



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA



PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“Efecto del consumo de una bebida a base de extractos herbales utilizados en México
en la inducción de sistemas antioxidantes en un modelo de obesidad”.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

L.N. Adriana Martínez Díaz

Dirigido por:

Dra. Minerva Ramos Gómez

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.
Enero, 2018
México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

"Efecto del consumo de una bebida a base de extractos herbales utilizados en México en la inducción de sistemas antioxidantes en un modelo de obesidad".

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:


L.N. Adriana Martínez Díaz

Dirigido por:


Dra. Minerva Ramos Gómez

SINODALES

Dra. Minerva Ramos Gómez
Director


Firma


Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Asesor


Firma

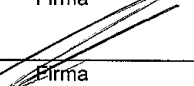
Dr. Eduardo Castaño Tostado
Asesor

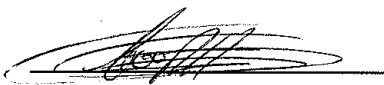

Firma


Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Asesor


Firma

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Asesor


Firma


MSP Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Enero, 2018

Tabla de contenido

I. Introducción	9
II. Antecedentes	11
2.1 Obesidad	11
2.1.1 Epidemiología	11
2.1.2 Causas de la obesidad en México	15
2.1.3 Fisiopatología de la obesidad	15
2.1.4 Homeostasis energética	16
2.1.5 Tejido adiposo	16
2.1.6 Lipotoxicidad	17
2.2 Estrés oxidativo y nitrosativo	18
2.2.1 Relación del estrés oxidativo y la obesidad	20
2.2.2 Sistemas de defensa antioxidante	21
2.2.3 Mecanismos enzimáticos y no-enzimáticos	21
2.2.4 Alteraciones de los sistemas de defensa antioxidante en las enfermedades crónico-degenerativas	23
2.3 Modelos animales de obesidad	24
2.4 Bebidas hipocalóricas y edulcorantes	25
2.4.1 Infusiones o extractos herbales	27
2.4.2 Infusiones y obesidad	27
2.5 Materiales vegetales para la preparación de infusiones	28
2.5.1 Té verde (<i>Camelia sinensis</i>)	28
2.5.2 Hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>)	29
2.5.3 Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	29
2.5.4 Hierba del sapo (<i>Eryngium carlinae</i>)	31
III. Justificación	32
IV. Hipótesis	33
V. Objetivos	33
5.1 General	33
5.2 Específicos	33
VI. Materiales y métodos	34
6.1 Reactivos	34
6.2 Material biológico	34
6.3 Material vegetal	34
6.4 Preparación de las infusiones	34
6.4.1 Diseño de mezclas	35
6.5 Cuantificación de fenoles totales	35
6.6 Determinación de flavonoides totales	36

6.7 Evaluación del efecto de la ingesta de una bebida a base de infusiones herbales sobre un modelo de obesidad inducido con una dieta alta en grasa saturada y fructosa.....	36
6.7.1 Evaluación de perfil lipídico	39
6.7.2 Cuantificación de triglicéridos en heces.....	40
6.7.3 Cuantificación de triglicéridos en tejido adiposo	40
6.7.4 Evaluación microscópica del grado de hipertrofia en adipocitos	40
6.7.5 Cuantificación de triglicéridos en hígado	41
6.7.6 Evaluación microscópica del grado de esteatosis por histopatología.....	41
6.8 Determinación de enzimas antioxidantes.....	41
6.8.1 Actividad de glutatión peroxidasa (GPx).....	41
6.8.2 Actividad de superóxido dismutasa (SOD).	43
6.8.3 Actividad de catalasa (CAT).	43
VII.Análisis estadístico	45
VIII.Resultados y discusión	46
8.1 Formulación de una bebida por medio de un diseño de mezclas.	46
8.2 Caracterización nutracéutica	50
8.2.1 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales.....	50
8.3 Evaluación del efecto de la ingesta de una bebida a base de extractos herbales sobre un modelo de obesidad inducido con una dieta alta en grasa saturada y fructosa.....	54
8.3.1 Consumo de alimento	54
8.3.2 Peso corporal	56
8.4 Evaluación del perfil lipídico	60
8.4.1 Triglicéridos en heces	63
8.4.3 Grado de hipertrofia en tejido adiposo.	66
8.4.4 Triglicéridos en hígado	68
8.4.5 Estudio histopatológico de hígado	69
8.5 Efecto de la bebida sobre la actividad de enzimas antioxidantes en hígado de los animales tratados.....	71
8.5.1 Determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx). 71	
8.5.2 Determinación de la actividad de la enzima catalasa (CAT).....	71
8.5.3 Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa(SOD).	72
IX. Conclusiones	77
X. Referencias.....	79

Índice de figuras

Figura	Página
Figura 1. Representación de las principales rutas productoras de EROs y la intervención de los sistemas antioxidantes endógenos.....	20
Figura 2. Curva de crecimiento de las ratas de la cepa wisar de los laboratorios Harlan.....	37
Figura 3. Resultados de la evaluación sensorial de 20 formulaciones resultado del diseño de mezclas	48
Figura 4. Análisis sensorial de las últimas 4 formulaciones más aceptadas por su agrado general.....	49
Figura 5. Contenido de fenoles y flavonoides totales de las distintas formulaciones..	53
Figura 6. Contenido de fenoles y flavonoides de las formulaciones finales.....	54
Figura 7. Consumo de alimento por rata por día durante 12 semanas.....	56
Figura 8. Peso corporal en gramos por rata por día durante 12 semanas.....	57
Figura 9. Efecto de la bebida sobre la concentración de triglicéridos en heces de los animales tratados.....	63
Figura 10. Efecto de la bebida sobre la concentración de triglicéridos en tejido adiposo de los animales tratados.....	65
Figura 11. Microfotografías de adipocitos teñidos con H&E.....	67
Figura 12. Efecto de la bebida sobre la concentración de triglicéridos en hígado de los animales tratados.....	69
Figura 14. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPX) en hígado.....	71
Figura 15. Actividad de la enzima catalasa en hígado.....	72
Figura 16. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en hígado.....	73

Índice de cuadros

Cuadro	Página
Cuadro 1. Factores y niveles utilizados en el diseño de mezclas	35
Cuadro 2. Contenido nutrimental de las dietas del estudio <i>in vivo</i>	38
Cuadro 3. Tratamientos del estudio <i>in vivo</i>	39
Cuadro 4. Factores y niveles para el análisis de mezclas:.....	46
Cuadro 5. Formulaciones resultantes del diseño de mezclas.....	47
Cuadro 6. Proporciones de extractos de la bebida final.....	50
Cuadro 7. Contenido total de fenoles y flavonoides en los extractos herbales (al 1%) utilizados en la formulación.....	51
Cuadro 8. Consumo de alimento, peso corporal y tejido adiposo de animales tratados.....	58
Cuadro 9. Efecto de las bebidas sobre el perfil lipídico y glucosa en sangre en animales tratados.....	62

Resumen

La obesidad es una enfermedad multifactorial caracterizada por una acumulación de la grasa corporal, causando desequilibrio bioquímico en el metabolismo de un organismo y un estado oxidativo del cuerpo, lo cual favorece el desarrollo de complicaciones. En varios estudios se ha observado que las infusiones de plantas como *Mentha piperita*, *Eryngium carlinae*, *Hibiscus sabdariffa* y *Camellia sinensis* tienen un efecto antiobesogénico y antioxidante. En este trabajo se formuló una bebida funcional antioxidante a base de cálices de jamaica con infusiones herbales y bajo contenido en calorías. El contenido de fenoles y flavonoides (mg/g equivalentes de ácido gálico y mg/g equivalentes de catequina, respectivamente) en las infusiones al 1% (p/v) fue: té verde (158.9 ± 0.76 y 58.7 ± 0.33), jamaica (40.6 ± 0.22 y 40.9 ± 0.72), “hierba del sapo” (35.8 ± 0.19 y 44.0 ± 0.36) y hierbabuena (36.7 ± 0.31 y 52.2 ± 0.57). Posteriormente, en base a la aceptabilidad sensorial, así como las propiedades fisicoquímicas y compuestos polifenólicos, se eligió una formulación final cuyo contenido de fenoles y flavonoides fue de 62.5 ± 0.32 mg/g de equivalentes de ácido gálico y 47.2 ± 0.49 mg/g de equivalentes de catequina y se analizó su efecto en un modelo de obesidad inducida en ratas macho Wistar divididos en cuatro grupos: con una dieta estándar (Grupo control sano), dieta alta en grasas saturadas y fructosa (Grupo control obeso), dieta estándar + bebida (Grupo sano más bebida) y dieta alta en grasa y fructosa + bebida (Grupo obeso más bebida). De acuerdo a los resultados, no hubo disminución en la ganancia del peso corporal; sin embargo, el peso del tejido adiposo del grupo obeso más bebida fue 20.8% menor comparado con el grupo control obeso. Los niveles séricos de triglicéridos y glucosa fueron menores en los grupos control sano (22.9 y 33.9%) comparado con el grupo sano más bebida y en el grupo obeso más bebida (44.1 y 21.3%) comparado con el grupo control obeso. La actividad hepática de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) aumentaron significativamente en el grupo control obeso para ambos casos; sin embargo, no hubo diferencia significativa en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) entre los grupos. Por lo anterior, el desarrollo de una bebida antioxidante e hipocalórica podría considerarse como una alternativa para el mercado de bebidas funcionales.

Palabras clave: obesidad, infusiones herbales, compuestos fenólicos.

Abstract

Obesity is a multifactorial disease characterized by the increase of body fat, causing a biochemical imbalance in the metabolism of an organism and an oxidative state within the body, which contribute to obesity-related complications. In Mexico, an important factor in the development of obesity is the high consumption of processed foods and beverages, among others. Thus, prevention, weight control and the generation of low-calorie products with beneficial health effects are essential to reduce its prevalence among the Mexican population. Several studies have shown that herbal infusions of peppermint (*Mentha piperita*), "frog herb" (*Eryngium carlinae*), roselle (*Hibiscus sabdariffa*) and green tea (*Camellia sinensis*) exert antiobesogenic and antioxidant effects. Therefore, in this work a functional antioxidant roselle-based drink added with herbal teas and low calorie content was formulated. The content of phenolic compounds and flavonoids (mg/g equivalents of gallic acid and mg/g equivalents of catechin, respectively) in the infusions at 1% (w/v) was: green tea (158.9 ± 0.7 and 58.7 ± 0.3), roselle (40.6 ± 0.2 and 40.9 ± 0.7), "frog herb" (35.8 ± 0.2 and 44.0 ± 0.4) and peppermint (36.7 ± 0.3 and 52.2 ± 0.6). Based on sensory acceptability as well as physicochemical properties and polyphenolic compounds, a final formulation was chosen; its content of phenolic and flavonoids was 62.5 ± 0.3 mg/g of equivalents of catechin and 47.2 ± 0.49 mg/g of equivalents of gallic acid, and its effect was analyzed in an obesity model. Male Wistar rats were divided into four groups: rats with a standard diet (healthy control group), with standard diet + beverage (Healthy group + beverage), with high fat and fructose diet (Obese control group), and with high fat and fructose diet + beverage (Obese group + beverage). According to the results, there was no decrease in body weight gain; however, the adipose tissue weight of the obese + beverage group was 20.8% lower compared to the obese control group. Triglyceride and glucose levels were lower in the healthy control group (22.9 and 33.9%), healthy + beverage group (29.3 and 38.2%) and obese + beverage group (44.1 and 21.3%), respectively, compared with the obese control group. Hepatic activity antioxidant enzymes, catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX), were significantly increased in the obese + beverage group for both cases; as well as in the healthy + beverage group. Although further evaluation is needed, the development of an antioxidant and hypocaloric beverage could be considered as an alternative for the functional beverage market.

Keywords: hypercaloric diet, herbal infusions, antioxidant enzymes.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres, amigos, compañeros y profesores por todo el apoyo otorgado durante mi estancia en la maestría.

Por ultimo agradezco a CONACYT por el apoyo otorgado.

I. Introducción

La obesidad es una enfermedad multifactorial que tiene influencia de aspectos genéticos, fisiológicos, metabólicos, sociales y moleculares de cada individuo. Uno de los aspectos sociales importantes es la modificación que ha sufrido la dieta en estos últimos años, incrementando el consumo de alimentos procesados y con un alto contenido calórico, principalmente compuestos de grasas y azúcares refinados.

La obesidad se caracteriza por un aumento de grasa corporal, lo cual causa un desequilibrio bioquímico en el metabolismo de un organismo principalmente en órganos como el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. La insulina, por su acción activadora de la enzima lipoproteína lipasa, favorece el almacenamiento de triglicéridos en adipocitos, lo cual provoca un aumento en el tamaño y número de adipocitos y, por lo tanto, un incremento en la secreción de proteínas conocidas como adipocinas y citocinas, que son proinflamatorias, y están relacionadas con el desarrollo de complicaciones de la obesidad como son la diabetes y las alteraciones cardiovasculares, entre otras.

Por esta razón, la obesidad ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema grave de salud pública, donde su prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad para adultos de 20 años pasó de 71.2% en 2012 a 72.5% en 2016.

En países como México, la alta prevalencia de obesidad y sus complicaciones están directamente relacionadas con el consumo elevado de calorías provenientes de los alimentos y bebidas, principalmente las refrescantes. Debido a esto, la prevención y el control de peso es primordial para disminuir los problemas de salud que actualmente enfrenta la población mexicana.

Una estrategia para alcanzar este objetivo es la generación de productos bajos en calorías y con efectos benéficos adicionales a la salud que pueden disminuir los problemas derivados del sobrepeso y obesidad.

En el grupo de trabajo se han evaluado plantas como la hierba del sapo y los cálices de jamaica en modelos animales de obesidad inducida por dieta alta en grasa y fructosa, así como con diabetes. Los resultados reportados fueron favorables teniendo efectos sobre la disminución de lípidos y glucosa en sangre, y peso corporal, entre otros parámetros; sin embargo, se tiene poca información respecto al efecto de estos materiales sobre sistemas antioxidantes endógenos en un modelo de obesidad.

En la obesidad existe un incremento del estado oxidativo debido a la acumulación de grasa, lo que incrementa selectivamente la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el tejido adiposo. Por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis redox en diversos órganos es crítico para la función celular y la supervivencia, y su alteración está implicada en la fisiopatología de muchas enfermedades humanas, tales como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, la artritis reumatoide, los trastornos neurológicos (por ejemplo, las enfermedades de Alzheimer y Parkinson), obesidad o el cáncer.

Por lo anterior, en el presente trabajo se planteó evaluar el efecto de la ingesta de una bebida baja en calorías, elaborada con infusiones herbales de plantas de la medicina tradicional mexicana como la hierbabuena (*Mentha piperita*), hierba del sapo (*Eryngium carlinae*), jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y té verde (*Camellia sinensis*) sobre la inducción de sistemas antioxidantes en un modelo de obesidad.

II. Antecedentes

2.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial desarrollada por las interacciones de factores sociales, de comportamiento, culturales, metabólicos y genéticos, y puede definirse como el incremento en el peso corporal que resulta en una acumulación excesiva de tejido adiposo (Sweeting, 2008).

2.1.1 Epidemiología

La situación de salud en México ha cambiado profundamente en las últimas décadas, a tal grado que las preocupaciones alrededor de la desnutrición se encuentran limitadas a grupos de la población específicos; en cambio, la obesidad se ha generalizado a los diversos grupos sociales, regiones y grupos de edad.

La obesidad y el sobrepeso se han convertido desde la última década a la fecha en un problema de salud pública en México, actualmente más del 70% de la población adulta está por encima de su peso normal, donde cerca del 32% presenta obesidad.

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2016 (ENSANUT 2016), la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en la población de 5 a 11 años de edad disminuyó de 34.4% en 2012 a 33.2% en 2016, una reducción no estadísticamente significativa de 1.2 puntos porcentuales. Las prevalencias de sobrepeso (20.6%) y obesidad (12.2%) en niñas en 2016 fueron muy similares a las observadas en 2012 (sobrepeso 20.2% y obesidad 11.8%). En niños hubo una reducción estadísticamente significativa de sobrepeso entre 2012 (19.5%) y 2016 (15.4%), mientras que las prevalencias de obesidad en 2012 (17.4%) y 2016 (18.6%) no fueron estadísticamente diferentes.

En adolescentes de entre 12 y 19 años la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad fue de 36.3%, 1.4 puntos porcentuales superior a la prevalencia en 2012 (34.9%); sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa. La

prevalencia de sobrepeso (26.4%) en adolescentes de sexo femenino en 2016 fue 2.7 puntos porcentuales superior a la observada en 2012 (23.7%) y esta diferencia es estadísticamente significativa. En cambio, la prevalencia de obesidad (12.8%) es similar a la observada en 2012 (12.1%). En los adolescentes de sexo masculino no hubo diferencia significativa entre 2012 y 2016.

Para adultos de 20 años y más la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad pasó de 71.2% en 2012 a 72.5% en 2016; este aumento de 1.3 puntos porcentuales no fue estadísticamente significativo. La prevalencia de sobrepeso, obesidad y obesidad mórbida fueron más altas en el sexo femenino.

La epidemia de obesidad es causada por múltiples y complejos factores. Existe evidencia que indica que el incremento en el consumo de bebidas azucaradas es un factor de riesgo para obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades del corazón (Malik *et al.*, 2006; Vartanian *et al.*, 2007). El consumo de bebidas azucaradas no produce saciedad en comparación con el azúcar en forma sólida, lo cual tiende a estimular el sobre consumo de bebidas azucaradas (Willett y Ludwig, 2013).

El consumo de bebidas azucaradas como bebidas sin alcohol, jugos, agua vitaminada, bebidas energéticas y a base de frutas, se incrementó significativamente a nivel mundial (Popkin, 2012). En México, el consumo promedio individual de bebidas azucaradas incrementó un 60% entre 1989 y el 2006 (Barquera *et al.*, 2008). En el 2011, México tuvo el mayor consumo per cápita de refrescos en todo el mundo estimado en 163 litros por habitante al año (Euromonitor, 2011). El mayor consumo de bebidas sin alcohol se concentra en población entre los 12 y 39 años de edad y es particularmente alta en la población de 19 a 29 años (Barquera *et al.*, 2008). La ENSANUT del 2012 muestra que la bebida calórica representa alrededor del 18% de la energía total entre los niños y adultos (Stern y Piernas, 2014). Además, se estima que el 71% del consumo agregado de azúcar en México proviene de las bebidas azucaradas y, al menos, el 66% de la población consume más del 10% de azúcares añadidos por encima de la recomendación de la OMS (Sánchez-Pimienta y Batis, 2015). Aunque hay

evidencia en las encuestas nacionales de gastos y renta, de una ligera disminución en el porcentaje de los hogares que reportan ningún consumo de bebidas azucaradas entre el 2008 y 2010, el consumo en el país sigue siendo muy alto (Euromonitor, 2011).

