó realizando una gráfica de Lineweaver-Burk con concentraciones crecientes de maltodextrina como sustrato (5, 1, 0.5 y 0.35 mg/mL), sin inhibidor y en presencia de galato de etilo **26** o ácido gálico **20** a concentraciones de 625 y 1250  $\mu$ M.

De acuerdo con el comportamiento de las rectas observadas en la gráfica obtenida (Figura 27), ambos compuestos provocan un incremento de la  $K_m$  (intersección con el eje X), pero la  $V_{m\acute{a}x}$  (intersección con el eje Y) permanezca igual, por lo que estos compuestos presentan una inhibición competitiva (121).



**Figura 27.-** Determinación gráfica del tipo de inhibición enzimática del (A) galato de etilo y (B) ácido gálico en  $\alpha$ -glucosidasas.

Mediante el análisis de las gráficas se obtuvieron los valores de las constantes de inhibición ( $K_i$ ). Los valores de la  $K_i$  son útiles para describir la fuerza con la que se une el inhibidor al enzima.

Para el galato de etilo **26** a 625  $\mu\text{M}$   $K_i=740 \mu\text{M}$  y a 1250  $\mu\text{M}$   $K_i=340 \mu\text{M}$ . Para el ácido gálico **20** a 625  $\mu\text{M}$   $K_i=490 \mu\text{M}$  y a 1250  $\mu\text{M}$   $K_i=226 \mu\text{M}$ .

Atendiendo a que a mayor valor de  $K_i$ , más débil es la unión del inhibidor con el enzima, los valores de  $K_i$  indican que aunque con almidón como sustrato el galato de etilo **26** es más activo que el ácido gálico **20**, con maltodextrina como sustrato sucede lo contrario en ambas concentraciones.

## DISCUSIÓN

El tratamiento con inhibidores de lipasa pancreática o de  $\alpha$ -glucosidasas ha demostrado tener múltiples efectos benéficos tanto en modelos *in vitro*, *in vivo* e incluso en estudios clínicos enfocados en la prevención y tratamiento de la DMt2, así como el tratamiento del SPyO. Los mecanismos de acción de estos grupos de fármacos pueden considerarse miméticos de la restricción calórica, considerando que disminuyen la absorción de triglicéridos y carbohidratos a nivel intestinal y con ello la absorción calórica.

Además de múltiples beneficios metabólicos (como la reducción de peso corporal, diámetro de cintura y HbA1c, regulación de la presión arterial, niveles de lípidos, niveles de glucosa sérica en ayunas y postprandial y niveles de insulina postprandial), la restricción calórica se ha asociado, en varias especies, con la desaceleración del envejecimiento y la disminución o retraso en la aparición de morbilidades relacionadas con la edad (126). Uno de los mecanismos claramente involucrados en este fenómeno es la reducción de la intolerancia a la glucosa (127).

En este sentido, de acuerdo con Lin *et al.* (107) se reportó la mejora del control glucémico y de la memoria en ratones diabéticos utilizando un extracto etanólico de *L. octovalvis*, además se observó mejora en la captación de glucosa en células musculares y disminución de la producción de la misma en células hepáticas. Se sugiere que todos estos efectos son causados por un mimetismo de la restricción calórica, ya que en un estudio previo con *Drosophila melanogaster* (106) el efecto antienvjecimiento y mejorador de la memoria del extracto solo se observó en el grupo con dieta hipercalórica. Este mimetismo podría ser causado, al menos en parte, por la inhibición de lipasa pancreática del extracto.

Además, en otro estudio (113) el extracto metanólico de *L. octovavis* mostró efecto en el control glucémico de ratas diabéticas, específicamente mediante actividad antihiperglucemiante, que podría tener como uno de sus mecanismos de acción la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas. Por lo que continuar con el estudio sistemático de esta especie podría ayudar en el desarrollo de un nuevo fitofármaco auxiliar en el tratamiento del SPyO y la DMt2.

En el presente trabajo, se obtuvieron tres fracciones de diferente polaridad (LoAE, LoAqS y LoAqP) a partir de la bipartición de un extracto hidroalcohólico de *L. octovalvis*. De acuerdo con las pruebas en CCF, la concentración de los compuestos de baja y mediana polaridad en LoAE parece incrementar considerablemente la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas. Sin embargo, en las fracciones acuosas, que contienen compuestos más polares, también se observó aumento de la actividad. Esto porque probablemente además de los compuestos identificados como los más activos, en estas fracciones existen otros compuestos no identificados con alta actividad inhibitoria.

El fraccionamiento biodirigido de LoAE permitió identificar varias fracciones que presentaban el efecto inhibitorio de la lipasa pancreática y de  $\alpha$ -glucosidasas, siendo C1F17 y C1F32 las más activas, seguidas de las fracciones más polares, especialmente C1F52, que de acuerdo a su polaridad probablemente contenga compuestos de tipo flavonoide, también presentes en LoAqP y LoAqS.

A partir de las fracciones C1F17 y C1F32 se obtuvo ácido gálico **20** y su éster etílico (galato de etilo **26**), respectivamente.

El ácido gálico **20** y sus ésteres son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, y su actividad inhibitoria de enzimas digestivas ya ha sido descrita en estudios previos. Sin embargo, los resultados encontrados en la literatura son muy contradictorios. Por ejemplo, de acuerdo con algunos autores (128–132) el ácido gálico **20** presentó una actividad inhibitoria poco potente o nula de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus sp.* ( $CI_{50} > 5882 \mu M$ ) y porcina (inhibición nula),  $\alpha$ -glucosidasas de *Saccharomyces sp.* ( $CI_{50} = 841 \mu M$ ) y de rata (38  $\mu g/mL$ ), maltasa de rata ( $CI_{50} = 390 \mu M$  o nula) y sacarasa de rata ( $CI_{50} = 130 \mu M$  o nula). Sin embargo, según otros estudios, el ácido gálico **20** muestra buena actividad inhibitoria en  $\alpha$ -glucosidasas de levadura ( $CI_{50}=5.2 \mu M$ ) y de rata ( $CI_{50}=38 mg/mL$  y  $4.673 \mu M$ ), maltasa de rata ( $CI_{50}=390 \mu M$ ) y sacarasa de rata ( $130 \mu M$ ) (129,131,133,134). Respecto al galato de etilo **26** existen reportes de inhibición regular de maltasa ( $CI_{50}=415 \mu M$ ) y sacarasa ( $CI_{50}=660 \mu M$ ) de rata (129).