Respecto a la diversidad de la dieta de los escolares (ENSANUT 2016), se observaron bajas proporciones de consumidores regulares de grupos de los alimentos asociados con mejores niveles de salud (grupos recomendables): sólo un 22.6% consumen regularmente verduras, 45.7% frutas y el 60.7% leguminosas. En cambio se observó un elevado consumo de alimentos cuyo consumo cotidiano aumenta los riesgos de obesidad y enfermedades crónicas (grupos de alimentos no recomendables para consumo cotidiano): 81.5% consumen regularmente bebidas azucaradas no lácteas, 61.9% botanas, dulces y postres y 53.4% cereales dulces.

En adolescentes, también se observaron bajas proporciones de consumidores regulares de los alimentos recomendables: sólo 26.9% consumen regularmente verduras, 39.2% frutas y 63.1% leguminosas. En cambio, se observó una elevada proporción de consumidores de grupos de alimentos no recomendables para consumo cotidiano: 83.9% consumen regularmente bebidas azucaradas no lácteas, 59.4% botanas, dulces y postres y 50.3% cereales dulces.

En adultos se observaron bajas proporciones de consumidores regulares de la mayor parte de los grupos de alimentos recomendables: 42.3% consumen regularmente verduras, 51.4% frutas y 70% leguminosas. En cambio se observó una elevada proporción de consumidores de algunos grupos de alimentos no recomendables para consumo cotidiano: 85.3% consumen regularmente bebidas azucaradas no lácteas, 38% botanas, dulces y postres y 45.6% cereales dulces.

De acuerdo a un cuestionario de consumo reportado en la ENSANUT 2016, un alto porcentaje de la población indicó que se sentía muy capaz o capaz de comer cinco frutas y verduras al día (79.7%), consumir uno o menos vasos de bebidas azucaradas industrializadas y caseras a la semana (70.2%) y realizar por lo menos

30 minutos de actividad física al día (85.5%). En este sentido, los principales obstáculos que reportaron para poder alimentarse saludablemente fueron la falta de dinero para comprar frutas y verduras (50.4%), falta de conocimiento (38.4%) y tiempo (34.4%) para preparar alimentos saludables, falta de una alimentación saludable en la familia (31.4%), preferencia por consumir bebidas azucaradas y comida chatarra (31.6%), falta de motivación (28.3%) y desagrado por el sabor de las verduras (23%). Además, el 81.6% de la población mencionó que gusta del sabor de las bebidas azucaradas; sin embargo, la mayoría (92.3%) no las consideran saludables.

Por otro lado, la mayoría considera que el consumir bebidas azucaradas favorece al desarrollo de obesidad (92.2%), caries dental (93.4%), presión alta (86.2%) y diabetes (93%). La mayoría de la población vincula la obesidad con diabetes mellitus (DM, 95.6%), cáncer (80.8%), dificultades para respirar y asma (91.3%), presión alta y enfermedades del corazón e infartos (95.5%), baja autoestima y depresión (93.6%) (ENSANUT, 2016).

Respecto a la autopercepción del peso no saludable, prácticamente la mitad de la población (48.4%) se identificó con sobrepeso y una minoría con obesidad (6.7%). A pesar de que el 40% de los encuestados afirmó que la obesidad es de carácter hereditario, casi su totalidad la asocia al consumo de bebidas azucaradas (88.3%), no comer verduras y frutas (84.3%), ver televisión o usar computadora (89.3%), y a no realizar actividad física (94.8%) (ENSANUT, 2016).

La prevalencia de sobrepeso, obesidad y obesidad mórbida fueron más altas en el sexo femenino en la mayoría de etapas de vida. En 2016, se observó una prevalencia mayor de obesidad en los niños (18.3%), en comparación con las niñas (12.2%). Este mismo comportamiento se presentó en 2012. La prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en 2016 en adolescentes hombres fue de 33.5% y en mujeres de 39.2%. Al categorizar por sexo en la ENSANUT MC 2016, se observa que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) es mayor en las mujeres (75.6%) que en los hombres (69.4%); y que la prevalencia de obesidad ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) es también más alta en el sexo

femenino (38.6%) que en el masculino (27.7%). Asimismo, la categoría de obesidad mórbida ($IMC \geq 40.0 \text{ kg/m}^2$) es 2.4 veces más alta en mujeres que en hombres.

2.1.2 Causas de la obesidad en México

La alimentación en México se caracteriza por un consumo elevado de alimentos ricos en colesterol, grasa saturada, azúcares y sodio. El consumo de bebidas con alto contenido en azúcares aporta alrededor del 21% de las calorías provenientes de carbohidratos consumidas por los jóvenes. Estas calorías contribuyen al consumo excesivo de energía que está relacionado con la aparición de sobrepeso, obesidad y DM (Rivera *et al.*, 2008).

El agua potable puede utilizarse para satisfacer casi todas las necesidades de líquidos de los individuos sanos. Sin embargo, una dieta saludable puede incluir diversos tipos de bebidas, además del agua. El equilibrio entre energía y contenido de nutrientes es un factor crítico para definir el papel de las bebidas en una dieta saludable (Rivera *et al.*, 2008).

1.1.3 Fisiopatología de la obesidad

Cuando se presenta un exceso de grasas y carbohidratos, el organismo transporta estos nutrientes hacia el hígado, en donde son metabolizados a triglicéridos y empaquetados en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para su transporte a los tejidos extrahepáticos. La lipoproteína lipasa (LPL) hidroliza a la lipoproteína liberando ácidos grasos libres (AGL), los cuales se transportan y almacenan en los adipocitos, reesterificándose y formando nuevamente triglicéridos (Luzuriaga, 2000).

La enzima LPL es activada por la hormona insulina, la cual durante un consumo excesivo de energía se mantiene elevada (hiperinsulinemia), favoreciendo el almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo y, por lo tanto, la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos (Eckel, 2006).

2.1.4 Homeostasis energética

Homeostasis se define como el estado de equilibrio dinámico o el conjunto de mecanismos por los que todos los seres vivos tienden a alcanzar una estabilidad en las propiedades de su medio interno y, por tanto, de la composición bioquímica de los líquidos y tejidos celulares para mantener la vida, siendo esto la base de la fisiología (McEwen y Wingfield, 2007).

El equilibrio entre la energía ingerida a través de los alimentos y la energía gastada por el metabolismo celular da como resultado el buen funcionamiento del organismo. Los carbohidratos, los lípidos y las proteínas son los tres macronutrientes que usualmente proveen de energía calórica a las células. Así, desde el punto de vista energético, la principal fuente de energía es la glucosa y su forma polimérica de almacenaje, el glucógeno. Es claro que el balance energético se preserva a partir de la ingesta de alimentos, la cual se controla a dos niveles: uno opera a corto plazo, determinando las reservas de carbohidratos del organismo e impulsando a la búsqueda de calorías cuando las reservas de glucógeno o los niveles de glucosa descienden; el otro opera a largo plazo y está más relacionado con la utilización de los depósitos grasos del tejido adiposo, promoviendo la ingesta de alimentos a mediano y largo plazo (Fragoso-Iñiguez y Coello-Coutiño, 2008).

2.1.5 Tejido adiposo

Los adipocitos son los encargados de almacenar la energía en forma de triglicéridos en gotas lipídicas. Cuando se necesita energía, los triglicéridos son rápidamente hidrolizados y los ácidos grasos resultantes son excretados del adipocito y transportados hasta otros tejidos donde son utilizados (Guilherme *et al.*, 2008).

El tejido adiposo controla el metabolismo lipídico a través de señales endócrinas, parácrinas y autócrinas, que le permiten regular el metabolismo tanto en adipocitos como en otros tipos celulares como el sistema nervioso central, hígado, músculo y páncreas (Kim y Moustaid-Moussa, 2000).

2.1.6 Lipotoxicidad

La obesidad se caracteriza por contener un aumento de triglicéridos en el tejido adiposo. Sin embargo, la excesiva liberación de ácidos grasos provenientes de este órgano causa la alteración de otros órganos denominada lipotoxicidad. Existen suficientes antecedentes que respaldan este mecanismo como el principal mediador de resistencia a la insulina (Briaud *et al.*, 2001; Robertson *et al.*, 2004).

El ingreso continuo de ácidos grasos libres (AGL) provenientes del tejido adiposo hipertrófico, de la síntesis endógena en los tejidos (principalmente hígado) y el consumo elevado de azúcar y grasas saturadas por medio de la dieta, estimula su acumulación y la producción de intermediarios metabólicamente activos que alteran las funciones normales de diversos órganos (Feldstein *et al.*, 2004; Summers, 2006).

Cuando se tiene un exceso de lípidos en hígado, la secreción de triglicéridos se incrementa, pero también tienden a almacenarse, generándose esteatosis. La esteatosis hepática es una característica de la obesidad, generando un ambiente inflamatorio sistémico que promueve el desarrollo de lipotoxicidad y apoptosis de las células del parénquima y la subsiguiente producción de colágeno por las células estelares (Angulo, 2005; Feldstein *et al.*, 2005). De este modo, el proceso de lipotoxicidad estimula la progresión de la esteatosis a esteohepatitis y posteriormente a cirrosis y fibrosis hepática.

Los adipocitos hipertróficos desarrollan resistencia a la insulina ocasionando aumento en la liberación de AGL, leptina y el factor de necrosis tumoral (TNF-) α , los cuales incrementan el daño hepático mediado por lípidos, generando lipotoxicidad. De esta manera, la interacción entre el hígado y el tejido adiposo se ha denominado eje adipo-hepático, donde la alteración funcional de alguno de estos órganos en la obesidad, afecta la función del otro, generando un círculo que altera dicho eje (Angulo, 2005; Feldstein *et al.*, 2005).

2.2 Estrés oxidativo y nitrosativo

El oxígeno molecular (O_2) es esencial para la supervivencia de los seres humanos y, en general, de todos los organismos aeróbicos. Por lo anterior, en el proceso natural de oxidación, el cuerpo humano produce especies reactivas de oxígeno (EROs), especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y radicales libres (RL) (Ortega *et al.*, 2010).

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) incluyen: el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el oxígeno (O_2) y el ácido hipocloroso (HOCL). Si el balance entre la formación y eliminación de las EROs se altera a favor de la formación, estas especies oxidantes inducen reacciones en cadena que son capaces de dañar moléculas de importancia biológica (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), a este fenómeno se le denomina estrés oxidativo. En particular, el ataque a los lípidos provoca su oxidación y esto a su vez conduce a la formación de nuevas especies de RL y metabolitos (Novo y Parola, 2008). Las EROs pueden generarse por fuentes como los contaminantes, el tabaquismo, factores ambientales o como un producto secundario de las reacciones del metabolismo (Salvadó *et al.*, 2005). Del mismo modo, los RL derivados de las ERNs incluyen óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (Ortega *et al.*, 2010).

En los sistemas vivos la naturaleza ha brindado diferentes fuentes de protección que permiten mediar este daño. Estos sistemas, de acuerdo a su origen, pueden clasificarse como endógenos y exógenos. Los sistemas de defensa antioxidante endógeno consisten en una serie de elementos biológicos que brindan protección ante la producción continua de EROs, ERNs y RL. Estos últimos, aunque tienen una vida biológica media de microsegundos, poseen la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a las moléculas y a las membranas celulares. Los RL son generados por funciones celulares como la respiración y síntesis de ATP a nivel mitocondrial.

Se denomina estrés oxidativo al estado en el que las células se encuentran expuestas a un ambiente pro-oxidante y los mecanismos defensivos se encuentran sobrepasados. En este estado, un porcentaje muy pequeño de las moléculas de oxígeno utilizadas por el organismo, alrededor del 5%, se convierten en intermediarios reactivos de éste. Estas moléculas interactúan con biomoléculas de todos los tipos, de naturaleza ya sea lipídica o proteica, e inclusive nucleica, especialmente a tres niveles (membrana plasmática, mitocondria y DNA) produciendo lesiones celulares (Esteller *et al.*, 2005). Por tanto, el estrés oxidativo está asociado al declive general de las funciones celulares, tisulares y orgánicas, y está relacionado con enfermedades como el Alzheimer, aterosclerosis lateral amiotrófica, Parkinson, degeneración muscular, artritis reumatoide, cáncer y síndrome metabólico (SM), entre otras. Además, una inadecuada protección contra las EROs es el factor principal que da origen al envejecimiento e incrementa la vulnerabilidad a enfermedades crónico-degenerativas (Beristain *et al.*, 2006).

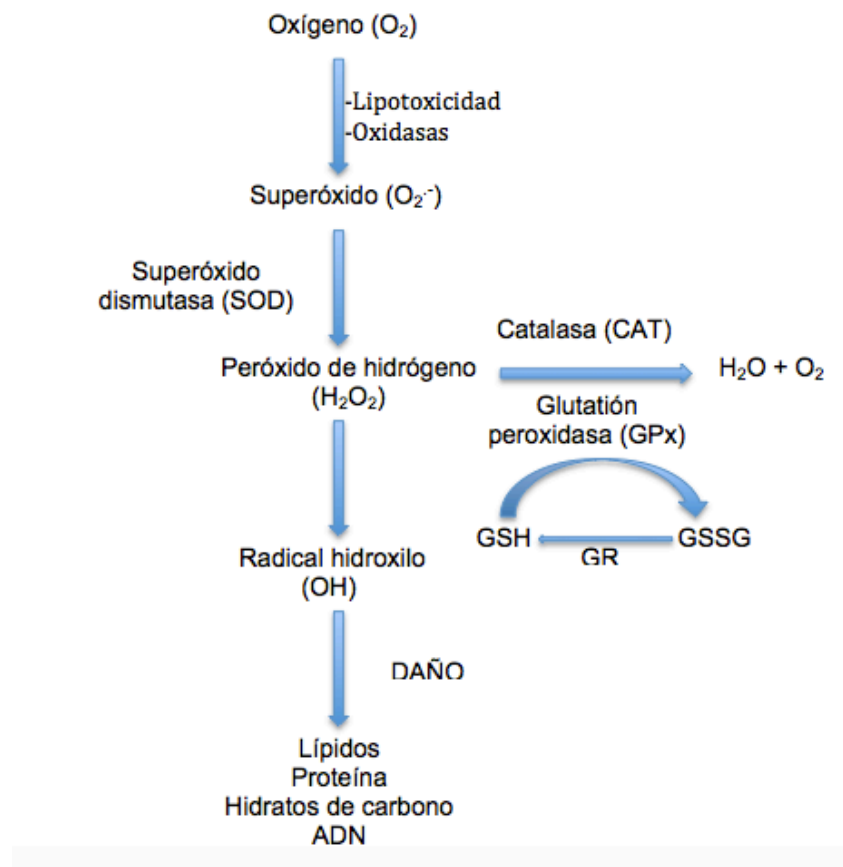


Figura 1. Representación de las principales rutas productoras de EROs y la intervención de los sistemas antioxidantes endógenos.

CAT (catalasa); GPx (glutación peroxidasa); SOD (superóxido dismutasa); GSH (glutación reducido); GSSG (glutación oxidado) (Esteller *et al.*, 2005).

De la misma forma, bajos niveles de ERNs se producen continuamente en las células de mamíferos y desempeñan funciones fisiológicas importantes. Estas incluyen procesos tan diversos como la expresión de genes, la proliferación y sobrevivencia celular, la remoción de patógenos por el sistema inmune, y la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Sin embargo, cuando la cantidad de ERNs excede la capacidad antioxidante de la maquinaria, el resultado es un estrés nitrosativo que puede inducir daños irreversibles en todas las macromoléculas celulares, incluyendo el ADN. Por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis redox es crítico para la función celular y la supervivencia, y su alteración está implicada en la fisiopatología de diversas enfermedades humanas, tales como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, la artritis reumatoide, los trastornos neurológicos (por ejemplo, las enfermedades de Alzheimer y Parkinson) o el cáncer (Ortega *et al.*, 2010).

2.2.1 Relación del estrés oxidativo y la obesidad.

En la obesidad existe un incremento del estado oxidativo debido a la acumulación de grasa. La producción de EROs se incrementa selectivamente en el tejido adiposo, acompañado por un aumento de la actividad de las enzimas NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa (NOS), mieloperoxidasa (MPO), entre otras, disminuyendo los sistemas de defensa antioxidante endógenos (Furukawa *et al.*, 2004).

Las EROs extraen fácilmente electrones de otras moléculas, convirtiéndolas a RL y de ese modo iniciar una reacción en cadena. Toda clase de moléculas biológicas son susceptibles al daño oxidativo causado por los RL. La oxidación de los lípidos

poliinsaturados en las células puede perturbar las estructuras de las membranas y el daño oxidativo al ADN puede dar lugar a mutaciones puntuales. Como consecuencia, la oxidación de los lípidos de la membrana celular provoca alteraciones en la permeabilidad, o la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, así como la de los organelos celulares. Los ácidos grasos poliinsaturados, que predominantemente se ubican en las membranas celulares, son particularmente susceptibles al ataque de los RL (Eberhardt, 2001).

En diferentes estudios se sugiere que la obesidad *per se* puede inducir estrés oxidativo sistémico y que este aumento es, en parte, la causa subyacente de la desregulación de las adipocitocinas, lo que lleva al desarrollo de SM (Furukawa *et al.*, 2004).

2.2.2 Sistemas de defensa antioxidante.

Desde el punto de vista químico, un antioxidante es un compuesto químico que previene la oxidación de otra especie química. Los antioxidantes desempeñan un papel fundamental en la protección de estructuras celulares que pudiesen dañarse en reacciones que involucren RL (Alvira y Roche, 2004; Tenorio *et al.*, 2006).

La mayoría de los organismos vivos, incluyendo los seres humanos, poseen un sistema de defensa eficiente que ha evolucionado en mecanismos enzimáticos y no enzimáticos frente al exceso de producción de EROs protegiendo así contra daños oxidantes. Sin embargo, diferentes factores externos o ambientales y el envejecimiento disminuyen la capacidad de tales sistemas, resultando en perturbaciones del equilibrio redox. Por consiguiente, los antioxidantes no enzimáticos son secuestradores de EROs de gran valor en la prevención del ataque y/o la progresión de enfermedades oxidativas (Salvadó *et al.*, 2005; González *et al.*, 2007)

2.2.3 Mecanismos enzimáticos y no-enzimáticos.

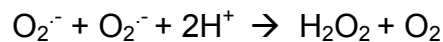
El sistema antioxidante endógeno, a su vez, se divide en *enzimático* y *no enzimático*. El primero lo constituyen las enzimas antioxidantes y el segundo lo integran el glutatión reducido (GSH), la coenzima Q y el ácido tiocico o lipoico. El

sistema de defensa antioxidante exógeno incluye todos los elementos provistos del medio ambiente (alimentos, plantas, entre otros) que han sido sometidos a estudios científicos y se les ha identificado actividad antioxidante. Entre los más estudiados se encuentran las vitaminas E y C, los β -carotenos y polifenoles (flavonoides y taninos) (Camacho *et al.*, 2009).

Los sistemas enzimáticos incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y las enzimas implicadas en el ciclo de glutatión: glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST).

La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido transformándolo en oxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

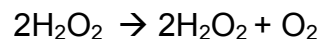
SOD



Por lo tanto, la enzima SOD y el GSH constituyen el primer paso enzimático que desempeña un papel protector celular, catalizando la conversión del radical superóxido en H_2O_2 (Al-Gubory *et al.*, 2004).

La CAT es una enzima que se localiza en los peroxisomas y descompone al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Salvadó, 2005).

CAT



GPx

Tanto la GPx como la CAT catalizan la conversión de H_2O_2 a H_2O . Sin embargo, la GPx convierte H_2O_2 a H_2O a través de la oxidación de GSH (GSSG). Además, la GPx cataliza la degradación de los lípidos peróxidos.

La GR es una enzima importante del mecanismo de defensa antioxidante celular. La regeneración de GSSG a GSH requiere la acción de la GR que utiliza el NADPH como cofactor. Por lo tanto, la GR es esencial para el ciclo de GSH, ya que mantiene los niveles adecuados de GSH. Por lo anterior, la capacidad de GPx de reducir H_2O_2 y otros hidroperóxidos depende de la actividad de la GR (Al-

Gubory *et al.*, 2004).

En cuanto al sistema de defensa no enzimático, las proteínas antioxidantes generalmente pueden tener funciones duales, es decir, como proteínas transportadoras y también como quelantes en cuestión de iones metálicos, lo que limita su acción como catalizadores para la formación de RL. Por otro lado, el GSH es el antioxidante no-enzimático más relevante; su función no es eliminar directamente las EROs, sino mantener el equilibrio redox y participar en las reacciones enzimáticas antioxidantes proporcionando los reductores equivalentes. El GSH actúa a través de tres reacciones: 1) reacciones de conjugación, 2) oxidación, y 3) degradación (Salvadó, 2005).

2.2.4 Alteraciones de los sistemas de defensa antioxidante en las enfermedades crónico-degenerativas.

Diferentes teorías vinculan al estrés oxidativo con las patologías ya mencionadas (SM, DM, obesidad e hipertensión arterial). En el caso de la DM, el sistema antioxidante no logra eliminar la carga de oxidantes que se producen en los eventos de hiperglicemia sostenidos, por lo que la producción de EROs excede las posibilidades de eliminación (McCarty *et al.*, 2008). Así, diversos estudios han observado que en la DM se tiene una disminución de las enzimas CAT y SOD y del cofactor GSH. Esta disminución en la actividad de las enzimas puede deberse al incremento de las EROs, ya que diversos reportes sobre este tema señalan que, cuando estas especies se acumulan, contribuyen a la reducción de la actividad enzimática antioxidante (Beristain *et al.*, 2006).

En pacientes con hipertensión arterial se ha observado un aumento de la relación entre la concentración de glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH-GSSG) y la disminución de enzimas antioxidantes como SOD, GPx y CAT en sangre total como en células mononucleadas periféricas (Redon, 2003).

Diversos estudios epidemiológicos indican un estado oxidante en pacientes con SM, el cual se puede determinar a través de la relación GSH:GSSG en plasma, la actividad de las enzimas SOD y CAT en plasma y GPx en eritrocitos hemolizados. Diversos estudios también han evaluado la actividad de SOD, CAT y GPx en

células mononucleares en pacientes con SM. La alteración en la actividad de estas enzimas debido al estrés oxidativo se considera como una medida del daño tisular y celular, antes o durante el padecimiento, para retardar su aparición o ayudar a un control más adecuado del SM.

En general, diversos estudios demuestran que es necesario el mantenimiento de una homeostasis oxidativa en el organismo para que se dé una sincronización correcta de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos. Como se ha mencionado, factores importantes para el desarrollo del SM, como lo son la diabetes, obesidad e hipertensión, producen una respuesta deficiente de los sistemas antioxidantes, provocando ya sea un aumento o disminución de su respuesta. Por lo tanto, es importante mantener los niveles adecuados de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos.

Existe evidencia de que una dieta alta en frutas y vegetales es fundamental en la protección contra enfermedades crónicas degenerativas, lo que sugiere un efecto quimioprotector de los compuestos o fitoquímicos presentes en los vegetales a través de la inducción de enzimas de fase 2 o antioxidantes en diferentes tejidos; lo cual proporciona una alternativa eficiente para el control del estrés oxidativo (Munday *et al.*, 2005).

2.3 Modelos animales de obesidad

Debido al importante papel que juega la dieta en el desarrollo de la obesidad y el SM en humanos, los modelos de obesidad resultan de fundamental importancia para el estudio de esta patología y sus consecuencias metabólicas.

Las ratas y ratones son los modelos más utilizados para generar obesidad inducida por la dieta debido a que pueden desarrollar obesidad y algunos otros factores asociados con el SM en relativamente poco tiempo (Kim *et al.*, 2004; Gauthier *et al.*, 2006). Las dietas más utilizadas para inducir obesidad y/o SM son dietas altas en grasa, dietas altas en grasa saturada y colesterol, y dietas altas en hidratos de carbono simples. Cada tratamiento dietario genera una respuesta diferente en el tipo y grado de las alteraciones metabólicas.

Las dietas altas en grasa contienen de un 30 a 60% de la energía total de la dieta proveniente de la grasa y se utilizan para inducir obesidad, resistencia a la insulina e hiperlipidemia (Ramírez *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2004). La mayoría de los roedores desarrollan obesidad e hiperlipidemia con una dieta alta en grasa; sin embargo, la respuesta puede variar dependiendo de la cepa y género del roedor y el tipo de grasa utilizada en la dieta. Las dietas altas en grasa saturada y colesterol se utilizan para inducir hipercolesterolemia y aterosclerosis (Ueshima *et al.*, 2004).

Las dietas altas en hidratos de carbono simples se utilizan para inducir hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina (Kleiner, 2006). Por lo tanto, para este trabajo se administró una dieta alta en grasa saturada y fructosa para inducir obesidad e hiperlipidemia y se evaluó el efecto de una bebida funcional como tratamiento. Además, la cepa utilizada fue Wistar debido a que es más resistente a tratamientos crónicos como el de obesidad, para así poder observar cambios a lo largo del tiempo. De igual manera, las ratas macho Wistar son muy vulnerables al hígado graso inducido por la fructosa, y se las considera un modelo aceptado de síndrome metabólico. Por otro lado en ratas hembras Wistar se presenta una inhibición hormonal de la oxidación de ácidos grasos debido a la presencia de estrógenos. Los estrógenos y la progesterona inhiben la β -oxidación mitocondrial en ratones Swiss CD-1 BR (Grimbert *et al.*, 1995). De hecho, una semana de tratamiento con estradiol y progesterona condujo a lesiones ultraestructurales de la mitocondria. Los autores sugirieron que estos cambios podrían ser similares a los que se producen en la gestación de algunas mujeres, y que inducen de forma aguda hígado graso (Grimbert *et al.*, 1995).

2.4 Bebidas hipocalóricas y edulcorantes

El consumo de alimentos y bebidas adicionadas con endulzantes no nutritivos, como la estevia, ha incrementado en las últimas décadas. La estevia es un edulcorante natural obtenido del extracto steviosidico de las hojas de la *Stevia rebaudiana*, el cual provee un sabor dulce y no tiene contenido energético. Su consumo como edulcorante incrementa la sensibilidad de la insulina en modelos

animales (Gregersen *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005), regula la presión arterial sistólica y diastólica (Hsieh *et al.*, 2003), así como la saciedad del apetito (Anton *et al.*, 2010). Además, no hay reportes de efectos negativos sobre el efecto farmacológico en individuos sanos, hipertensos y diabéticos (Barriocanal *et al.*, 2008). También se pueden utilizar jugos de frutas para elaboración de bebidas; sin embargo, tienen un alto contenido energético y con frecuencia son alterados.

La industria alimentaria segmenta la oferta y comercialización de productos alimentarios de consumo masivo, como en el caso de las bebidas a base de jugos o endulzadas, en función de la capacidad económica de los consumidores. Cuanto más bajo es el poder de compra del público al que se dirige, más alto es el contenido de grasas, azúcares y aditivos (Aguirre, 2000).

En el 2015, Rubio y colaboradores elaboraron tres bebidas, para lo cual realizaron un diseño de factorial, teniendo como factores: la concentración de azúcar y porcentaje de extracto de jamaica para la primera bebida, porcentaje de extracto de cocolmecha, concentrado de té verde y extracto de limón para la segunda bebida y extractos de hierbabuena, cocolmecha y hierba del sapo para la tercera bebida. Realizaron un análisis de evaluación sensorial y reportaron la formulación con mayor aceptabilidad, así como la que conservó sus propiedades fisicoquímicas y funcionales.

En la segunda bebida se utilizó el extracto de *Smitax cordifolia* (cocolmecha) como base, ya que en estudios previos se demostró que el extracto de cocolmecha al 2% disminuyó la ganancia de peso corporal hasta en un 27% en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa, respecto al grupo control (Pérez-Ramírez *et al.*, 2013). Adicionalmente, a esta segunda bebida se agregó extracto de té verde debido a sus propiedades benéficas, ya que contiene como principal compuesto fenólico al galato de epigalocatequina, compuesto que posee efectos antiobesogénicos (Mohsen *et al.*, 2010) y a su aceptación por parte de los consumidores.

Para la tercera bebida se utilizó extracto de *Mentha piperita* como componente principal, debido a que estudios han reportado que este extracto mejora el perfil lipídico en modelos animales, disminuyendo LDL y colesterol total y aumentando HDL (Badal *et al.*, 2011). Como segundo componente de la segunda bebida se utilizó también el extracto de *Eryngium carlinae* que ha sido reportado con efecto hipolipidémico en un modelo animal de diabetes (Noriega *et al.*, 2012).

2.4.1 Infusiones o extractos herbales

Una infusión es una bebida obtenida de las hojas secas, flores y/o frutos, que son introducidos en agua a punto de hervir. En base a su solubilidad, los principales compuestos con actividad biológica presentes en estas bebidas son los polifenoles, los cuales son un conjunto heterogéneo de moléculas que se caracterizan por poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos con grupos hidroxilos (Apak *et al.*, 2007).

El consumo de bebidas hipocalóricas funcionales puede ser una alternativa para coadyuvar en el tratamiento de la obesidad y sus alteraciones metabólicas consecuentes. Se ha reportado que diversas hierbas utilizadas para la preparación de infusiones o extractos presentan propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, por lo que son utilizadas para el tratamiento de diversos desórdenes relacionados con el estrés oxidativo y la inflamación, como la obesidad. Además, son una fuente más de aporte de líquidos en la dieta y cumplen la función de hidratar, en el caso de personas sanas.

2.4.2 Infusiones y obesidad

Estudios previos han demostrado que los polifenoles presentes en infusiones como en el té verde ayudan a evitar o disminuir alteraciones en el metabolismo de lípidos, causados por enfermedades como la obesidad (Meydani y Hasan, 2010). Entre algunos de los mecanismos reportados para polifenoles de té verde y su efecto antiobesogénico se incluyen la supresión de la diferenciación y proliferación de los adipocitos, la inhibición de la absorción de grasa desde el intestino, así

como la disminución de absorción de lípidos (Wolfram, 2005; Hursel y Westerterp-Plantenga, 2010).

En un estudio con animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa, los grupos tratados con infusiones de diferentes plantas presentaron una menor ganancia de peso corporal respecto al control obeso; siendo los animales tratados con extractos de jamaica, hierbabuena y colcomeca los que presentaron menor ganancia de peso (Pérez-Ramírez *et al.*, 2013).

2.5 Materiales vegetales para la preparación de infusiones

2.5.1 Té verde (*Camellia sinensis*)

El té es una de las bebidas más ampliamente consumidas en el mundo y es un derivado de la especie *Camellia sinensis* L. Esta bebida se puede categorizar en tres tipos principales, dependiendo de su nivel de oxidación como té verde, té oolong y té negro (Velayutham y Babu, 2008; Chan y Soh, 2011). Existen dos principales variedades de *C. sinensis*: *Camellia sinensis sinensis* y *Camellia sinensis assamica* (Chan y Soh, 2011).

El proceso de manufactura del té está diseñado para evitar o permitir la oxidación de los compuestos fenólicos del té de forma natural por medio de la polifenol oxidasa presente en las hojas del té. Esta enzima termolábil es inactivada al aplicar calor o vapor, lo cual previene la oxidación enzimática de las catequinas (Velayutham y Babu, 2008).

Las catequinas pertenecen a la familia de los flavonoides (Yilmaz, 2006) y poseen dos anillos de benceno, referidos como anillos A y B. Además, las moléculas de catequina contienen un dihidropirano heterocíclico (el anillo C) que tiene un grupo hidroxilo en el carbono 3. Estas estructuras químicas parecen ser importantes para las actividades antioxidantes de los polifenoles del té (Rice-Evans y Miller, 1996).

Los extractos de hojas inmaduras de té son ricas en flavonoides y derivados de ácido gálico, que incluyen la catequina, epicatequina, galocatequina, epicatequina

galato, epigallocatequina y galato de epigallocatequina (EGCG) (Wanasundara y Shahidi, 2005).

El EGCG es la catequina más abundante presente en las hojas de té verde, negro y oolong. En general, los contenidos de EGCG en té verde y oolong oscilan de 22 a 54 mg/g en tés comerciales; en té negro, el contenido es de 40 mg/g. El contenido relativo de catequinas en el té verde depende del procesamiento de las hojas antes del secado (Cabrera y Artacho, 2006).

2.5.2 Hierbabuena (*Mentha piperita*)

Hierbabuena (*Mentha piperita*) es una planta más relacionada con productos de confitería o gastronomía; sin embargo, estudios en modelos de animales diabéticos tratados con extractos de hierbabuena han reportado que estos reducen de manera significativa los niveles de glucosa, triacilglicéridos, colesterol total y LDL, e incrementan los niveles de colesterol de alta densidad (HDL), también llamado el colesterol bueno. La mayoría de los efectos antes mencionados se han atribuido a la presencia de compuestos fenólicos como la eriocitrina y el ácido rosmarínico, un flavonoide y un ácido fenólico, respectivamente; estos compuestos también se han relacionado con la inhibición de la peroxidación lipídica (Dorman *et al.*, 2009; Sharafi *et al.*, 2010; Barbalhoet *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2012).

2.5.3 Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

El consumo de jamaica en México es alrededor de 14,000 toneladas anuales, y nuestro país se sitúa como el séptimo productor de jamaica a nivel mundial (SAGARPA, 2010).

La infusión de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es una de las más estudiadas debido a sus efectos benéficos a la salud. Diversos estudios epidemiológicos reportan que el consumo de extractos acuosos de esta planta mejora la hipertensión, disminuyendo los niveles de presión arterial en individuos pre-hipertensos e hipertensos; así mismo, a nivel clínico hay estudios que reportan mejoría en los pacientes. Mazoffari y colaboradores (2009) reportaron disminución

significativa de los niveles de colesterol LDL, además de incremento de la concentración de HDL en pacientes con DM bajo un tratamiento diario de dos tazas de extracto de jamaica (4 g/día) por un mes.

En estudios clínicos donde se administró el extracto acuoso de jamaica por un periodo de 4 semanas en pacientes con SM, se observó una disminución en la presión arterial; este efecto se asoció a la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I ocasionada por los compuestos del extracto de jamaica (Joven *et al.*, 2014).

En modelos *in vivo* también se han reportado efectos positivos del extracto de jamaica. En conejos alimentados con una dieta alta en colesterol, el tratamiento con extracto de jamaica por 10 semanas redujo los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y LDL (Chen *et al.*, 2006). Por otro lado, también se ha demostrado un efecto en la reducción en las concentraciones de creatinina y urea en orina en ratas tratadas con una dosis de 50 mg/kg de extracto (Olatunji *et al.*, 2012).

Los cálices de jamaica están compuestos, entre otros elementos, por ácido fenólicos, flavonoides, antocianinas y polifenoles, como las antocianinas delphinidina-3-glucósido y la cianidina-3-glucósido. A todos estos compuestos antioxidantes se atribuyen sus efectos antiinflamatorios, cardioprotectores, reguladores de colesterol y presión arterial (Al-Bradeldín *et al.*, 2005; Mamadou *et al.*, 2009; Kuriyan *et al.*, 2010; McKay *et al.*, 2010).

Otra ventaja que posee la jamaica es su baja toxicidad, ya que se ha reportado que el consumo de hasta 2000 mg/kg por 90 días no produce daño hepático (determinado mediante la actividad de las enzimas aspartato amino transferasa y alanino amino transferasa) y tampoco causa daño renal al no elevar los niveles séricos de creatinina y urea; además, el efecto diurético del extracto no altera los niveles de electrolitos. Por otro lado, se ha reportado una dosis letal media cercana a 5000 mg/kg/día, por lo cual el consumo de extracto de jamaica se considera seguro e inocuo (Hopkins *et al.*, 2013).