Esta variación de resultados puede deberse en parte a la diversidad de enzimas y sustratos utilizados para estos ensayos, ya que se ha demostrado que el efecto de los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas varía según el origen de los enzimas y el tipo de sustrato utilizado (135); de acuerdo con Oki *et al.*, para realizar la evaluación de posibles inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas de uso clínico, se deben utilizar enzimas de mamífero y sustratos adecuados para cada tipo de enzima. Por lo tanto, el presente trabajo realiza la evaluación de los inhibidores enzimáticos mediante un método adecuado.

Es interesante destacar que a excepción del estudio antes mencionado (129), no hay otros reportes de la evaluación de esta actividad con el compuesto galato de etilo **26**. Sin embargo, si hay reportes de la actividad inhibitoria de lipasa pancreática del ácido gálico **20** ( $CI_{50}= 112 \mu\text{M}$ ,  $23 \mu\text{M}$  y  $387.2 \mu\text{M}$ ) y en menor medida del galato de etilo **26** ( $CI_{50}=4.5 \mu\text{M}$ ) (136–138), aunque en estos trabajos las actividades inhibitorias no fueron consideradas sobresalientes.

En cuanto a las gráficas para la determinación de la  $CI_{50}$  de la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas presentadas en este trabajo, se observa claramente que, con almidón como sustrato, el galato de etilo **26** es mucho más activo ( $CI_{50}= 165 \mu\text{g/mL}$  o  $832 \mu\text{M}$ ) que el resto de los tratamientos en todas las concentraciones evaluadas, en cambio el ácido gálico **20** ( $CI_{50}=400 \mu\text{g/mL}$  o  $969 \mu\text{M}$ ) a bajas concentraciones no es mejor que LoAE ( $CI_{50}= 250 \mu\text{g/mL}$ ) o CsHA ( $260 \mu\text{g/mL}$ ). También se observa que LoAE aumenta considerablemente su actividad respecto a LoHA ( $CI_{50}=700 \mu\text{g/mL}$ ) en todas las concentraciones, por lo que sería recomendable diseñar un método de extracción o separación que concentre los compuestos de mediana polaridad del extracto.

Se han realizado relativamente pocos estudios en los que se determine el tipo de inhibición de los compuestos fitoquímicos sobre los enzimas digestivos, así como las determinaciones de parámetros cinéticos como la  $K_i$ . Hasta ahora no se había reportado la identificación del tipo de inhibición de ninguno de los compuestos aislados en este trabajo con enzimas digestivas (139). De acuerdo con los datos obtenidos, tanto el galato de etilo **26** como el ácido gálico **20** son inhibidores competitivos de las  $\alpha$ -glucosidasas. Este tipo de inhibición indica que el inhibidor compite directamente con el sustrato por el sitio de unión en el centro activo del enzima, ya que no es posible la unión simultánea de ambas moléculas.

Sin embargo, cuando se aumenta la concentración del sustrato, este es capaz de desplazar al inhibidor y viceversa. Lo anterior es notable debido a que el valor de la  $V_{m\acute{a}x}$  de la reacción no cambia, pero sí cambia la afinidad del enzima por su sustrato, representada por la  $K_m$ , (121). Aunque de acuerdo con los valores de  $CI_{50}$ , la actividad inhibitoria fue más potente con el galato de etilo **26** que con el ácido gálico **20**, los valores de  $K_i$  y las gráficas de Lineweaver-Burk indican que, al menos con maltodextrina como sustrato, el ácido gálico **20** es más potente.

En cuanto a la actividad inhibitoria de lipasa pancreática, se observó una disminución de la actividad en las fracciones acuosas y un incremento en LoAE. La actividad inhibitoria en este modelo también fue más activa en las fracciones de LoAE más polares, de las cuales se seleccionó C1F65 para su fraccionamiento. A partir de C1F65 se obtuvieron varias subfracciones con actividades muy parecidas a las del compuesto aislado, isoorientina **4**. Estas fracciones contienen principalmente compuestos de dos grupos fitoquímicos diferentes, uno no identificado y compuestos tipo flavonoide. Entre estas fracciones, C9F51 presentó una actividad inhibitoria casi igual a la de la isoorientina **4**, además tiene un comportamiento en CCF semejante, por lo que probablemente podría corresponder a orientina **3**.

La isoorientina **4**, al igual que otros flavonoides C-glicosilados, ha mostrado alta actividad inhibitoria de la lipasa pancreática (140). De acuerdo con la literatura, los flavonoides C-glucósidos, particularmente los que presentan la unión al resto glicosilo mediante el carbono 8 y no mediante el carbono 6, parecen aumentar considerablemente su actividad inhibitoria de lipasa pancreática respecto a los O-glucósidos (141). Por ejemplo, la actividad de la luteolina **17**, que no tiene un grupo C-glicosilo en su anillo A, fue mucho más débil que la de las flavonas que si tienen estos motivos, encontrándose valores de  $CI_{50}$  de 200  $\mu M$  para la luteolina **17**, 44.6  $\mu M$  para la isoorientina **4** y 31.6  $\mu M$  para orientina **3**, contra 18.5  $\mu M$  del orlistat (142).

Además de la inhibición de lipasa pancreática, la isoorientina **4** también tiene reportada la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas (143), aunque se ha descrito que, contrario a lo que ocurre con la inhibición de la lipasa pancreática, la C-glucosilación de las flavonas, particularmente las que se dan mediante el carbono 8, debilita su actividad inhibitoria comparada con sus agliconas (141), por lo que no son compuestos particularmente activos. Por ejemplo, se describió que a 25  $\mu$ M la luteolina (60.42 %) es más activa que la isoorientina **4** (47.72 %) y esta a su vez es más activa que la orientina (38.22 %) (134).