2.5.4 Hierba del sapo (*Eryngium carlinae*)

La hierba del sapo (*Eryngium carlinae*) es una planta a la que la medicina tradicional le ha atribuido efectos curativos en la regulación de niveles elevados de colesterol o triglicéridos, así como en afecciones como hipertensión, DM y arteriosclerosis; por lo que se utiliza principalmente por su efecto hipocolesterolémico. Vázquez y colaboradores en el 2006 reportan que la administración diaria de extracto acuoso a una dosis de 100 mg/Kg disminuye en un 9% el colesterol sérico en ratones alimentados con una dieta alta en colesterol.

Las flores de *Eryngium carlinae* disminuyeron los niveles de lípidos en sangre, así como la ganancia de peso, niveles de glucosa e insulina, además redujeron significativamente los niveles urinarios de ácido úrico (100-110%), albúmina (38-42%) y urea (28-41%) en un modelo animal inducido con una dieta alta en grasa, comparado con el grupo control; se reportó además una disminución en la acumulación renal de AGL (20%) (Pérez-Ramírez *et al.*, 2016).

Pérez-Ramírez y colaboradores (2016) también encontraron que el extracto de hierba del sapo (*Eryngium carlinae*) reduce los niveles de estrés oxidativo a nivel renal mostrando una disminución de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de 29% y grupos carbonilo de 18% comparados con el control. Mediante un microarreglo de proteínas, los autores reportaron una disminución significativa en la acumulación de algunas proteínas pro-inflamatorias al administrar extractos de hierba del sapo en ratas. Por otro lado, el efecto protector de hierba del sapo se relaciona con su contenido de compuestos bioactivos como el ácido gálico y epicatequina, así como del Δ^7 -stigmasterol que es el fitoesterol que se presenta mayor cantidad. Las principales saponinas encontradas fueron estéril glucósidos como sitoesteril- β -D glucopiranosido (Pérez-Ramírez *et al.*, 2016).

III. Justificación

En México, uno de los principales problemas de salud es la obesidad y la aparición de enfermedades crónico degenerativas asociadas a ésta, como son la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares y la DM. A nivel mundial, nuestro país ocupa el primer lugar de obesidad y sobrepeso en adultos y segundo lugar en niños y adolescentes.

La alta prevalencia de obesidad y sus complicaciones está directamente relacionada con la ingesta de dietas con un alto contenido calórico proveniente de los alimentos y bebidas, principalmente las refrescantes, reflejándose en la ganancia de grasa corporal del consumidor. Una estrategia utilizada para combatir este problema fue la implementación de recomendaciones para satisfacer las necesidades diarias de líquidos a través del agua y otras bebidas con bajo contenido energético.

El consumo de infusiones ha aumentado en los últimos años debido a que son bebidas económicas y de fácil acceso para toda la población, a su aporte importante de agua, principalmente por el efecto positivo a la salud, relacionado con su contenido de fitoquímicos y micronutrientes. Además, se ha reportado que varias hierbas y flores tienen propiedades antiobesogénicas, antiinflamatorias y antioxidantes; sin embargo, estos beneficios han sido poco estudiados.

En nuestro país las bebidas con alta concentración de azúcares aportan más del 20% de las calorías de la dieta. Por lo tanto, en este trabajo se elaboró una bebida a base de jamaica, con bajo contenido calórico, con propiedades antioxidantes y antiobesigénicas aportadas por los extractos de té verde, hierbabuena y hierba, del sapo, y con características fisicoquímicas y sensoriales aceptables, siendo ésta una alternativa auxiliar en el tratamiento de la obesidad y algunas de sus complicaciones.

IV. Hipótesis

La bebida a base de infusiones de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), hierbabuena (*Mentha piperita*), hierba del sapo (*Eryngium carlinae*) y té verde (*Camellia sinensis*) estimula la inducción de enzimas antioxidantes, siendo éste un mecanismo alternativo auxiliar en el tratamiento de la obesidad.

V. Objetivos

5.1 General

Evaluar el efecto de la ingesta de una bebida funcional a base de extractos herbales de *Hibiscus sabdariffa*, *Mentha piperita*, *Camellia sinensis* e *Eryngium carlinae* en la inducción de sistemas antioxidantes y como una alternativa coadyuvante para el tratamiento de la obesidad en un modelo animal.

5.2 Específicos

1. Realizar un diseño de mezclas para la formulación de una bebida funcional a base de extractos herbales, determinar sus características fisicoquímicas, sensoriales y seleccionar la mejor formulación.
2. Determinar el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales de las infusiones herbales y la mejor bebida a base de infusiones.
3. Evaluar el efecto sobre el control del peso corporal, perfil lipídico y el grado de esteatosis en un modelo de obesidad inducido con una dieta alta en grasa saturada y fructosa.
4. Determinar el efecto de la bebida seleccionada sobre la inducción hepática de enzimas antioxidantes en un modelo de obesidad inducido con una dieta alta en grasa saturada y fructosa.

VI. Materiales y métodos

6.1 Reactivos

Para la determinación de fenoles totales se empleó metanol, ácido ferúlico, reactivo de Folin 1 N (marca Sigma-Aldrich, Louis, MO, EUA) y carbonato de sodio al 20% (marca J.T. Baker, Fair Lawn, NJ, EUA).

Para determinar flavonoides totales se utilizó nitrito de sodio al 5%, cloruro de aluminio al 10%, hidróxido de sodio 1 M y el estándar catequina (marca Sigma-Aldrich).

6.2 Material biológico

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un rango de peso de 160-180 g, adquiridas en el Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM-Juriquilla.

6.3 Material vegetal

Las plántulas de té verde (*Camellia sinensis*), cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) que se utilizaron fueron de marcas comerciales, la hierbabuena (*Mentha piperita*) se cultivo y cuido en los invernaderos en campus Amazcala y la planta completa sin raíces de la hierba del sapo (*Eryngium carlinae*) se obtuvieron de una localidad de nombre Estancia de Palo Dulce, Querétaro, Querétaro (latitud 20°43'34"N y longitud 100°29'8"W a 2180 metros de altitud) y se llevaron identificar al herbario "Dr. Jersy Rzedowski" de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ con número de identificación: 195551.

6.4 Preparación de las infusiones

Las hojas de té verde se sometieron a secado bajo el sol a condiciones

ambientales por los mismos productores de este material. Para la preparación de infusiones (1% p/v) con hierbabuena, hierba del sapo y jamaica se agregó 1 g de material seco a 100 mL de agua recién hervida. Posteriormente, se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente, se dejó enfriar y se hizo pasar por filtros desechables comerciales (Brew Rite, EUA).

Para la elaboración de la bebida se siguieron los lineamientos de buenas prácticas de manufactura, evitando contaminación cruzada de materias primas; el material de cocina se lavó previamente y los aditivos utilizados fueron de grado alimenticio. La elaboración de las bebidas se llevó a cabo en el laboratorio de Estrés oxidativo y salud de la Facultad de Química en la Universidad Autónoma de Querétaro.

6.4.1 Diseño de mezclas

Se realizó un diseño de mezclas con los siguientes factores y niveles:

Cuadro 1. Factores y niveles utilizados en el diseño de mezclas

Factores	Niveles	
Jamaica	35%	50%
Hierbabuena	20%	40%
Té verde	15%	35%
Hierba del sapo	10%	20%

6.5 Cuantificación de fenoles totales

Para la determinación de polifenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (1927), descrito por Singleton y colaboradores (1999). Dicha técnica cuantifica la concentración total de grupos hidroxílicos fenólicos presentes en la muestra que se está analizando en base a una reacción óxido-reducción, obteniendo una coloración azul. Se tomaron alícuotas de 20 μ L de cada una de las

infusiones, colocándose en un vial de vidrio, aforando a un volumen de 250 μL con agua destilada, se adicionaron 125 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N, se agitó en vórtex por 5 min, posteriormente se agregaron 625 μL de Na_2CO_3 al 20 % y se dejó reposar 2 h en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. La cuantificación se realizó por interpolación de los resultados en una curva estándar de ácido gálico (0 a 20 μg), expresándose como mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco.

6.6 Determinación de flavonoides totales

Se tomaron 50 μL de cada una de las infusiones, se adicionaron 180 μL de agua destilada y, posteriormente, se agregaron 20 μL de la solución 2-aminoetil-difenilborato al 1 %, inmediatamente se leyó en un espectrofotómetro a 404 nm. Los resultados se interpolaron en una curva de catequina, expresándose como mg equivalentes de catequina/g de peso seco (Liu, 2002).

6.7 Evaluación del efecto de la ingesta de una bebida a base de infusiones herbales sobre un modelo de obesidad inducido con una dieta alta en grasa saturada y fructosa.

Animales: se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar (UNAM, Campus Juriquilla) de cuatro semanas de edad y clínicamente sanas, una vez en las instalaciones se verificó el sexo de las ratas, el peso y la constancia de salud. Se alojó 1 rata por jaula (187 cm^2 de ancho y 18 cm de alto por rata de 100-300 g) de acero inoxidable, las cuales permitieron la entrada de aire y luz y se colocó un clip a prueba de escape. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad ($50 \pm 10\%$), ciclos día/noche de 12/12 h, temperatura adecuada (23 ± 2 $^\circ\text{C}$), ventilación constante y condiciones aceptables de limpieza; las cuales consistieron en un lavado diario de bebederos, comederos, pisos y charolas de

recolección; además de un lavado de jaulas y paredes cada tercer día (NOM-O62-ZOO-199).

Los animales se pesaron semanalmente y se comparó su crecimiento con la curva de crecimiento para esta cepa publicada por Harlan (Cossio-Bolaños *et al.*, 2013). Así mismo, en caso de que un animal hubiera perdido más del 20% de su peso, se habría sacrificado mediante decapitación, mismo método utilizado durante el sacrificio.

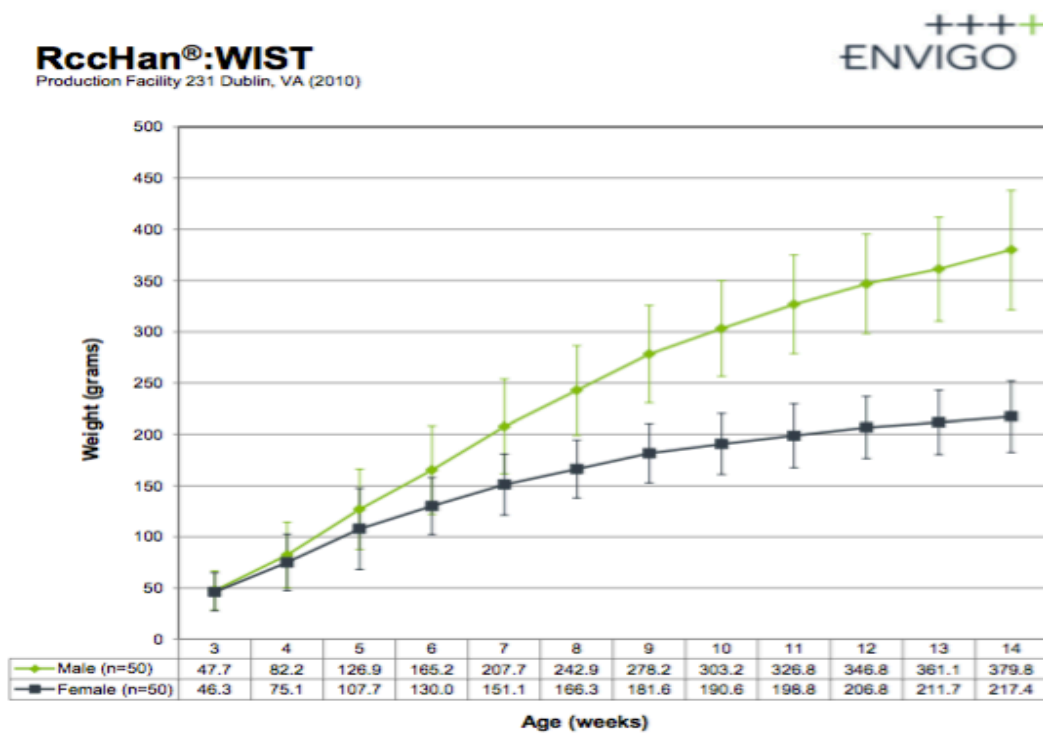


Figura 2. Curva de crecimiento de ratas de la cepa Wistar.

(www.harlan.com o www.harlan.com/contract_research_services)

Todos los días se observó a los animales para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte. El alimento administrado era libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes; se verificó que estuviera dentro del periodo de caducidad y se almacenó en un cuarto desinfectado, seco y ventilado, sobre una tarima o contenedor.

Después de una semana de aclimatación con alimento comercial Rodent Lab Chow 5001 (Nupec, Querétaro) y agua potable *ad libitum*, las ratas se dividieron e identificaron aleatoriamente en 4 grupos experimentales: grupo obeso más bebida (n = 10), grupo sano más bebida (n = 8), grupo control sano (n = 6) y grupo control obeso (n = 6). Cada jaula se identificó de acuerdo al grupo experimental y cada rata se marcó con un color diferente; el colorante se aplicó en la cola y no se ha reportado que cause toxicidad en roedores.

Dieta: El contenido calórico de la dieta empleada con el fin de incrementar el peso corporal e inducir obesidad en los animales fue de 635 kilocalorías por 100 g de alimento. De este contenido calórico, el 22 % correspondió a proteínas, 56 % carbohidratos y 20 % lípidos. La dieta se preparó con un 70 % de alimento base, 16 % de manteca de cerdo y 17 % de fructosa. Los grupos control sano y sano con tratamiento se alimentaron con una dieta estándar, la cual contiene un porcentaje de proteína de 22 %, grasa de 5 % y carbohidratos de 45 %. El resto de los grupos se alimentó con una dieta alta en grasa y fructosa (Cuadro 2).

Cuadro 2. Contenido nutrimental de las dietas del estudio *in vivo*.

Nutrientes	Dieta estándar	Dieta alta en grasa y fructosa (obesogénica)
Energía	337 kcal	635 kcal
Proteínas	22%	22%
Carbohidratos	45%	56%
Lípidos	5%	20%

Cuadro 3. Tratamientos del estudio *in vivo*.

Grupo	Tratamiento	Dieta	n	Tratamiento
1	Control sano	Estándar	6	Agua
2	Sano más bebida	Estándar	8	Bebida funcional
3	Control obeso	Obesogénica	6	Agua
4	Obeso más bebida	Obesogénica	10	Bebida funcional

Los animales se alimentaron con sus respectivas dietas durante cuatro meses y al mismo tiempo se les administró diariamente el tratamiento (bebida a base de Jamaica e infusiones herbales) correspondiente (Cuadro 3). Se determinó semanalmente el consumo de alimento y bebida. Se realizó la recolección de orina y heces al inicio, a la mitad y al finalizar el estudio para análisis posteriores (NOM-062-ZOO-1999).

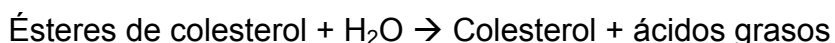
6.7.1 Evaluación de perfil lipídico

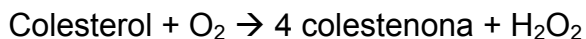
Se determinó la concentración de triglicéridos, colesterol y lipoproteína de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) y lipoproteína de alta densidad (HDL) en suero. El análisis se realizó utilizando kits enzimáticos (Randox Laboratories Ltd., West Virginia, EUA).

- Para LDL y HDL, la determinación se realizó de forma directa de LDLc sin necesidad de pre tratamiento o centrifugado de la muestra. La determinación se realizó en 2 pasos: primero mediante la eliminación de lipoproteínas LDL y segundo la medición de LDLc.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de LDLc presente en la muestra ensayada.

- Para colesterol presente en la muestra se origina un compuesto coloreado según la siguiente reacción:





La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada.

6.7.2 Cuantificación de triglicéridos en heces.

La cuantificación de triglicéridos en heces se realizó por el método de Folch y colaboradores (1957). Se colocaron entre 100 y 300 mg de tejido en un tubo Eppendorf, se agregaron 350 μL de KOH y se dejó incubar toda la noche a 55 $^{\circ}\text{C}$, se mezcló con vortex. Posteriormente, se llevó a un volumen de 1000 μL con etanol:agua, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y el sobrenadante se cambió a otro tubo. El sobrenadante se llevó a 1200 μL con $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ y se agitó utilizando un vortex, se tomó una alícuota de 200 μL en un nuevo tubo y se agregaron 215 μL de MgCl_2 y se agitó con vortex nuevamente, se dejó sobre hielo 10 min y se volvió a centrifugar a 10,000 rpm por 5 min. La fase superior se desechó y la fase inferior contenía esencialmente el total de lípidos. Con el extracto final se realizó la cuantificación de triglicéridos por el método enzimático (Randox Laboratories) leyendo su absorbancia en el espectrofotómetro a 546 nm. La cuantificación se realizó por medio de una ecuación tomando en cuenta el blanco de muestra y el patrón (triglicéridos 200 mg/dl), los resultados se expresan como mg/dl de triglicéridos.

6.7.3 Cuantificación de triglicéridos en tejido adiposo

Para la cuantificación de triglicéridos en tejido adiposo visceral se utilizó el método de Folch y colaboradores (1957). El tejido adiposo se congeló en nitrógeno, posteriormente se pulverizó y se aplicó la misma metodología anteriormente descrita.

6.7.4 Evaluación microscópica del grado de hipertrofia en adipocitos

Se realizó la recolección de tejido adiposo visceral, epididimal y perirrenal de cada uno de los animales y se registró el peso total. En el tejido visceral abdominal se evaluó la hipertrofia de adipocitos. Se dividió en dos fracciones: una se colocó en

una solución de formalina al 4% para su evaluación histopatológica utilizando la tinción de hematoxilina-eosina (H&E). Se realizaron lavados con una solución amortiguadora de formalina al 10 % por un día y se procesaron para histología. Los tejidos se fijaron en parafina, posteriormente se realizaron cortes con un grosor de 5 μm por sección, se sometieron a tinción con H&E para el examen microscópico.

6.7.5 Cuantificación de triglicéridos en hígado

Los lípidos totales en hígado se cuantificaron por el método de Folch y colaboradores (1957). El tejido previamente congelado con nitrógeno líquido se pulverizó, posteriormente se realizó la misma metodología anteriormente descrita.