Respecto a la caracterización farmacológica en la inhibición de lipasa pancreática, se encontró que, de acuerdo con las gráficas para la determinación de la  $CI_{50}$ , la isoorientina **4** fue el tratamiento más eficaz ( $CI_{50}$ =434  $\mu$ g/mL), seguido de LoHA (480  $\mu$ g/mL), el control vegetal positivo CsHA (587  $\mu$ g/mL) y finalmente LoAE ( $CI_{50}$ =718  $\mu$ g/mL).

A pesar de ello, el comportamiento general de los tratamientos a diferentes dosis, particularmente el del compuesto aislado y LoHA es muy parecido, sugiriendo que no sería necesario llegar al aislamiento de esta molécula para poder desarrollar un fitofármaco con buena actividad inhibitoria.

De acuerdo con los resultados en las gráficas de Lineweaver-Burk, la isoorientina **4** presentó una inhibición de tipo acompetitiva en el modelo de lipasa pancreática, este es un tipo de inhibición muy poco frecuente, en el que la inhibición afecta en la misma medida a  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$ , ya que el inhibidor se une exclusivamente al complejo enzima-sustrato o a un sitio alosterico de la enzima y no permite que reaccione para generar el producto (121).

Es particularmente interesante señalar que utilizando el mismo método con condiciones idénticas a las de este trabajo, la  $CI_{50}$  del orlistat fue determinada en el 2016 como 0.773  $\mu$ g/mL o 1.56  $\mu$ M (119), mientras que también con condiciones idénticas la acarbosa presentó más del 95 % de inhibición a 15.5  $\mu$ M (100). Por lo tanto, aunque todos los tratamientos evaluados (incluyendo al control vegetal positivo) fueron eficaces, ninguno fue más potente que los controles farmacológicos acarbosa y orlistat que presentan valores de potencia por lo menos diez veces mayores.

Sin embargo, además de presentar actividad inhibitoria de enzimas digestivas, *L. octovalvis*, ha mostrado tener actividad hepatoprotectora (101), que resulta particularmente importante porque uno de los efectos secundarios más graves asociados a los actuales tratamientos para el SPyO con inhibidores de lipasa pancreática, como el orlistat y los productos derivados de *C. sinensis*, es la inducción de daño hepático (35,60). *L. octovalvis* también tiene reporte de actividad antidiarreica, probablemente por regulación de la motilidad gastrointestinal (112), esta actividad podría ayudar a reducir algunos de los efectos secundarios propios de la inhibición de lipasa pancreática, como la urgencia fecal o el dolor abdominal; aunque es necesario realizar más estudios *in vivo* que analicen a fondo si la relación de estas actividades mejora o empeora dichos efectos.

Los resultados encontrados en el presente trabajo indican que una fracción de acetato de etilo de *Ludwigia octovalvis*, tiene potencial para utilizarse en el desarrollo de un fitomedicamento útil como una alternativa terapéutica en el tratamiento del SPyO y la DMt2, mediante la inhibición de los enzimas digestivos lipasa pancreática y  $\alpha$ -glucosidasas, por lo que se deberían realizar estudios de su efectividad y seguridad en modelos *in vivo* y pruebas clínicas. Esto principalmente por el incremento en la concentración de compuestos biactivos y una mayor actividad biológica respecto al extracto hidroalcohólico de *L. octovalvis*.

Mediante la cuantificación de los compuestos activos en LoHA y LoAE por análisis cromatográfico, se advirtió que la bipartición aumentó la concentración de los galatos en la fracción orgánica, especialmente la del galato de etilo **26**, explicando su incremento de actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas, pero la concentración de isoorientina **4** no solo es muy baja en LoHA sino que además disminuyó en LoAE, por lo que probablemente este sea solo uno de los varios compuestos con actividad inhibitoria de lipasa pancreática presentes en el extracto.



## CONCLUSIONES

A partir del estudio químico biodirigido del extracto hidroalcohólico de *L. octovalvis* se logró el aislamiento, elucidación estructural y caracterización de dos compuestos con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas y uno con actividad inhibitoria de lipasa pancreática.

Los compuestos con mayor actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas fueron el ácido gálico y el galato de etilo (con inhibición competitiva), mientras que la isoorientina fue el compuesto con mayor actividad inhibitoria de lipasa (de tipo incompetitiva).

Mediante la caracterización farmacológica de los tres compuestos, se reconoció que en el caso de la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas, si se encontraron los principales compuestos responsables de la actividad biológica, en cambio en la inhibición de lipasa pancreática se observó que probablemente es la sinergia de las actividades de varios compuestos del extracto la responsable de esta actividad.

Estos resultados evidencian que la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas y lipasa pancreática del extracto de *L. octovalvis* se debe, al menos en parte, a los compuestos aislados, por lo que los datos presentados en este trabajo podrían ser útiles para el futuro desarrollo de un fitomedicamento auxiliar en el tratamiento de la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 estandarizado en estos compuestos.

## **PERSPECTIVAS**

El estudio sistemático del extracto hidroalcohólico (LoHA) y la fracción de acetato de etilo de *Ludwigia octovalvis* (LoAE) debe continuar, principalmente en modelos preclínicos, para identificar la actividad biológica *in-vivo* con modelos animales, además de estudiar su toxicidad aguda y crónica, así como sus posibles efectos secundarios, esto para poder proponer el desarrollo de un fitomedicamento a partir de esta fracción, que sea efectivo y eficaz en el apoyo al tratamiento del sobrepeso, la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murray RK, Davis JC. Harper's Illustrated Biochemistry [Internet]. Vol. 16, Molecular Physiology. 2003. 702 p. Disponible en: <http://www.mhprofessional.com/product.php?cat=39&isbn=0071625917>
2. Boyle J. Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. Biochem Mol Biol Educ [Internet]. 2005;33(1):74–5. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmb.2005.494033010419>
3. Álvarez EE, González P. La fibra dietética. Nutr Hosp. 2006;21(2):61–72.
4. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Biochemistry. 6ta ed. Freeman WH, editor. New York; 2007.
5. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Bioquímica. 3ra ed. Interamericana M-H, editor. Barcelona; 2006.
6. Krause HP, Ahr HJ. Handbook of experimental pharmacology. Oral Antidiabetics. Kuhlmann J, Puls W, editores. Handbook of experimental pharmacology. Oral Antidiabetics. Berlin: Springer; 1996. 541-545 p.
7. Castrejón V, Carbó R, Martínez M. Mecanismos moleculares que intervienen en la glucosa. Rev Educ Bioquímica. 2007;26(2):49–57.
8. Holst JJ. The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. Physiol Rev. 2007;87(4):1409–39.
9. Osorio-Paz I, Salceda-Sacanelles R. Control hormonal de la homeostásis energética: De la célula al cerebro. Rev Educ Bioquímica. 2012;31(2):41–8.
10. Mathews K, van Holde E, Aher G. Bioquímica. 3th ed. Pearson Addison W, editor. España; 2004.
11. Tso P, Crissinger K. Digestion and absorption of lipids. En: Stipanuk MH, editor.

- Biochemical and physiological aspects of human nutrition. 1st ed. 2000. p. 125–41.
12. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Metab.* 2009;296(6):E1183–94.
  13. Yen C-LE, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese R V. *Thematic Review Series: Glycerolipids*. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* [Internet]. 2008;49(11):2283–301. Disponible en: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R800018-JLR200>
  14. Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva no. 311 [Internet]. [Internet]. 2015 [citado el 9 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>
  15. Dávila-Torres J, González-Izquierdo J, Barrera-Cruz A. Panorama de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015;53(2):240–9.
  16. Hussain S, Bloom S. The Pharmacological Treatment and Management of Obesity. *Posgr Med.* 2011;123(1):34–44.
  17. Sassi F. Obesity and the Economics of Prevention - Fit not Fat. *Oecd* [Internet]. 2010;2010(128):5–11. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21240948>
  18. INSP. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 [Internet]. 2016. Disponible en: <http://fmdiabetes.org/encuesta-nacional-salud-nutricion-medio-camino-2016/>
  19. González-Muniesa P, Martínez-González M-A, Hu FB, Després J-P, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017;3:17034. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nrdp201734>
  20. Acosta A, Camilleri M, Burton D, O'Neill J, Eckert D, Carlson P, et al. Exenatide in obesity with accelerated gastric emptying: a randomized, pharmacodynamics study.

- Physiol Rep [Internet]. 2015;3(11):1–10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632965/pdf/phy20003-e12610.pdf><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26542264><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4632965>
21. Bhupathiraju SN, Hu FB. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circ Res*. 2017;118(11):1723–35.
  22. Moreno M. Definición y clasificación de la obesidad. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2016;23(2):124–8.
  23. Flier JS. Obesity Wars: Molecular Progress Confronts an Expanding Epidemic. *Cell*. 2004;116(2):337–50.
  24. Christopoulou FD, Kiortsis DN. An overview of the metabolic effects of rimonabant in randomized controlled trials: Potential for other cannabinoid 1 receptor blockers in obesity. *J Clin Pharm Ther*. 2011;36(1):10–8.
  25. Kirilly E, Gonda X, Bagdy G. Review CBI receptor antagonists: new discoveries leading to new perspectives. *Acta Physiol*. 2012;205:41–60.
  26. Rodríguez-Scull L. Obesidad: fisiología, etiopatogenia y fisiopatología. *Rev Cuba Endocrinol* [Internet]. 2003;14.(2). Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/end/vol14\\_2\\_03/end06203.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/end/vol14_2_03/end06203.htm)
  27. Sánchez-Muñoz F, García-Macedo R, Alarcón-Aguilar F, Cruz M. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac médica México*. 2005;141(6):505–12.
  28. Bastarrachea RA, López-Alvarenga JC, Bolado-García VE, Téllez-Mendoza J, Laviada-Molina H, Comuzzie AG. Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gac Med Mex* [Internet]. 2007;143(6):505–12. Disponible en: [www.anmm.org.mx](http://www.anmm.org.mx)

29. Gamboa-Gómez CI, Rocha-Guzmán NE, Moreno-Jiménez MR, Vázquez-Cabral BD, González-Laredo RF. Plants with potential use on obesity and its complications. *EXCLI J*. 2015;14:809–31.
30. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010;51(2):679–89.
31. Mitchell N, Catenacci V, Wyatt HR, Hill JO. Obesity: Overview of an epidemic. *Psychiatr Clin North Am* [Internet]. 2005;28(1):1–23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psc.2011.08.005>
32. Perez-Cornago A, de la Iglesia R, Lopez-Legarrea P, Abete I, Navas-Carretero S, Lacunza CI, et al. A decline in inflammation is associated with less depressive symptoms after a dietary intervention in metabolic syndrome patients: a longitudinal study. *Nutr J* [Internet]. 2014;13(1):36. Disponible en: <http://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2891-13-36>
33. Galicia-Martín I, Simal-Antón A. Tratamiento farmacológico de la obesidad. *Inf Ter del Sist Nac Salud*. 2002;26(5):117–27.
34. García-García E, Mancillas-Adame L. El tratamiento farmacológico de la obesidad y el adiós necesario de la sibutramina. ¿Hemos recargado la escalera en la pared equivocada? *Rev Endocrinol y Nutr*. 2010;18(3):132–4.
35. Londoño-Lemos ME. Tratamiento farmacológico contra la obesidad. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* [Internet]. 2012;41(2):217–61. Disponible en: [www.farmacia.unal.edu.co](http://www.farmacia.unal.edu.co)
36. Mietlicki-Baase EG. Amylin-mediated control of glycemia, energy balance, and cognition. *Physiol Behav* [Internet]. 2016;162:130–40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.034>
37. Zhi J, Melia A, Guerciolini R, Chung J, Kinberg J, Hauptman J, et al. Retrospective population-based analysis of the dose-response (fecal fat excretion) relationship of