6.7.6 Evaluación microscópica del grado de esteatosis por histopatología

El hígado se colocó en una solución de formalina al 4% para su evaluación histopatológica utilizando la tinción H&E. Se hicieron lavados con una solución amortiguadora de formalina al 10% por un día y fueron procesados para histopatología. Los tejidos se fijaron en parafina, posteriormente se realizaon cortes con un grosor de 5 μm por sección, y se tiñeron con H&E para el examen microscópico.

6.8 Determinación de enzimas antioxidantes

6.8.1 Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de GPX se midió por el método de Plagia y Valentine (1976), el cual se basa en la oxidación de GSH a glutatión oxidado (GSSG) catalizado por GPX, completando el ciclo convirtiendo GSSG a GSH utilizando glutatión reductasa y NADPH.

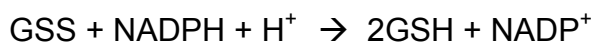
La GPx provee un mecanismo para detoxificación de peróxidos a las células. Esta reacción juega un rol crucial en la protección de células del daño por radicales libres, los cuales se forman por la descomposición de peróxido. Por lo anterior, la

actividad de GPx se determinó empleando un método indirecto que está basado en la oxidación de GSH para convertirlo en GSSG catalizado por GPx, la cual se acopla con el reciclaje de GSSG a GSH utilizando GR y NADPH (β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) mediante la siguiente reacción:

GPX



GR



La disminución de la absorbancia de NADPH medida a 340 nm durante la oxidación de NADPH a NADP es un indicativo de la actividad GPx, puesto que la GPx es el factor limitante de la velocidad de la reacción acoplada. Para la determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: se colocaron en placas de 96 pozos 100 μL de solución amortiguadora de reacción Tris-EDTA pH 8, 50 μL de la mezcla de GSH/GR, 50 μL de muestra con la dilución apropiada (cuya absorbancia inicial se encuentre entre 0.8 y 1.2 y las pendientes sean negativas) y 50 μL de NADPH 1.5 mM. Justo antes de realizar la lectura, se adicionaron 50 μL de hidroperóxido de cumeno 3 mM. La lectura de la absorbancia se realizó a 340 nm a 25 °C con una frecuencia de mediciones tal que permita 8 lecturas en un tiempo de reacción de 2 minutos en un lector de microplacas Vers Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). La lectura debe realizarse antes de 10 seg transcurridos a partir de la adición de hidroperóxido de cumeno. La actividad de GPX (nmol/mg/min) se calculó, adaptando los cálculos de mg de proteína con la cantidad de mL de muestra, usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{nmol}}{\text{mg}} \text{ min} = \frac{(\text{pendiente de muestra} - \text{pendiente del blanco de reacción})}{\left(\frac{6.22}{\text{mg}} \text{ de proteína}\right)}$$

Donde: 6.22 es el coeficiente de absortividad molar de NADPH (nM/cm). Una

unidad se define como los nmoles de NADPH gastado u oxidado en un minuto por miligramo de proteína.

6.8.2 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La SOD se encarga de catalizar el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 . Para determinar su actividad utilizamos el Kit-WST SOD de Sigma-Aldrich, el cual utiliza la sal monosódica de tetrazolio WST-1 (2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazolio), que produce un colorante formazán después de la reducción con un $O_2^{\cdot-}$. La velocidad de la reducción con O_2 es linealmente proporcional con la actividad de la xantina oxidasa (XO), y se inhibe por la presencia de la enzima SOD. La actividad de la enzima SOD se determinó y cuantificó mediante la medición de la disminución en el desarrollo del color a una absorbancia de 450 nm, la cual es proporcional a la cantidad de anión superóxido (Marklund, 1980).

La actividad enzimática se expresó como nmol/min por mg proteína, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/min mg prot} = \frac{(\text{blanco 1} - \text{blanco 3}) - (\text{muestra} - \text{blanco 2})}{(\text{blanco 1} - \text{blanco 3})} * 100$$

Donde: blanco 1= agua destilada, solución de trabajo y solución de trabajo de la enzima, blanco 2= muestra, solución de trabajo y amortiguador de dilución, blanco 3= agua destilada, solución de trabajo y amortiguador de dilución.

6.8.3 Actividad de catalasa (CAT)

La actividad de CAT se midió por el método de Aebi (1984). La CAT es una enzima antioxidante presente en células aeróbicas de mamíferos y no mamíferos que contienen sistema de citocromo. La enzima CAT se encarga de catalizar la descomposición del H_2O_2 a H_2O y O_2 .

Para su determinación se prepararon soluciones de fosfato diácido de sodio y fosfato monoácido de sodio; una vez preparadas ambas soluciones se mezclaron en proporción 1:1.5 v/v y se ajustó el pH a 7.

Se diluyeron 340 μL de H_2O_2 al 30% con 100 mL de amortiguador de fosfatos anteriormente preparado, el cual se empleó como blanco. Antes de hacer la medición de las muestras en el espectro se corrió el blanco (2 mL de amortiguador de fosfatos con 1 mL de H_2O_2 30 mM) para asegurar la concentración inicial de la solución de H_2O_2 . El equipo se programó para determinar cinéticas a una longitud de onda de 240 nm y un tiempo de ensayo de 30 s con intervalos de lectura de 5 s (es importante obtener la primera y la última de las lecturas, es decir a tiempo 0 y tiempo 30 s).

La preparación de las muestras se realizó mediante la dilución de citosoles (muestra), con un amortiguador de fosfatos en una proporción 1:20, esto fue variable dependiendo de la absorbancia que se obtuvo al empezar el ensayo. Para las muestras se tomaron 1.7 mL de amortiguador de fosfatos, después se agregaron 0.3 mL de la muestra y finalmente 1 mL de la solución de H_2O_2 30 mM, se colocó la celda en el espectrofotómetro y se comenzó el ensayo.

Para realizar los cálculos se utilizó la siguiente fórmula y los siguientes parámetros:

$$\text{Actividad enzimática (U/ml)} = \frac{\Delta\text{Abs/min} * \text{vol total} * \text{factor de dilución}}{\text{Coeficiente de extinción} * \text{vol muestra} * \text{min}}$$

Donde:

- Volumen total: 3 mL
- Factor de dilución: ej. 1:4.5 mL se coloca 4.5
- Coeficiente de extinción. 0.0436 nM/min
- Volumen de la muestra: 0.3 mL
- Minutos: 0.5 min

VII. Diseño experimental y análisis estadístico

Se llevó a cabo un diseño de mezclas para identificar la mejor bebida de acuerdo a su nivel de agrado general y compuestos fenólicos y flavonoides (Cuadro 5). Como resultado del diseño de mezclas se obtuvieron un total de 20 formulaciones con distintas proporciones de las infusiones herbales de hirbabuena, Jamaica, té verde y hierba del sapo, y se realizó la evaluación sensorial con un panel no entrenado con 50 participantes. Las 20 formulaciones se evaluaron en 4 ocasiones diferentes valorando 5 formulaciones cada vez, debido a que se corría el riesgo de saturar al consumidor y sesgar el resultado. Como indicación, se solicitó a los participantes probar las 5 formulaciones que se les presentaron y calificarlas de acuerdo a su agrado general, asignando un valor de 5 a la que más fuera de su agrado y un valor de 1 la que menos gustara. Se analizaron las frecuencias de calificaciones y, de la tabla de contingencias resultantes, se identificaron a las formulaciones más aceptadas, usando la prueba chi cuadrada. Por otro lado, para comparar efectos sobre el modelo *in vivo* descrito de la bebida seleccionada se utilizó un diseño unifactorial completamente aleatorizado en los grupos experimentales mencionados. Los resultados se reportaron como la media \pm error estándar (EE). Se empleó la media \pm desviación estándar (DE) y un análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey-Kramer para comparación de medias de los valores derivados de las distintas formulaciones en los parámetros señalados anteriormente y en las determinaciones *in vivo* *T-student con un valor* $\alpha = 0.05$, utilizando el paquete estadístico JMP 8.0.2. (SAS Campus Drive. New York, EUA).

VIII. Resultados y discusión

8.1 Formulación de una bebida por medio de un diseño de mezclas.

Para la formulación de la bebida a base de extractos herbales se utilizaron infusiones al 1% (p/v) de jamaica, té verde, hierba del sapo y hierbabuena a las proporciones mostradas en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Factores y niveles para el análisis de mezclas:

Factores	Niveles	
Jamaica	0.35	0.50
Hierbabuena	0.20	0.40
Té verde	0.15	0.35
Hierba del sapo	0.10	0.20

Para la bebida propuesta, el componente mayoritario en todas las mezclas fue la jamaica debido a su gran aceptabilidad en una prueba sensorial previa y a sus propiedades antioxidantes ya reportadas. Las infusiones de hierba del sapo y té verde han reportado tener efecto hipolipidémico en modelos de diabetes y efectos en inducción de sistemas antioxidantes, efecto que principalmente se ha reportado para el té verde. Sin embargo, estas infusiones fueron los componentes de menor proporción en las mezclas debido a su baja aceptabilidad entre los consumidores frecuentes de este tipo de bebidas. El sabor característico, particularmente del té verde se debe a que es rico en catequinas (30% de su peso seco), algunos flavonoides como ácido clorogénico, ácido cumárico y cafeína (Wanasundara y Shahidi, 2005).

Como resultado del análisis de mezclas en las proporciones establecidas, se obtuvo un total de 20 formulaciones:

Cuadro 5. Formulaciones resultantes del diseño de mezclas

Formulación	J	HB	TV	HS
112	0.35	0.30	0.15	0.20
178	0.50	0.25	0.15	0.10
179	0.43	0.20	0.23	0.15
687	0.40	0.20	0.30	0.10
234	0.35	0.20	0.30	0.15
252	0.35	0.33	0.23	0.10
282	0.50	0.20	0.20	0.10
305	0.50	0.20	0.15	0.15
345	0.35	0.25	0.30	0.10
418	0.43	0.33	0.15	0.10
535	0.35	0.40	0.15	0.10
631	0.40	0.20	0.20	0.20
223	0.45	0.25	0.20	0.10
756	0.35	0.27	0.23	0.15
760	0.35	0.20	0.28	0.18
812	0.43	0.27	0.15	0.15
843	0.48	0.20	0.15	0.18
848	0.45	0.20	0.15	0.20
912	0.35	0.35	0.15	0.15
958	0.35	0.20	0.25	0.20

Una vez realizadas las 20 formulaciones en las diferentes proporciones, resultado del diseño de mezclas, se llevó a cabo una evaluación sensorial, en 4 ocasiones diferentes valorando 5 formulaciones cada vez, con un panel no entrenado con 50 participantes. Se solicitó a los participantes probar las 5 formulaciones que se les presentaron y calificarlas de acuerdo a su agrado general, asignando un valor de 5 a la que más fuera de su agrado y un valor de 1 la que menos gustara.

En la Figura 3 se observa que las formulaciones 223 (5 = 10 personas, 4 = 20 personas), 234 (5 = 15 personas, 4 = 15 personas), 252 (5 = 23 personas, 4 = 20 personas) y 282 (5 = 12 personas, 4 = 21 personas) fueron las bebidas con mayor agrado general, tras realizar una prueba de chi cuadrada. También pudimos observar que la formulación 687 tuvo menor agrado general (mayor cantidad de valores 1 = 43 personas y 2 = 3 personas).

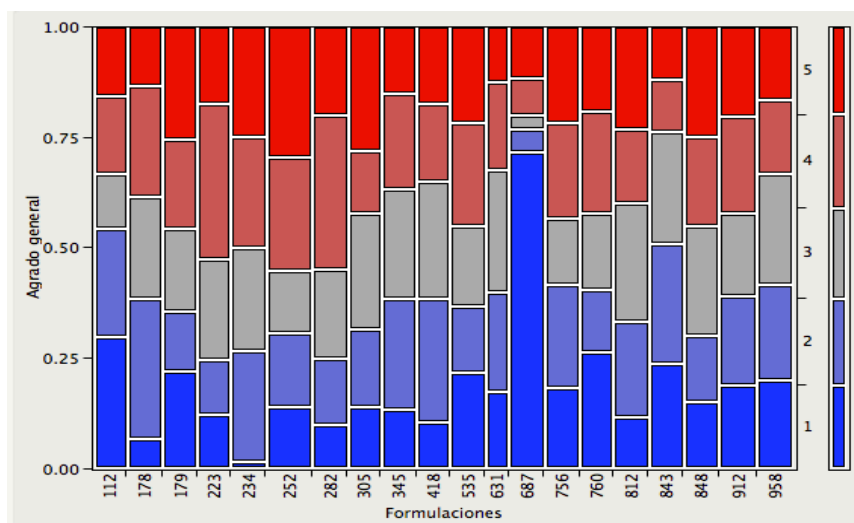


Figura 3. Resultados de la evaluación sensorial de 20 formulaciones resultado del diseño de mezclas

Donde el número 5 (color rojo claro) indica el mayor agrado y el número 1 (color azul rey) indica el menor agrado. En el eje de las “x” se muestran las formulaciones y el eje de las “y” la escala de agrado general, los valores van del 1 al 5 y se muestran a mano derecha.

En base a las propiedades organolépticas, las bebidas seleccionadas incluyeron aquellas con mayor proporción de infusión de hierbabuena, el cual posee compuestos volátiles que proporciona un sabor más refrescante, así como el característico sabor del extracto de jamaica. Por lo anterior, la preferencia por parte de los panelistas se inclinó por las formulaciones cuya formulación contenía mayor proporción de las infusiones de hierbabuena y Jamaica (Nelsol *et al.*, 2012) Posteriormente, con las 4 bebidas más aceptadas (223, 234, 252 y 282) se llevó a cabo una última evaluación sensorial que, en conjunto con la determinación de fenoles y flavonoides totales, se empleó para decidir la formulación de la bebida final. En Figura 4 se puede observar que, mediante un análisis de chi cuadrada, la formulación 223 (4 = 23 personas, 3 = 18 personas) recibió calificaciones mayores en cuanto a agrado general, siendo el 3 y 4 las calificaciones más altas (mayor cantidad de 3 y 4 puntos).

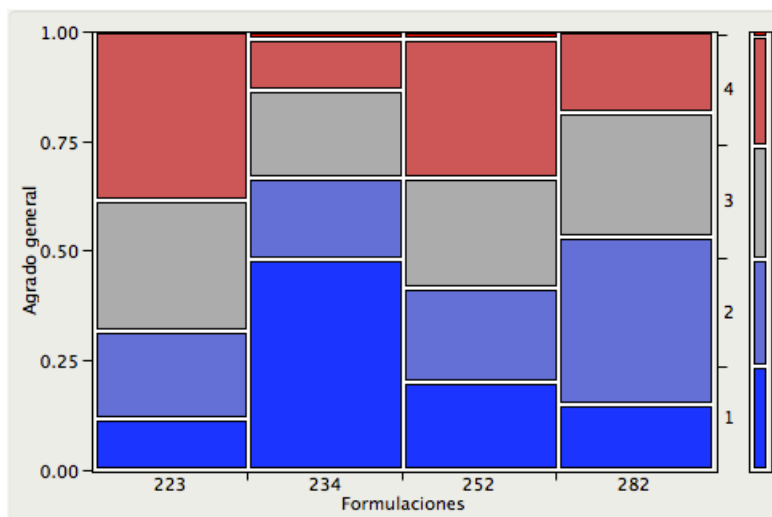


Figura 4. Análisis sensorial de las últimas 4 formulaciones más aceptadas por su agrado general.

Donde el número 5 (color rojo oscuro) indica el mayor agrado y el número 1 (color azul rey) indica el menor agrado. En el eje de las “x” se muestran las formulaciones y el eje de las “y” la escala de agrado general, los valores van del 1 al 4 y se muestran a mano derecha.

Las proporciones finales de la bebida que tuvieron mayor agrado general (223) se presentan en el Cuadro 6. Las proporciones utilizadas en la bebida final mostraron mayor aceptación debido a que tenían en mayor cantidad jamaica y hierbabuena, las cuales presentan sabores conocidos por la población en general y consumidores cotidianos de infusiones herbales. Además, el contenido de hierba del sapo fue el menor, por lo tanto, la bebida no presentó sabores amargos o astringentes.

Cuadro 6. Proporciones de extractos de la bebida final

Extracto	Proporción
Jamaica	0.45
Té verde	0.25
Hierbabuena	0.20
Hierba del sapo	0.10

8.2 Caracterización nutracéutica

8.2.1 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales

Los compuestos fenólicos son los principales fitoquímicos consumidos en la dieta; estos compuestos tienen propiedades potencialmente preventivas y terapéuticas en alteraciones metabólicas como la obesidad o algunas relacionadas con estrés oxidativo (Mohsen-Hasan, 2010). Por otro lado, una de las razones por las cuales el consumo de infusiones se ha incrementado alrededor del mundo es debido a su contenido de fitoquímicos con beneficios para la salud conocidos como polifenoles. Estos compuestos son considerados los principales compuestos bioactivos con potencial terapéutico. Por lo anterior, se realizó la cuantificación de

compuestos fenólicos totales y flavonoides de las 4 formulaciones resultantes con mayor puntaje en la evaluación sensorial y de los extractos por separado.

En el Cuadro 7 podemos observar el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides de los diferentes extractos (al 1 % p/v) utilizados en la elaboración de las formulaciones, en el cual se muestra que el extracto con mayor contenido de fenoles totales es el té verde con 158.9 ± 0.76 mg/g equivalentes de ácido gálico.

En los resultados de flavonoides expresados en mg equivalentes de catequina/g de material seco, el extracto con mayor concentración fue el té verde con 58.7 ± 0.33 seguido de hierbabuena con 52.2 ± 0.57 . Un mayor contenido de fenoles totales no necesariamente determina un mayor contenido de flavonoides (Bedascarruabure *et al.*, 2004). En nuestro caso, en los resultados obtenidos con las infusiones no se observa una correlación ($r^2 = 0.109$), puesto que las infusiones que tuvieron mayor concentración de polifenoles totales tuvieron una menor concentración de flavonoides.

Cuadro 7. Contenido total de fenoles y flavonoides en los extractos herbales (al 1% p/v) utilizados en la formulación.

Extractos	Contenido de fenoles totales (mg/g equivalentes de ácido gálico)	Contenido de flavonoides totales (mg/g equivalentes de catequina)
Jamaica	$40.6 \pm 0.22b$	$40.9 \pm 0.72d$
Té verde	$158.9 \pm 0.76a$	$58.7 \pm 0.33a$
Hierbabuena	$36.7 \pm 0.31c$	$52.2 \pm 0.57b$
Hierba del sapo	$35.8 \pm 0.19c$	$44.0 \pm 0.36c$

Los resultados se expresan como la media \pm DE ($n = 3$).^{a,b,c} Letras diferentes en cada columna indican diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$) por la prueba Tukey.

En el caso del extracto de jamaica, Sáyago-Ayerdi y colaboradores (2007) reportaron en extracto acuoso de jamaica al 1% (p/v) una concentración de polifenoles totales de 21.7 mg/g equivalentes de ácido gálico de materia seca, el

cual es un valor inferior a la concentración reportada en este trabajo para la infusión al 1% (p/v) de este mismo material. Esta variación entre concentraciones se puede deber al genotipo de material vegetal utilizado o a las condiciones de extracción (Scalzo *et al.*, 2005), lo cual se debe considerar para la estandarización de un proceso o para el análisis de resultados en evaluaciones anteriores.

Para el té verde se ha reportado que un extracto de té verde comercial (2.5 g de material seco en 250 mL de agua) contiene entre 240 y 320 mg/g equivalentes de catequina. Este valor es superior a lo encontrado en nuestro estudio y puede deberse al procedimiento empleado (temperatura y tiempo) durante la extracción, ya que debido al proceso se pueden perder algunos compuestos y se sabe que los polifenoles son termosensibles. Sin embargo, se decidió utilizar este proceso de extracción con el fin de simular las condiciones que se utilizan en la industria para procesar material vegetal destinado a la elaboración de infusiones indicadas en el empaque.

Los compuestos característicos y más abundantes en la hierba del sapo son ácidos fenólicos como lo son ácido cafeico, ácido elágico, ácido gálico, ácido cumárico y ácido rosmarinico entre otros; también podemos encontrar flavonoides como catequinas, rutina, epicatequina y galato de epicatequina (Pérez *et al.*, 2016). En infusiones de hierbabuena podemos encontrar saponinas como estigmasteril-3- β D- glucopiranosido, ácido fitolacagenico-3- β galactopironisido y ácido serjanico-3 - β arabinopiranosido o alcaloides como colina, trigonelina y catarantina. Por otro lado, el té verde presenta como compuestos mayoritarios catequinas como epicatequina, epicatequina galato, epigalocatequina (Chan y Soh, 2011). Las infusiones de Jamaica por su parte contienen ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetin y algunas antocianinas (Hopkins *et al.*, 2013).

En la Figura 5 se presenta el contenido total de fenoles y flavonoides de las 20 formulaciones evaluadas. Se puede observar que la bebida número 223 presentó la mayor concentración de flavonoides (47.22 ± 4.49 mg/g equivalentes de catequina). Por su parte, las bebidas 912 y 687 presentaron la mayor

concentración de compuestos fenólicos (69.67 ± 3.38 y 69.69 ± 4.73 mg/g equivalentes ácido gálico, respectivamente).

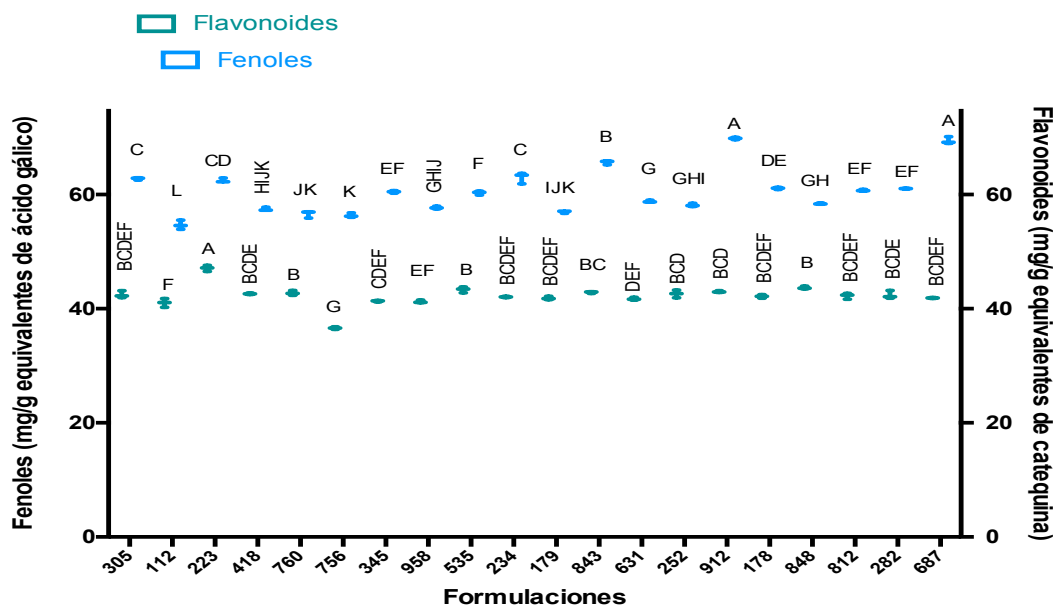


Figura 5. Contenido de fenoles y flavonoides totales de las distintas formulaciones.

Los valores representan la media \pm DE (n = 3). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($\alpha = 0.05$), con la prueba de Tukey-Kramer.

Los ácidos fenólicos y flavonoides que pueden contener algunas infusiones herbales varían de acuerdo a la naturaleza del material que se está usando para la preparación de esta bebida. Por lo tanto, para las formulaciones 223, 234, 252 y 282, que fueron las más aceptadas en la evaluación sensorial anteriormente mencionada, se repitió la determinación de la concentración de fenoles y flavonoides totales. En la Figura 6 podemos observar que la formulación 223 presenta alto contenido de fenoles y flavonoides totales (62.48 ± 3.32 mg equivalentes de catequina/mL y 47.22 ± 4.49 mg equivalentes de ácido gálico/mL, respectivamente) comparada con las formulaciones 234, 252 y 282. A pesar de no existir diferencia significativa en la concentración de fenoles y flavonoides entre las formulaciones evaluadas, se eligió la formulación 223 por su mayor grado de

aceptación y su contenido en compuestos. En cuanto a estos resultados se esperaba que la concentración de fenoles y flavonoides tuvieran un comportamiento sinérgico y se viera elevado su contenido al adicionar diferentes tipos de infusiones herbales ricas estos compuestos; sin embargo, al evaluar su concentración en cada una de las 20 formulaciones y posteriormente en las 4 formulaciones finales evaluadas no presentaron diferencia estadísticamente significativa.

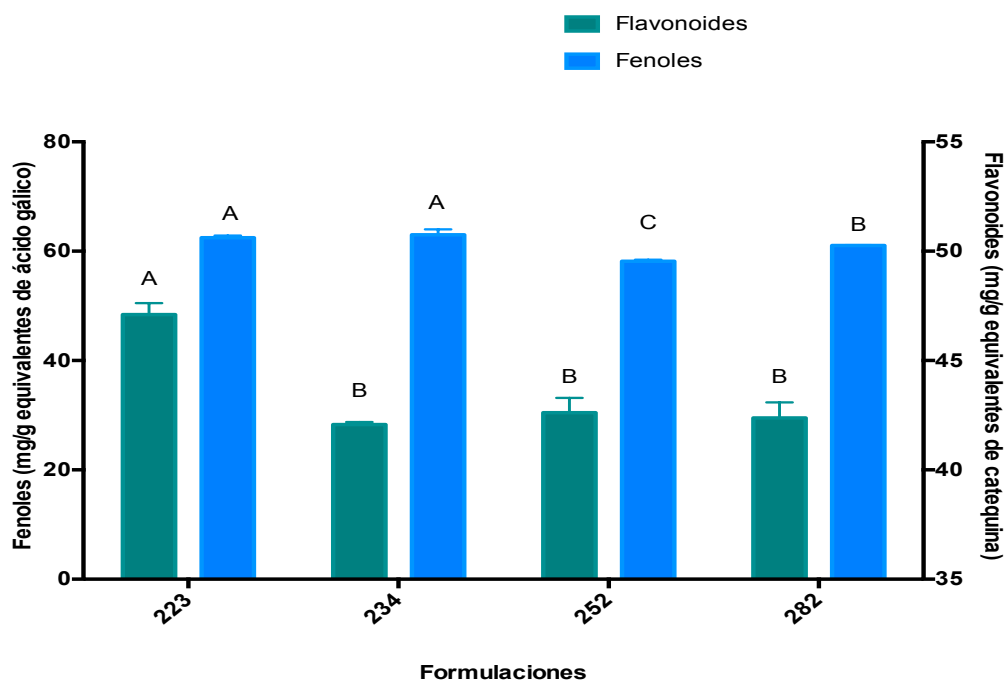


Figura 6. Contenido de fenoles y flavonoides de las formulaciones finales.

Los valores representan la media \pm DE (n = 3). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($\alpha = 0.05$), con la prueba de Tukey-Kramer.

8.3 Evaluación del efecto de la ingesta de una bebida a base de extractos herbales sobre un modelo de obesidad inducido con una dieta alta en grasa saturada y fructosa.

8.3.1 Consumo de alimento

En la Figura 7 se puede observar que el consumo de alimento al comienzo del

experimento fue entre 31.7 ± 0.7 y 34.0 ± 0.9 g por rata por día para los grupos con dieta alta en grasa y fructosa sin y con la bebida funcional, respectivamente; mientras que, el consumo de alimento en los grupos con dieta estándar fue de entre 35 ± 1.1 y 38.8 ± 0.6 g por rata por día, respectivamente. Lo anterior se debe a que la dieta alta en grasa y fructosa contiene un mayor número de calorías que la estándar; por lo tanto, los animales tienden a consumir menor cantidad de alimento en peso pero mayor energía en calorías. Sin embargo, esta diferencia de consumo entre grupos fue disminuyendo a lo largo del experimento debido al incremento de consumo por parte de los grupos con dieta alta en grasa y fructosa; particularmente, a partir de la semana siete ya no hubo diferencia en el consumo de alimento entre el grupo control sano y el grupo obeso más bebida. Este consumo aumento en el grupo obeso más bebida y se debe a que con el paso del tiempo uno de los síntomas que se presentan durante la obesidad un mayor apetito, lo cual está relacionado con la resistencia a la leptina e insulina, provocando un consumo mayor de calorías necesarias (Serradeil-Le *et al.*, 1997). Sin embargo, en la semana 11 se puede observar una disminución en el consumo en el grupo control sano con 30.8 ± 1.7 g por rata por día y en el sano más bebida con 29.9 ± 0.9 g por rata por día. En esta última semana, los grupos control obeso y obeso más bebida consumieron 31.8 ± 0.4 g y 30.1 ± 1.0 g por rata por día, respectivamente. Lo anterior se puede asociar a que algunos compuestos naturales como los polifenólicos después de un consumo prolongado tienen la facultad de producir un efecto anorexigénico, es decir, disminuyen el apetito y el consumo de alimento a través de la regulación de neuropéptidos, los cuales controlan la saciedad en el hipotálamo (D'Alessio, 2007; Panickar, 2013).

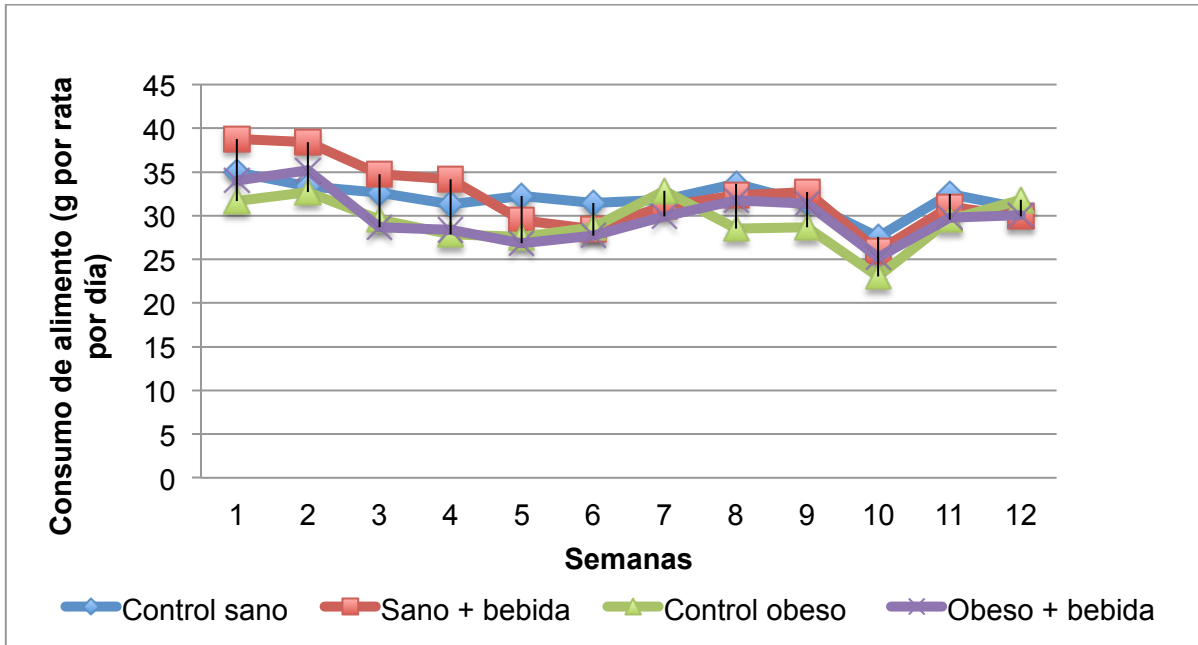


Figura 7. Consumo de alimento por rata por día durante 12 semanas.

Tipo de dieta administrada por grupos: grupos control sano (dieta estándar) y sano + bebida; grupos control obeso (dieta alta en grasa y fructosa) y obeso + bebida.

8.3.2 Peso corporal

En la Figura 8 se presentan los resultados del peso corporal de las ratas durante el periodo experimental. Se puede observar que en la quinta semana se presentó una ganancia del 10% del peso corporal del grupo control obeso respecto al control sano; posteriormente, en la última semana de tratamiento la diferencia aumentó a un 25%. Por otro lado, los grupos de animales tratados con la bebida (sano + bebida y obeso + bebida) disminuyeron de peso corporal; sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa comparada con los grupos control sano y obeso. El tratamiento con la bebida logró disminuir la ganancia de peso hasta un 9.4% en el grupo obeso + bebida.

Se ha reportado en diversos estudios que el tratamiento con té verde, a animales a los cuales se les administró una dieta alta en grasa y glucosa, evitó la ganancia de peso corporal comparado con los animales sin tratamiento, debido principalmente a los compuestos bioactivos como EGCG (Heber *et al.*, 2014).

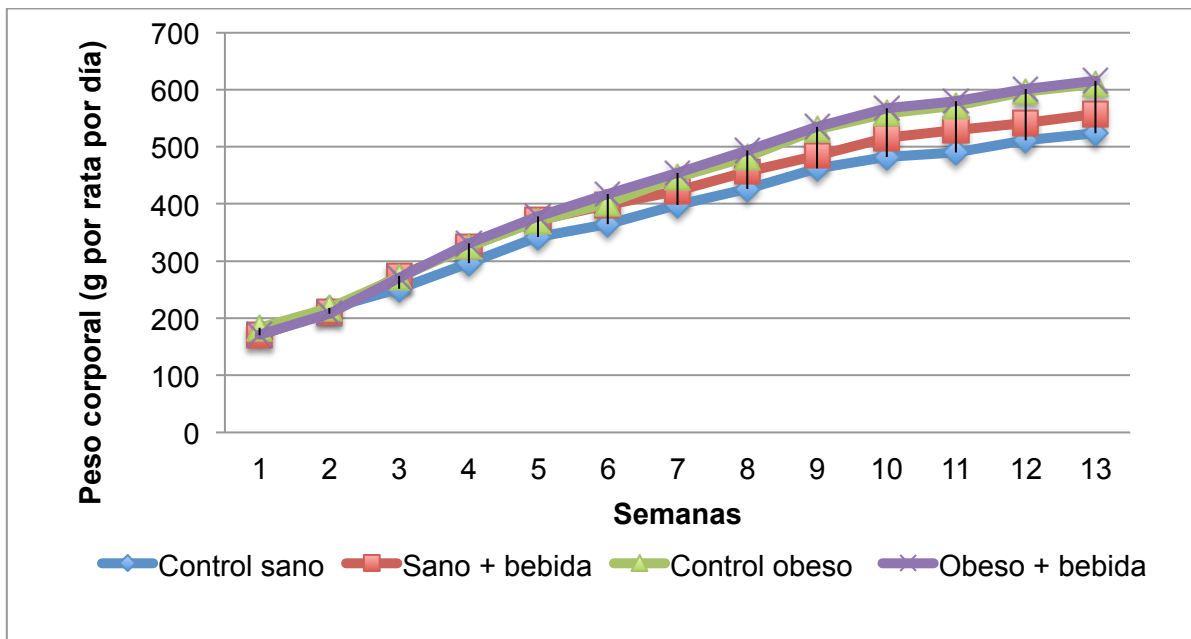


Figura 8. Peso corporal en gramos por rata por día durante 12 semanas.

Tipo de dieta administrada por grupos: grupos control sano (dieta estándar) y sano + bebida; grupos control obeso (dieta alta en grasa y fructosa) y obeso + bebida.

En resumen, en el Cuadro 8 podemos observar que el consumo de alimento de la semana 0 a la 12 disminuyó en los grupos sanos de 35.0 ± 5.4 y 38.7 ± 3.5 g por rata por día a 30.8 ± 3.8 y 29.8 ± 1.9 g por rata por día, para control sano y sano más bebida, respectivamente, y en los grupos obesos se mantuvo de 31.7 ± 0.7 y 34.0 ± 0.9 g por rata por día a 31.8 ± 0.4 y 30.1 ± 1.0 g por rata por día, en el grupo control obeso y obeso más bebida, respectivamente. Esto se debe a que los grupos obesos perdieron el control de la sensación de saciedad y consumían el total de alimento que se ofrecía, y los grupos sanos tenían una mayor auto regulación de su apetito; además durante su proceso de envejecimiento sus necesidades caloricas disminuyeron. En este sentido, la leptina es secretada y sintetizada por el adipocito como respuesta a la alimentación para así suprimir el apetito a través de una acción vía hipotalámica; una vez en el hipotálamo, la

leptina llega áreas del cerebro relacionadas con el balance de energía iniciando una cascada de señales específicas que inhiben diversos neuropéptidos orexigénicos, lo cual seguramente no ocurrió en los animales obesos con y sin bebida (Morales *et al.*, 2010).