- Orlistat in normal and obese volunteers. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 1994;56(1):82–5. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/clpt.1994.104/abstract;jsessionid=05A09E0D9B09651B50988D0A42BDA768.f01t02>
38. Drew B, Dixon A, Dixon J. Obesity management: Update on Orlistat. *Vasc Health Risk Manag* [Internet]. 2007;3(6):817–821. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2350121/>
  39. Padwal R, Li S, Lau D. Long-term pharmacotherapy for obesity and overweight. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(4):CD004094.
  40. Kopelman P, de Groot HG, Rissanen A, Rossner S, Toubro S, Palmer R, et al. Weight Loss, HbA<sub>1c</sub> Reduction, and Tolerability of Cetilistat in a Randomized, Placebo-controlled Phase 2 Trial in Obese Diabetics: Comparison With Orlistat (Xenical). *Obesity* [Internet]. 2010;18(1):108–15. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2009.155>
  41. Velliquette RA, Grann K, Missler SR, Patterson J, Hu C, Gellenbeck KW, et al. Identification of a botanical inhibitor of intestinal diacylglyceride acyltransferase 1 activity via in vitro screening and a parallel, randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial. *Nutr Metab (Lond)* [Internet]. 2015;12:27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12986-015-0025-2>
  42. DeVita RJ, Pinto S. Current status of the research and development of diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) inhibitors. *J Med Chem* [Internet]. 2013;56(24):9820–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/jm4007033>
  43. Rivera G, Bocanegra A, Acosta R, De la Garza M, Flores G. Tratamiento de la obesidad; nuevas perspectivas. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2006;38(2):48–56.
  44. Cheung BMY, Cheung TT, Samaranayake NR. Safety of antiobesity drugs. *Ther Adv Drug Saf* [Internet]. 2013;4(4):171–81. Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2042098613489721>

45. Tran L, Zielinski A, Roach AH, Jende JA, Householder AM, Cole EE, et al. Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetes: Oral Medications. *Ann Pharmacother.* 2015;49(5):540–56.
46. Zimmet PZ, Alberti KGMM. Epidemiology of diabetes - Status of a pandemic and issues around metabolic surgery. *Diabetes Care.* 2016;39(6):878–83.
47. Shettar V, Patel S, Kidambi S. Epidemiology of Obesity and Pharmacologic Treatment Options. *Nutr Clin Pract* [Internet]. 2017;32(4):441–62. Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0884533617713189>
48. Torgerson J, Hauptman J, Boldrin M, Sjöström L. XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of Orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care.* 2004;27(1):155–61.
49. Rössner S, Sjöström L, Noack R, Meinders AE, Nosedá G. Weight Loss, Weight Maintenance, and Improved Cardiovascular Risk Factors after 2 Years Treatment with Orlistat for Obesity. *Obes Res* [Internet]. 2000;8(1):49–61. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2000.8>
50. Richelsen B, Tonstad S, Rossner S, Toubro S, Niskanen L, Madsbad S. Effect of orlistat on weight regain and cardiovascular risk factors following a very-low-energy diet in abdominally obese patients: a 3-year randomized, placebo-controlled study. *Diabetes care.* 2007;30(1):27–32.
51. Lindgarde F. The effect of orlistat body weight and coronary heart disease risk profile in obese patients: The swedish multimorbidity study. *J Intern Med.* 2000;248(3):245–54.
52. Padwal RS, Majumdar SR. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet.* 2007;369:71–7.
53. Zelber-Sagi S, Kessler A, Branzowsky E, Webb M, Lurie Y, Santo M, et al. A



- Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial of Orlistat for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. el 1 de mayo de 2006 [citado el 14 de noviembre de 2017];4(5):639–44. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.conricyt.org/science/article/pii/S1542356506001443?via%3Dihub>
54. Ballinger A. Expert Opinion on Pharmacotherapy Orlistat in the treatment of obesity. *Expert Opin Pharmacother*. 2000;1(4):841–7.
  55. Drugs.com. Xenical [Internet]. 2000 [citado el 8 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.drugs.com/pro/xenical.html>
  56. Kopelman P, Bryson A, Hickling R, Rissanen A, Rossner S, Toubro S, et al. Cetilistat (ATL-962), a novel lipase inhibitor: a 12-week randomized, placebo-controlled study of weight reduction in obese patients. *Int J Obes*. 2007;31:494–9.
  57. Hainer V. Overview of new antiobesity drugs. *Expert Opin Pharmacother* [Internet]. 2014;15(14):1–4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25100293>
  58. Li DQ, Qian ZM, Li SP. Inhibition of three selected beverage extracts on  $\alpha$ -glucosidase and rapid identification of their active compounds using HPLC-DAD-MS/MS and biochemical detection. *J Agric Food Chem*. 2010;58(11):6608–13.
  59. Wang X, Liu Q, Zhu H, Wang H, Kang J, Shen Z, et al. Flavanols from the *Camellia sinensis* var. *assamica* and their hypoglycemic and hypolipidemic activities. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2017;7(3):342–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2016.12.007>
  60. Higuera-de la Tijera M de F, Servín-Caamaño AI, Alexanderson-rosas EG. Toxicidad hepática inducida por fármacos y herbolaria. *Rev médica del Hosp Gen México*. 2013;75(4):230–7.
  61. American Diabetes Association (ADA). Standard of medical care in diabetes - 2017. *Diabetes Care*. 2017;40 (sup 1)(January):s4–128.

62. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas [Internet]. 8a ed. Karuranga S, da Rocha Fernandes J, Huang Y, Malanda B, editores. 2017. 0-148 p. Disponible en: [www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org)
63. Organización Mundial de la salud. Organización Mundial de la salud. Diabetes. Nota descriptiva no. 312 [Internet]. 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
64. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales [Internet]. Instituto Nacional de Salud Pública. 2012. p. 200. Disponible en: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
65. Arredondo A, De Icaza E. Costos de la Diabetes en América Latina: Evidencias del Caso Mexicano. Value Heal [Internet]. 2011;14(5 SUPPL.):S85–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jval.2011.05.022>
66. Defronzo RA. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Diabetes. 2009;58(4):773–95.
67. Durruty P, García de los Ríos M. Glucotoxicidad y lipotoxicidad: factores en la patogénesis y evolución de la diabetes tipo 2 [Internet]. Vol. 129, Revista médica de Chile. 2001. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872001000600013&lng=en&nrm=iso&tlng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872001000600013&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
68. Lima-Martínez MM, Betancourt L, Bermúdez A. Glucagón: ¿un simple espectador o un jugador clave en la fisiopatología de la diabetes? Av en Diabetol [Internet]. 2011;27(5):160–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.avdiab.2011.09.002>
69. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. Clin Diabetes. 2011;29(3):116–22.
70. Boyle PJ. Diabetes Mellitus and Macrovascular Disease: Mechanisms and Mediators.

Am J Med. 2007;120(9 SUPPL. 2):12–7.

71. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Burden AC, Morris A, Waugh NR, et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia*. 2003;46(6):760–5.
72. Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al. Diabetic neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2005;28(4):956–62.
73. Fong D, Aiello L, Gardner T, King G. Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 2003;74:3–36.
74. Roche-Collado E. Glucolipototoxicidad en la célula  $\beta$  y su relación con la diabetes tipo 2. En: Montanya E, editor. *El islote pancreático en el desarrollo y tratamiento de la diabetes* [Internet]. Madrid; 2007. p. 154. Disponible en: [http://www.sediabetes.org/gestor/upload/SED LIBRO ISLOTES PANCREATICOS.pdf](http://www.sediabetes.org/gestor/upload/SED_LIBRO_ISLOTES_PANCREATICOS.pdf)
75. Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontés G. Glucolipototoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2010;1801(3):289–98. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2009.08.006>
76. Arechavaleta Granell R. El efecto fisiológico de las hormonas incretinas [Internet]. Vol. 6, *Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine* [Internet]. 2006 [citado el 9 de marzo de 2018]. p. s581–5. Disponible en: [www.jhasim.com/files/articlefiles/pdf/ASIM\\_Issue\\_6\\_7A\\_p581\\_585\\_Span.pdf](http://www.jhasim.com/files/articlefiles/pdf/ASIM_Issue_6_7A_p581_585_Span.pdf)
77. Scheen AJ. Investigational insulin secretagogues for type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2016;25(4):405–22. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.2016.1152260>
78. DiNicolantonio JJ, Bhutani J, O’Keefe JH. Acarbose: safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes. *Openheart*.

2015;2(1):1–13.

79. Schnell O, Weng J, Sheu WHH, Watada H, Kalra S, Soegondo S, et al. Acarbose reduces body weight irrespective of glycemic control in patients with diabetes: Results of a worldwide, non-interventional, observational study data pool. *J Diabetes Complications* [Internet]. 2016;30(4):628–37. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.01.023>
80. Ghani U. Re-exploring promising  $\alpha$ -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2015;103:133–62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.08.043>
81. Sugimoto S, Nakajima H, Kosaka K, Hosoi H. Review: Miglitol has potential as a therapeutic drug against obesity. *Nutr Metab (Lond)* [Internet]. 2015;12(1):51. Disponible en: <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/12/1/51>
82. Wu H, Liu J, Lou Q, Liu J, Shen L, Zhang M, et al. Comparative assessment of the efficacy and safety of acarbose and metformin combined with premixed insulin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Med* [Internet]. 2017;96(35):e7533. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5585474/>
83. Wang N, Zhang J, Xing X, Yang Z, Zhang B, Wang X, et al. Associations between changes in glucagon-like peptide-1 and bodyweight reduction in patients receiving acarbose or metformin treatment. *J Diabetes*. 2017;9(8):728–37.
84. Wang J, Lee I, Lee W, Lin S, Su S, Tu S, et al. Glycemic excursions are positively associated with HbA1c reduction from baseline after treatment with acarbose in patients with type 2 diabetes on metformin monotherapy. *J Diabetes*. 2017;9(3):248–55.
85. Du J, Liang L, Fang H, Xu F, Li W. Efficacy and safety of saxagliptin compared with acarbose in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus uncontrolled on metformin monotherapy : Results of a Phase IV open-label randomized controlled study ( the

- SMART study ). *Diabetes, Obes Metab.* 2017;19(11):1513–20.
86. Chiasson J, Josse R, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. Acarbose Treatment and the Risk of Cardiovascular Disease and Hypertension in Patients With Impaired Glucose Tolerance: The STOP-NIDDM trial. *J Am Med Assoc.* 2003;290(4):486–94.
  87. Holman RR, Coleman RL, Chan JCN, Chiasson J, Feng H, Ge J, et al. Effects of acarbose on cardiovascular and diabetes outcomes in patients with coronary heart disease and impaired glucose tolerance (ACE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(11):877–86.
  88. Esquivel MA, Lansang MC. Optimizing diabetes treatment in the presence of obesity. *Cleve Clin J Med* [Internet]. 2017;84(1):S22–9. Disponible en: <http://www.mdedge.com/ccjm/article/142008/diabetes/optimizing-diabetes-treatment-presence-obesity>
  89. Riddle MC. Basal glucose can be controlled, but the prandial problem persists-It's the next target. *Diabetes Care.* 2017;40(3):291–300.
  90. Kaku K. Efficacy of voglibose in type 2 diabetes. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(8):1181–90.
  91. Wu SJ, Ng LT, Wang GH, Huang YJ, Chen JL, Sun FM. Chlorophyll a, an active anti-proliferative compound of *Ludwigia octovalvis*, activates the CD95 (APO-1/CD95) system and AMPK pathway in 3T3-L1 cells. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2010;48(2):716–21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.001>
  92. Mitra S, Karmakar A, Mukherjee A, Barik A. The Role of Leaf Volatiles of *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) Raven in the Attraction of *Altica cyanea* (Weber) (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Chem Ecol.* 2017;43(7):679–92.
  93. Vibrans H. Malezas de México [Internet]. 2009. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/onagraceae/ludwigia-octovalvis/fichas/ficha.htm>

94. Mitra S, Sarkar N, Barik A. Long-chain alkanes and fatty acids from *Ludwigia octovalvis* weed leaf surface waxes as short-range attractant and ovipositional stimulant to *Altica cyanea* (Weber) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bull Entomol Res* [Internet]. 2017;107(3):391–400. Disponible en: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007485316001012/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007485316001012/type/journal_article)
  
95. Cumana-Campos LJ. Clave para especies de *Ludwigia* L. (Onagraceae) de la región nor-oriental e insular de Venezuela depositadas en el herbario IRBR. *Acta Bot Venez* [Internet]. 2010;33(2):299–327. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0084-59062010000200008](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0084-59062010000200008)
  
96. Murugesan T, Sinha S, Pal M, Saha B. Review on Phytochemical and Medicinal Aspects of *Jussiaea Suferuticosa* Linn. *Anc Sci Life* [Internet]. 2002;21(3):205–7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3331036/>
  
97. Khan MH, Yadava PS. Antidiabetic plants used in Thoubal district of Manipur, Northeast India. *Indian J Tradit Knowl* [Internet]. 2010;9(3):510–4. Disponible en: <http://hdl.handle.net/123456789/9783>
  
98. van Valkenburg JLCH, Bunyaphatsara N. Plant Resources of South-East Asia no. 12 (2). *Med poisonous plants 2*. 2001;12(2).
  
99. UNAM. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana [Internet]. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009 [citado el 2 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>
  
100. Ramírez G, Zavala M, Pérez J, Zamilpa A. In vitro screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2012;2012:1–6.
  
101. Kadum Yakob H, Manaf Uyub A, Fariza Sulaiman S. Toxicological evaluation of 80%

- methanol extract of *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P.H. Raven leaves (Onagraceae) in BALB/c mice. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2012;142(3):663–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.035>
102. Averett JE, Zardini EM, Hoch PC. Flavonoid systematics of ten sections of *Ludwigia* (Onagraceae). *Biochem Syst Ecol*. 1990;18(7–8):529–32.
  103. Chang CI, Kuo CC, Chang JY, Kuo YH. Three New Oleanane-Type Triterpenes from *Ludwigia octovalvis* with Cytotoxic Activity against Two Human Cancer Cell Lines. *J Nat Prod*. 2004;67(1):91–3.
  104. Yan J, Yang XW. Studies on the chemical constituents in herb of *Ludwigia octovalvis*. *China J Chinese Mater medica*. 2005;30(24):1923–6.
  105. Yang LL, Yen KY, Kiso Y, Hikino H. Antihepatotoxic actions of Formosan plant drugs. *J Ethnopharmacol*. 1987;19(1):103–10.
  106. Lin WS, Chen JY, Wang JC, Chen LY, Lin CH, Hsieh TR, et al. The anti-aging effects of *Ludwigia octovalvis* on *Drosophila melanogaster* and SAMP8 mice. *Am Aging Assoc*. 2014;36(2):689–703.
  107. Lin WS, Lo JH, Yang JH, Wang HW, Fan SZ, Yen JH, et al. *Ludwigia octovalvis* extract improves glycemic control and memory performance in diabetic mice. *J Ethnopharmacol*. 2017;207(1):211–9.
  108. Kadum Yakob H, Fariza Sulaiman S, Manaf Uyub A. Antioxidant and Antibacterial Activity of *Ludwigia octovalvis* on *Escherichia coli* O157 : H7 and Some Pathogenic Bacteria. *World Appl Sci J*. 2012;16(1):22–9.
  109. Kadum Yakob H, Manaf Uyub A, Fariza Sulaiman S. Immune-stimulating properties of 80% methanolic extract of *Ludwigia octovalvis* against Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in Balb/c mice following experimental infection. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2015;172:30–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.006>

110. Murugesan T, Ghosh L, Das J, Pal M, Saha BP. CNS activity of *Jussiaea suffruticosa* Linn. Extract in rats and mice. *Pharm Pharmacol Commun* [Internet]. 1999;5(11):663–6. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033406764&partnerID=40&md5=8fc6995bb9ece43f3e87e5c49b4d03e6>
111. Murugesan T, Mandal SC, Bhakta T, Das J, Pal M, Saha BP. Evaluation of anti-pyretic potential of *Jussiaea suffruticosa* L. extract in rats. *Phytomedicine*. 2000;7(3):231–4.
112. Murugesan T, Ghosh L, Mukherjee K, Das J, Pal M, Saha BP. Evaluation of antidiarrhoeal profile of *Jussiaea suffruticosa* Linn. extract in rats. *Phyther Res*. 2000;14(5):381–3.
113. Murugesan T, Rao B, Sinha S, Biswas S, Pal M, Saha B. Anti-diabetic Activity of *Jussiaea suffruticosa* Extract in Rats. *Pharm Pharmacol Commun*. 2000;6:451–3.
114. Murugesan T, Ghosh L, Mukherjee PK, Pal M, Saha B. Evaluation of Antitussive Potential of *Jussiaea suffruticosa* Linn. Extract in Albino Mice. *Phytomedicine*. 2000;14(7):541–2.
115. Wagner H, Bladt S. Flavonoid Drugs. En: *Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2a ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1996. p. 195–244.
116. Pirrung MC. Following the reaction. En: *The Synthetic Organic Chemist's Companion*. 1a ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2007. p. 93–106.
117. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectroscopic identification of organic compounds. 7a ed. New York, NY, USA: Jhon Wiley & Sons; 2005. 127-340 p.
118. Choi S-J, Hwang JM, Kim S Il. A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of lipase activity. *J Biochem Mol Biol*. 2003;36(4):417–20.
119. Ramirez G, Zamilpa A, Zavala M, Perez J, Morales D, Tortoriello J. Chrysoeriol and other polyphenols from *Tecoma stans* with lipase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2016;185:1–8. Disponible en:



<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.014>

120. Segel IH. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems [Internet]. Vol. 2, John Wiley Sons New York. 1993. p. 957. Disponible en: <http://www.amazon.com/Enzyme-Kinetics-Behavior-Equilibrium-Steady-State/dp/0471303097>
121. Bisswanger H. Enzyme kinetics. En: Enzyme kinetics: Principles and methods. 2a ed. Portland, OR, USA: Ringgold Inc; 2008. p. 59–124.
122. Devlin TM. Inhibición de los enzimas. En: Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4a ed. Reverté S.A.; 2008. p. 431–2.
123. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. Reagents and procedures for the Ultraviolet Spectral Analysis of Flavonoids. 1a ed. The Systematic Identification of Flavonoids. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 1970. 35-40 p.
124. Qing W, Li W, Xiaolin Y, Yuanming S, Yueming J. Polyphenols from Longan Leaf and Their Radical-Scavenging Activity. *Int Proc Chem Biol Environ Eng.* 2013;50:180–5.
125. Peng J, Fan G, Hong Z, Chai Y, Wu Y. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 2005;1074(1–2):111–5.
126. Kalra S, Jacob JJ, Gupta Y. Newer antidiabetic drugs and calorie restriction mimicry. *Indian J Endocrinol Metab.* 2016;20(1):142–6.
127. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* [Internet]. 2012;489(7415):318–21. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11432>
128. Ochir S, Nishizawa M, Jae Park B, Ishii K, Kanazawa T, Funaki M, et al. Inhibitory

- effects of *Rosa gallica* on the digestive enzymes. *J Nat Med*. 2010;64(3):275–80.
129. Kamiyama O, Sanae F, Ikeda K, Higashi Y, Minami Y, Asano N, et al. In vitro inhibition of  $\alpha$ -glucosidases and glycogen phosphorylase by catechin gallates in green tea. *Food Chem* [Internet]. 2010;122(4):1061–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.075>
  130. Ishikawa A, Yamashita H, Hiemori M, Inagaki E, Kimoto M, Okamoto M, et al. Characterization of Inhibitors of Postprandial Hyperglycemia from the Leaves of *Nerium indicum*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* [Internet]. 2007;53(2):166–73. Disponible en: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jnsv/53.166?from=CrossRef>
  131. Kam A, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Nammi S, Shi J, Chan K, et al. A comparative study on the inhibitory effects of different parts and chemical constituents of pomegranate on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Phyther Res*. 2013;27(11):1614–20.
  132. Kakarla L, Katragadda S, Tiwari A, Kotamraju Ks, Madhusudana K, Kumar Da, et al. Free radical scavenging,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and anti-inflammatory constituents from Indian sedges, *Cyperus scariosus* R.Br and *Cyperus rotundus* L. *Pharmacogn Mag* [Internet]. 2016;12(47):S488–96. Disponible en: <http://www.phcog.com/text.asp?2016/12/47/488/191467>
  133. Wansi JD, Lallemand MC, Chiozem DD, Toze FAA, Mbaze LM, Naharkhan S, et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae). *Phytochemistry*. 2007;68(15):2096–100.
  134. Li J, Lu Y, Su X, Li F, She Z, He X, et al. A norsesquiterpene lactone and a benzoic acid derivative from the leaves of *Cyclocarya paliurus* and their glucosidase and glycogen phosphorylase inhibiting activities. *Planta Med*. 2008;74(3):287–9.
  135. Oki T, Matsui T, Osajima Y. Inhibitory Effect of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors Varies According to Its Origin. *J Agric Food Chem*. 1999;47(2):550–3.
  136. Kobayashi K, Ihara S, Kobata A, Itoh K, Kusunoki N, Yoshizaki F. Inhibitory effect

- of Myrica bark on lipase activity in mouse plasma and gastrointestinal. *J Med Food*. 2008;11(2):289–93.
137. Makihara H, Shimada T, MacHida E, Oota M, Nagamine R, Tsubata M, et al. Preventive effect of Terminalia bellirica on obesity and metabolic disorders in spontaneously obese type 2 diabetic model mice. *J Nat Med*. 2012;66(3):459–67.
  138. Rahim ATMA, Takahashi Y, Yamaki K. Mode of pancreatic lipase inhibition activity in vitro by some flavonoids and non-flavonoid polyphenols. *Food Res Int* [Internet]. 2015;75:289–94. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.017>
  139. Martinez-Gonzalez AI, Díaz-Sánchez ÁG, De La Rosa LA, Vargas-Requena CL, Bustos-Jaimes I, Alvarez-Parrilla E. Polyphenolic compounds and digestive enzymes: In vitro non-covalent interactions. *Molecules*. 2017;22(4).
  140. Singh G, Suresh S, Bayineni VK, Kadeppagari RK. Lipase inhibitors from plants and their medical applications. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2015;7(1):1–5.
  141. Zeng P, Zhang Y, Pan C, Jia Q, Guo F, Li Y, et al. Advances in studying of the pharmacological activities and structure–activity relationships of natural C-glycosylflavonoids. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2013;3(3):154–62. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211383513000361>
  142. Lee EM, Lee SS, Chung BY, Cho JY, Lee IC, Ahn SR, et al. Pancreatic lipase inhibition by C-glycosidic flavones isolated from Eremochloa ophiuroides. *Molecules*. 2010;15(11):8251–9.
  143. Costa GM, Cárdenas PA, Gazola AC, Aragón DM, Castellanos L, Reginatto FH, et al. Isolation of C-glycosylflavonoids with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from Passiflora bogotensis Benth by gradient high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr B* [Internet]. 2015;990:104–10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03.015>