Por otro lado, no se observó diferencia significativa en el peso corporal del grupo control sano comparado con el grupo sano más bebida, ni tampoco entre los grupos control obeso y obeso más bebida. Sin embargo, sí se observó diferencia significativa en la cantidad de tejido adiposo entre los grupos obesos sin (48.3 ± 3.6 g) y con bebida (38.2 ± 2.1 g). En el caso de los grupos sanos, ambos grupos presentaron valores similares (18.18 ± 1.1 y 19.22 ± 1.2 g para el grupo control sano y sano más bebida, respectivamente) y menores a ambos grupos obesos. En base a los resultados anteriores, se sugiere que el peso corporal reportado en el grupo sano más bebida pudiera ser referente a otro componente corporal como músculo, masa ósea o agua, entre otros. Sin embargo, en este estudio no se pudo realizar un análisis de composición corporal para verificar dicha hipótesis, debido a que no se cuenta con el equipo necesario para roedores.

Cuadro 8. Consumo de alimento, peso corporal y tejido adiposo de animales tratados

GRUPOS	Consumo de alimento (g por rata por día)		Peso corporal (g por rata por semana)		Ganancia de peso (g)	Tejido adiposo (g) ³
	Semana 0 ¹	Semana 12 ¹	Semana 0 ²	Semana 12 ²		
Control sano	35.0±5.4	30.8±3.8	216.7±4.9	523.3±19.0	306.6±16.6	18.18±1.1
Sano más bebida	38.7±3.5	29.8±1.9	211.3±8.5	557.5±11.4	346.2±15.8	19.22±1.2
Control	31.7±0.7	31.8±0.4	218.3±4.0	610.0 ±35.2	391.6±34.0	48.3±3.6
Obeso más bebida	34.0±0.9	30.1±1.0	208.0±4.1	616.0±15.8	408±14.5	38.2±2.1*

Los valores representan la media \pm DE. Valores con marcados con asterisco (*) en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) con respecto a su control por la prueba de t-Student.

Los extractos de *H. sabdariffa* por su parte han demostrado un efecto antiobesogénico tanto en estudios clínicos como *in vivo* (Chang *et al.*, 2014). Entre los compuestos de la jamaica que poseen esta capacidad se encuentran las antocianinas y el ácido hidroxycítrico (Da-Costa *et al.*, 2014). Adicionalmente, en otro estudio en ratones alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa y suplementados con distintas concentraciones de extracto de *H. sabdariffa* se observó una disminución significativa de la acumulación de grasa en hígado, así como el colesterol y los triglicéridos en plasma comparados con los animales alimentados con dieta estándar (Huang *et al.*, 2018). Además, se ha reportado que la disminución de acumulación de grasa en hígado sugiere un efecto protector a nivel hepático y en la regulación metabólica en estudios clínicos con individuos entre 18 y 65 años con un índice de masa corporal mayor a 27 (Chang *et al.*, 2014).

En un estudio con ratones machos de la cepa Swiss tratados diariamente con un extracto de té verde (50 mg/kg) durante 8 semanas se observó una disminución en el peso corporal y el peso del tejido adiposo blanco (Okuda *et al.*, 2014). Por otro lado, se observó que la administración de EGCG (20 mg/kg) 3 veces por semana a ratones de la cepa C57BL/6b que fueron alimentados con una dieta alta en grasa redujo significativamente del peso corporal y la acumulación de grasa visceral a las 42 y 66 semanas de experimentación (Byun *et al.*, 2014).

Los posibles mecanismos de acción del té verde se pueden resumir en dos tipos principales de acciones: 1) Una es la acción de los constituyentes del té en el tracto gastrointestinal para disminuir la digestión y la absorción de macronutrientes, o alterar la microbiota intestinal. 2) La otra es la ejercida por los constituyentes del té después de la absorción sistémica en la inhibición del anabolismo y la estimulación del catabolismo en el hígado, músculo, tejido adiposo y otros tejidos (Byun *et al.*, 2014). Los efectos combinados podrían ser los responsables de la reducción del peso corporal y tejido adiposo en las ratas tratadas con la bebida formulada en el presente estudio.

Por otra parte, Rubio y colaboradores (2015) elaboraron una bebida funcional a partir de infusiones con diferentes proporciones de extractos herbales de té verde y colomeca con concentrado de extracto de limón, cuyo contenido de compuestos fenólicos totales fue de 106.4 ± 8.7 mg equivalentes de ácido gálico/mL y de flavonoides de 15.4 ± 4.4 mg equivalentes de catequina/mL. Posteriormente, en el estudio *in vivo* con ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa, la administración de la bebida por un periodo de 4 meses disminuyó la ganancia de peso corporal en un 10.3%. Los resultados anteriores sugieren que la administración de bebidas funcionales es una estrategia efectiva contra la ganancia de peso.

8.4 Evaluación del perfil lipídico

En la obesidad se presenta un estado de dislipidemia, caracterizado por niveles elevados de triglicéridos, LDL y bajos niveles de HDL (Steinberger *et al.*, 2009). Debido a la actividad lipolítica del tejido adiposo visceral aumentan los AGL en el torrente sanguíneo, los cuales son transportados al hígado, incrementando así la síntesis de triglicéridos.

Los resultados de la evaluación del perfil lipídico se muestran en el Cuadro 9 y se observa que hay diferencia en los niveles de colesterol total entre los grupos obesos con y sin tratamiento. El grupo obeso más bebida presentó una concentración de 69.8 ± 6.9 mg/dl de colesterol total, la cual fue menor estadísticamente a la del grupo control obeso (87.0 ± 8.9 mg/dl de colesterol total), y logró llegar a tener valores normales en comparación con los grupos sanos. Como se esperaba, los grupos sanos no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre ellos, sin embargo los valores reportados para el grupo sano más bebida (74.5 ± 3.3) fueron cercanos a los del grupo control sano (69.8 ± 6.5).

De manera similar, el grupo obeso más bebida presentó una menor concentración de triglicéridos (50.3 ± 7.0 mg/dl) a la del grupo control obeso (76.2 ± 9.5 mg/dl de triglicéridos); sin embargo, aunque no presentó diferencia estadísticamente

significativa, los valores llegaron incluso a normalizarse en comparación con el grupo sano control (45.0 ± 7.7) y sano más bebida (47.1 ± 6.9). En los niveles de triglicéridos esperábamos una disminución significativa en el grupo obeso más bebida comparados con los del control obeso, debido al efecto hipolipidémico previamente reportado por otros autores para los extractos incluidos en la bebida funcional evaluada (Figuroa-Pérez *et al.*, 2015; Pérez-Ramírez *et al.*, 2016). Como se mencionó en el estudio de Rubio y colaboradores (2015), la administración de la bebida funcional elaborada con extractos de té verde y colcomeca con concentrado de extracto de limón por un periodo de 4 meses a ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa disminuyó los niveles de triglicéridos en suero en un 22.5%. En nuestro estudio la administración de la bebida elaborada con infusiones de jamaica, té verde, hierba del sapo y hierbabuena disminuyó los niveles de triglicéridos en suero un 34%.

Como se esperaba, los niveles de HDL y LDL en el grupo sano más bebida no presentaron diferencia estadísticamente significativa comparados con el grupo control sano. En el grupo control obeso se encontró una concentración de LDL de 63.1 ± 12.7 mg/dl, la cual fue estadísticamente mayor a la del grupo obeso más bebida (46.1 ± 4.5 mg/dl de LDL). En este grupo esperábamos que el consumo de la bebida disminuyera de forma significativa los niveles de LDL en el grupo obeso más bebida comparada con el grupo control obeso, debido a que en otros estudios se ha reportado que el consumo de polifenoles administrados en la bebida atenuó la oxidación de las LDL, la formación de las células espumosas, así como la reducción de la síntesis del colesterol LDL a nivel hepático y brindó un aumento en la actividad antioxidante (Maydata *et al.*, 2002).

En el grupo obeso más bebida, la concentración de glucosa en plasma fue estadísticamente menor (108.6 ± 13.8 mg/dl) comparada con la del grupo control obeso (146.8 ± 14.5 mg/dl). En un estudio con ratas resistentes a la insulina, el tratamiento con un extracto rico en polifenoles del té verde disminuyó significativamente los niveles séricos de glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol

total, colesterol LDL y AGL en los animales tratados comparados con el grupo control (Qin *et al.*, 2010).

Cuadro 9. Efecto de las bebidas sobre el perfil lipídico y glucosa en sangre en animales tratados.

Grupo	Colesterol total (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	Glucosa (mg/dl)
Control sano	69.8 ± 6.5	45.0 ± 7.7	34.57 ± 1.3	42.2 ± 6.1	81.9 ± 8.4
Sano más bebida	74.5 ± 3.3	47.1 ± 6.9	30.66 ± 0.3	41.0 ± 4.3	87.3 ± 9.5
Control obeso	87.0 ± 8.9	76.2 ± 9.5	31.29 ± 1.0	63.1 ± 12.7	146.8 ± 14.5
Obeso más bebida	69.8 ± 6.9 *	50.3 ± 7.0 *	31.63 ± 0.7	46.1 ± 4.5 *	108.6 ± 13.8 *

Los valores representan la media ± DE. Valores marcados con asterisco (*) en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) con la prueba de T-student entre grupos con y sin tratamiento.

Se ha reportado en diferentes modelos de animales y estudios clínicos que el consumo de extracto acuoso de jamaica disminuye los niveles séricos de triglicéridos, atribuido principalmente a compuestos como las antocianinas y el ácido protocatequina (Da Costa *et al.*, 2014). Ajiboye y colaboradores (2015) reportan una disminución en la concentración plasmática de LDL en ratas con SM inducido con dieta alta en grasa y fructosa, debido al tratamiento con un extracto acuoso de jamaica (100 y 200 mg/kg de peso corporal por día) tratadas por tres semanas.

En general, estos resultados nos indican que al tener un aporte de polifenoles en la dieta, en los animales tratados con la bebida se disminuyen la acumulación de LDL, triglicéridos, colesterol total y glucosa en sangre en el grupo obeso más bebida, comparados con el grupo control.

8.4.1 Triglicéridos en heces

La disminución de triglicéridos en suero podría estar relacionado con la inhibición de la actividad de la lipasa pancreática, la cual disminuye la absorción e incrementa la excreción de triglicéridos en las heces (Hsu *et al.*, 2006).

La Figura 9 muestra que en los grupos sanos y obesos con y sin bebida no se encontró diferencia significativa en la concentración de triglicéridos en heces. Lo anterior sugiere que la inhibición de absorción de lípidos de la dieta no fue el mecanismo por el cual el grupo obeso más bebida tuvo menor ganancia de peso en respecto al control obeso.

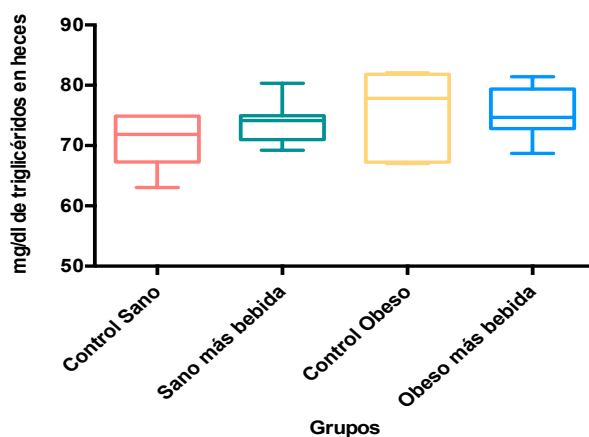


Figura 9. Efecto de la bebida sobre la concentración de triglicéridos en heces de los animales tratados.

Los valores representan la media \pm DE. Los asteriscos indican diferencia estadística significativa entre grupos con y sin bebida ($\alpha = 0.05$), con la prueba de t-Student.

Se sugiere que los compuestos polifenólicos presentes en la bebida no tienen efecto a nivel pancreático o gástrico, debido a que no se inhibe la absorción de lípidos de la dieta y, por lo tanto, no hay un incremento en la excreción de lípidos en heces (Pilou, I *et al.*, 2015).

8.4.2 Triglicéridos en tejido adiposo

En este trabajo, se realizó la evaluación del efecto de una bebida sobre la concentración de triglicéridos de tejido adiposo de ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa y frutosa. Además, para la evaluación de la concentración de triglicéridos se utilizó el tejido adiposo visceral únicamente debido a que se ha reportado que tiene una mayor relación con ciertas alteraciones metabólicas (Guilherme *et al.*, 2008).

En la Figura 10 podemos observar que en los grupos tratados con la bebida a base extractos herbales hubo una disminución estadísticamente significativa en la concentración de triglicéridos en tejido adiposo comparada con los grupos sin tratamiento.

El tejido adiposo blanco (TAB) compuesto por triglicéridos (TAG) es la principal reserva de energía en los eucariotes superiores. Este conjunto de lípidos está en un estado constante de flujo, como resultado de un ciclo de lipólisis y reesterificación (Brown *et al.*, 2009). Durante los períodos de privación de energía, el tejido adiposo blanco sufre un cambio hacia mayores tasas netas de lipólisis, que se puede definir como la hidrólisis de TAG para generar AGL y glicerol que se liberan al torrente sanguíneo para el uso de otros órganos como sustratos de energía. La lipólisis procede de una manera ordenada y regulada, con diferentes enzimas que actúan en cada paso.

El almacenamiento de reservas de energía, como TAG, y la capacidad de movilizar rápidamente estas reservas, como AGL para alimentar las demandas de energía, representa una respuesta metabólica altamente adaptada (Chang *et al.*, 2012).

Las alteraciones en la lipólisis se asocian con frecuencia con la obesidad, incluido un aumento en las tasas basales de lipólisis que pueden contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina, así como una capacidad de respuesta alterada a la estimulación de la lipólisis (Mukamal *et al.*, 2006).

Los efectos del té verde y los polifenoles del té sobre el peso corporal se han estudiado ampliamente en modelos animales. La mayoría de los estudios

mostraron que el consumo de extractos de té verde o EGCG redujo significativamente la ganancia de peso corporal y/o el peso del tejido adiposo, disminuyó los niveles de glucosa o insulina en la sangre y aumentó la sensibilidad a la insulina o la tolerancia a la glucosa. Estos estudios utilizaron roedores con dietas altas en grasa o modelos animales con obesidad genética/diabéticos. Por ejemplo, en ratones alimentados con una dieta alta en grasa (60% de las calorías) se observó que el tratamiento dietético con EGCG (0.32% en la dieta) durante 16 semanas redujo significativamente el aumento de peso corporal, grasa corporal y peso de grasa visceral en comparación con ratones sin tratamiento con EGCG (Bose *et al.*, 2008; Byun *et al.*, 2014).

Los modelos de obesidad inducida con una dieta alta en grasa en modelos de obesidad tienen varios puntos en común con la obesidad humana y diversos estudios han revelado que los antioxidantes actúan como reguladores de la obesidad (Ansari *et al.*, 2012).

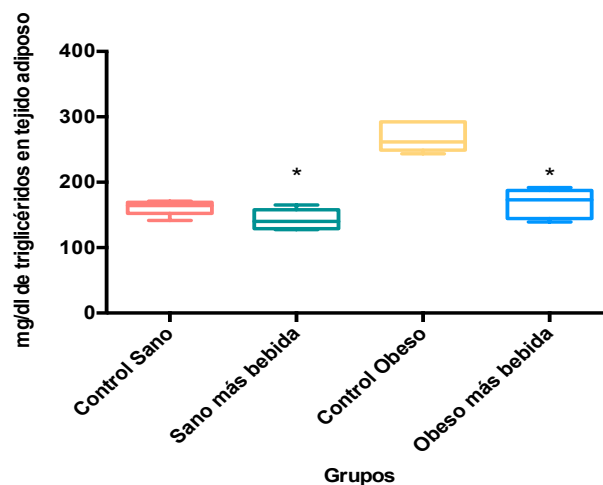


Figura 10. Efecto de la bebida sobre la concentración de triglicéridos en tejido adiposo de los animales tratados.

Los valores representan la media \pm DE. Los grupos marcados con asterisco indican diferencia estadística significativa entre grupos con y sin bebida ($\alpha = 0.05$), con la prueba de t-Student.

8.4.3 Grado de hipertrofia en tejido adiposo.

Durante la obesidad se aumenta el tamaño y el número de las células grasas (adipocitos); en promedio, cada célula grasa pesa 0.4 a 0.6 μg (Hernán *et al.*, 2002). La función principal de estas células es el almacenamiento de triglicéridos (Guilherme *et al.*, 2008). Cuando existe una pérdida de peso corporal, comienza una disminución en el tamaño de estas células producto de la disminución del contenido de triglicéridos (Hernán *et al.*, 2002).

La obesidad se caracteriza principalmente por un exceso de TAB y una amplificación en el tamaño de los adipocitos que resulta del aumento del almacenamiento de TAG (Bao *et al.*, 2014).

Trayhurn y Beattie (2001) reportaron que el tejido adiposo crece principalmente por una combinación del aumento en el volumen celular (hipertrofia) y en el número de células grasas (hiperplasia). Así mismo, los autores reportaron que en ratas adultas alimentadas *ad libitum* presentaron un aumento de peso corporal y que el peso de cada uno de los cuatro depósitos adiposos estudiados (mesentérica, epidídimo, subcutánea inguinal y retroperitoneal) aumentó progresivamente con la edad y la alimentación *ad libitum*. Sin embargo, este crecimiento de los dos depósitos de grasa intra-abdominal evaluados (mesentérica y del epidídimo) se debió principalmente a la hipertrofia (aumento en el volumen celular de 83 % y 64 %, respectivamente) y en menor grado a una hiperplasia moderada.

Una disminución de triglicéridos en adipocitos se ve reflejado en la hipertrofia, la cual se midió mediante análisis histopatológico de adipocitos. En la Figura 11 los resultados muestran que en los grupos con tratamiento disminuyó la hipertrofia de adipocitos comparado con los grupos control.

Wolfram (2005) reportó que infusiones como el té verde disminuyeron el contenido de triglicéridos del tejido adiposo y por lo tanto el tamaño de estos, aminorando la hipertrofia de los adipocitos. De manera que, los compuestos bioactivos contenidos en la bebida formulada podrían estar ejerciendo efectos similares al del

té verde, presentando beneficios sobre esta alteración en adipocitos causada por la obesidad.

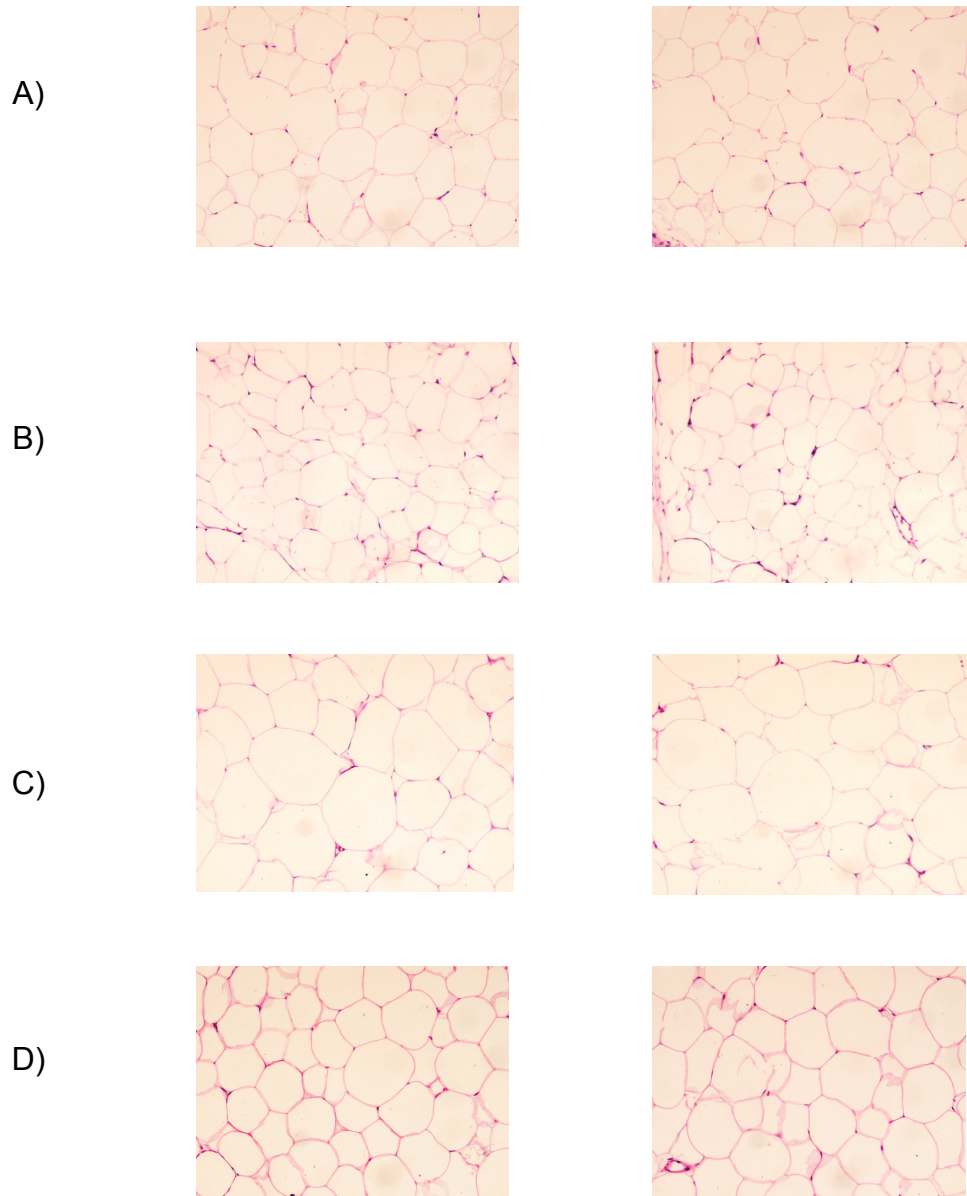


Figura 11. Microfotografías de adipocitos teñidos con H&E

Amplificación 100X (izquierda) y 300X (derecha). A) grupo control sano B) grupo sano más bebida C) grupo control obeso D) grupo obeso más bebida.

8.4.4 Triglicéridos en hígado

Durante la obesidad, el alto consumo de ácidos grasos excede la capacidad del adipocito para poder almacenar estos ácidos grasos; además, la resistencia a la insulina provoca que a la par se realice lipólisis en el organismo, dando como resultado un aumento de AGL en el torrente sanguíneo, los cuales se depositan en el hígado. Este almacén de lípidos en el hígado resulta de una pérdida del balance entre la captación, la síntesis, la excreción y la oxidación de los AGL (McCullough, 2004).

Los resultados de la concentración de triglicéridos en hígado se presentan en la Figura 12, donde se puede observar que el grupo obeso más bebida presentó menor concentración que el grupo control obeso, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Las células adiposas se alimentan de AGL provenientes del torrente sanguíneo (principalmente de triglicéridos circulantes). Esta capacidad de absorber el flujo de AGL de la circulación le da al tejido adiposo un papel especial para proteger otros tejidos del flujo excesivo de AGL; pero cuando hay un exceso, estos lípidos se transportan a otros órganos, principalmente al hígado (McCullough *et al.*, 2004). Al hígado pueden llegar ácidos grasos provenientes del tejido adiposo, transportándose acomplexados con albúmina o pueden venir directamente de la dieta en forma de quilomicrones.

Los hepatocitos tienen los mecanismos para unir, transformar, catabolizar y exportar el exceso de flujo de AGL a través de las acciones de proteínas de unión a AGL, síntesis de triglicéridos y secreción como VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), β -oxidación, entre otras. Cuando se satura la combinación con albumina, las células hepáticas captan más AGL. Este exceso de AGL en el hígado juega un papel primordial en la elevada secreción de VLDL que lleva a hipertriglicerimias y dislipidemias asociadas (Luyckx *et al.*, 2000). Por lo anterior, se evaluó el contenido de triglicéridos en tejido hepático de ratas con obesidad inducida por dieta y tratadas con una bebida funcional sobre el almacenamiento de

éstos, ya sea por aquellos provenientes del tejido adiposo o bien por la síntesis de *novo*.

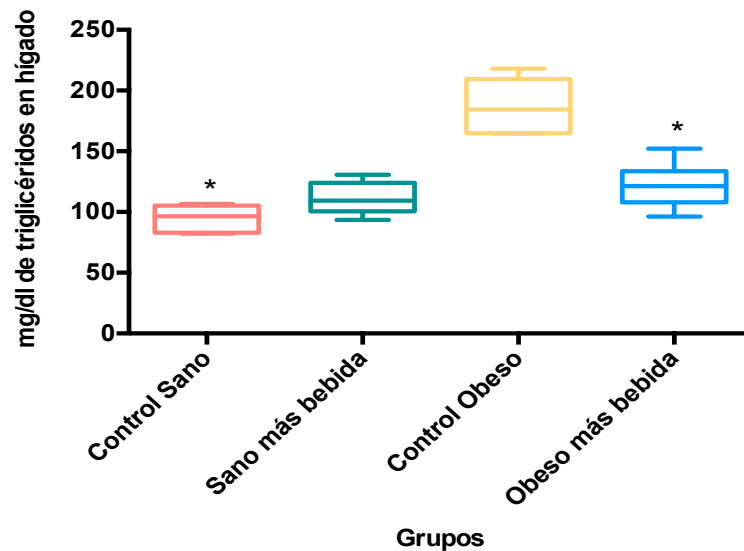


Figura 12. Efecto de la bebida sobre la concentración de triglicéridos en hígado de los animales tratados.

Los valores representan la media \pm DE. Los grupos marcados con asterisco indican diferencia estadística significativa entre grupos con y sin bebida ($\alpha = 0.05$), con la prueba de t-Student.

8.4.5 Estudio histopatológico de hígado

El exceso de triglicéridos en hígado se conoce como esteatosis o hígado graso. El grado de esteatosis se puede diagnosticar mediante análisis histopatológico. En las microfotografías de la Figura 13 a y b se observa que el tejido hepático de los grupos control sano y sano más bebida no presentan daño y es clasificado como grado 0 de acuerdo a la clasificación de Brunt. La Figura 13c correspondiente al grupo control obeso muestra claramente vacuolas dentro de los hepatocitos, siendo clasificado como grado 3 donde hay vacuolas de grasa en más del 66% de hepatocitos. En la Figura 13d también se observa que el grupo obeso más bebida

presenta una menor cantidad de vacuolas, clasificado como grado 2 (33-66% de hepatocitos con vacuolas).

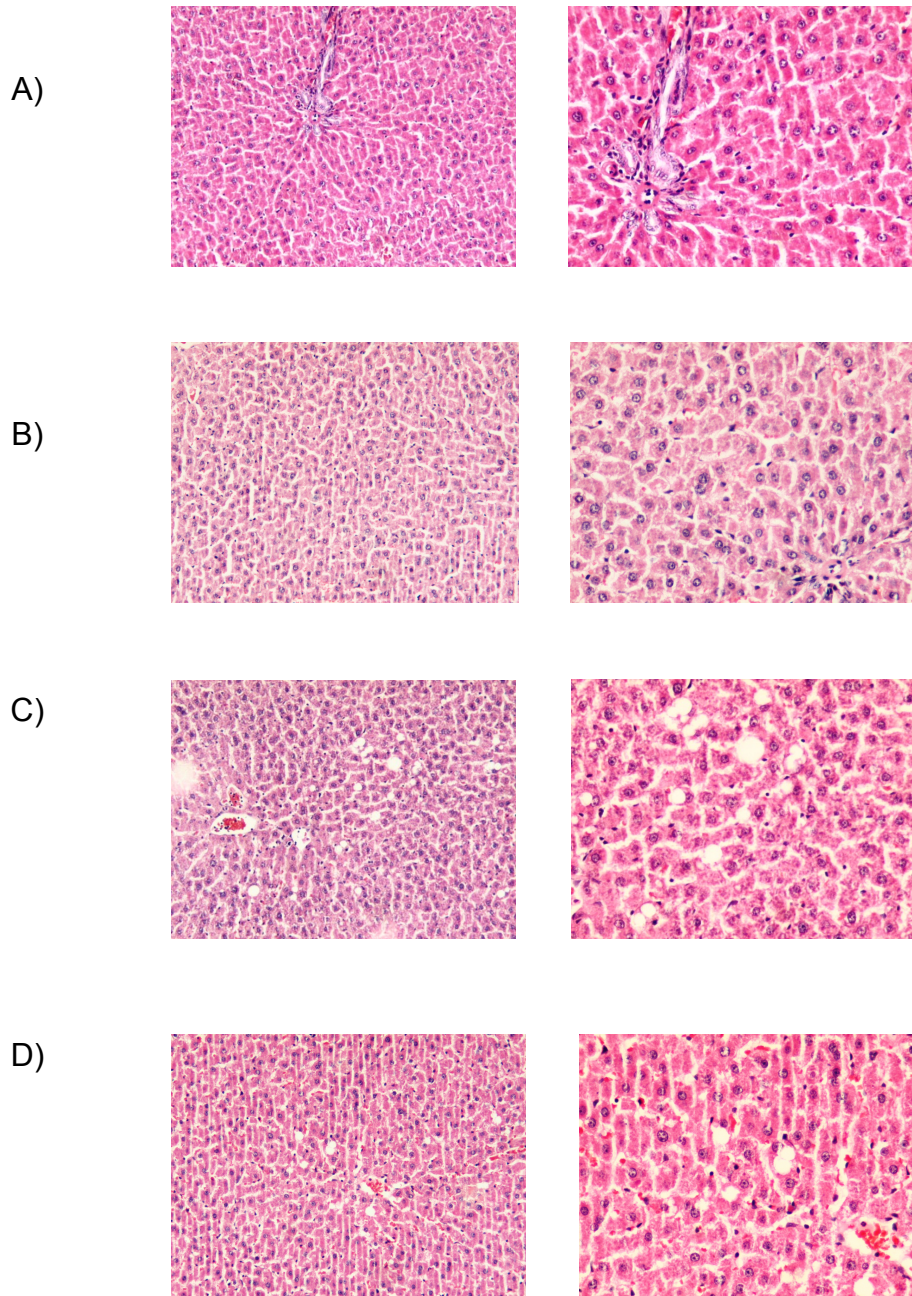


Figura 13 Identificación de esteatosis en ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa y fructosa y tratadas con la bebida.

Microfotografías de tejido hepático teñidas con H&E con amplificación 100X (izquierda) y 300X (derecha). A) grupo control sano B) grupo sano más bebida C) grupo control obeso D) grupo obeso más bebida.

8.5 Efecto de la bebida sobre la actividad de enzimas antioxidantes en hígado de los animales tratados.

8.5.1 Determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx).

En la Figura 14 se observa que ambos grupos con tratamiento con la bebida muestran un aumento estadísticamente significativo en la actividad de la enzima GPx, con 53.4% más en el grupo obeso con tratamiento y un 63.5% en el grupo sano con tratamiento, comparados con los controles.

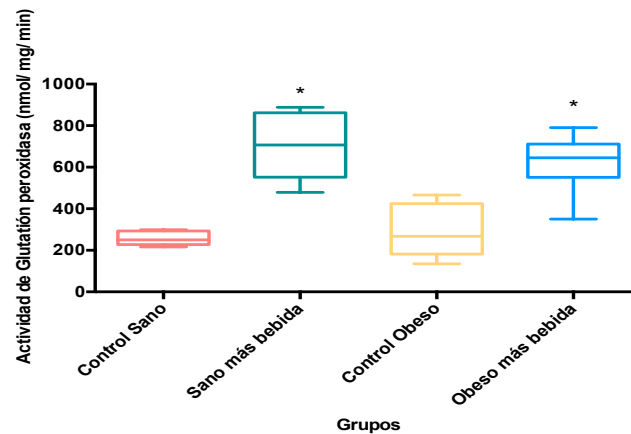


Figura 14. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPX) en hígado.

Los valores representan la media \pm DE. Los grupos marcados con asterisco indican diferencia estadística significativa entre grupos con y sin bebida ($\alpha = 0.05$), con la prueba de t-Student.

8.5.2 Determinación de la actividad de la enzima catalasa (CAT).

En la Figura 15 podemos observar que el grupo obeso más bebida presentó menor actividad de la enzima CAT, lo cual fue estadísticamente significativo comparado con el grupo control obeso. Por el contrario, el grupo sano más bebida presentó mayor actividad de CAT comparado con el grupo control sano, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

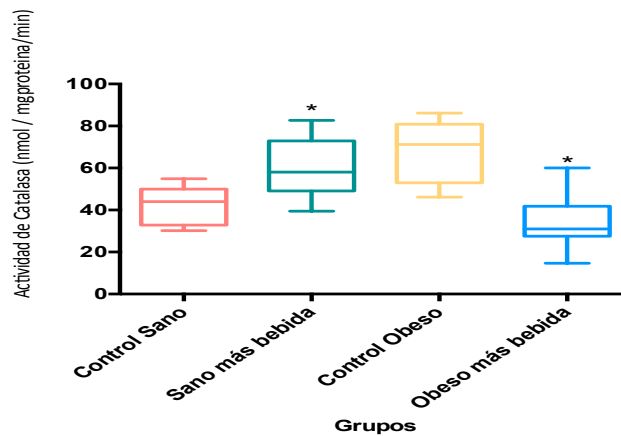


Figura 15. Actividad de la enzima catalasa en hígado.

Los valores representan la media \pm DE. Los grupos marcados con asterisco indican diferencia estadística significativa entre grupos con y sin bebida ($\alpha = 0.05$), con la prueba de t-Student.

8.5.3 Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).

La Figura 16 muestra que en los grupos sanos y obesos con y sin bebida no se encontró diferencia significativa en la actividad de SOD. Lo anterior sugiere que puede existir una adaptación compensatoria al estrés oxidativo por la obesidad inducida con la dieta alta en grasa y fructosa en hígado. Específicamente, la enzima SOD no tuvo una respuesta aumentada al estrés oxidativo propio de la obesidad.

Sin embargo, a pesar de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sanos y obesos, la actividad enzimática en los grupos con tratamiento se incrementó ligeramente, lo cual se esperaba debido a la ingesta de polifenoles.

Así mismo se sugiere que no se encontraron diferencias en la actividad de SOD debido a un agotamiento de ésta por el exceso de anión superóxido y el aumento del producto (peróxido de hidrógeno), lo cual daría una mayor actividad de la enzima CAT, tal y como se muestra en la figura anterior.

De igual manera, el incremento de la actividad de la enzima CAT en los animales sanos más bebida puede deberse a una disfunción mitocondrial causada por la ingesta de los compuestos polifenólicos presentes en la bebida generando la producción de peróxido de hidrógeno y, en consecuencia, se activan otros sistemas de defensa. El hecho de que en el grupo obeso más bebida, la actividad de la enzima presente valores similares a los del grupo sano control nos indica que la actividad que ejercen los polifenoles sobre el sistema de defensa antioxidante es más eficiente en dietas altas en grasa.

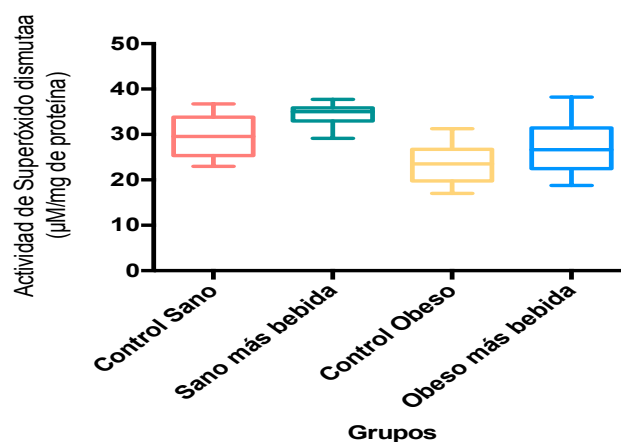


Figura 16. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en hígado.

Los valores representan la media \pm DE. Los grupos marcados con asterisco indican diferencia estadística significativa entre grupos con y sin bebida ($\alpha = 0.05$), con la prueba de t-Student.

Las dietas ricas en grasa aumentan el estrés oxidativo en una gran variedad de tejidos, lo cual puede dar lugar a muchas enfermedades degenerativas; así mismo el estrés oxidativo compromete los mecanismos endógenos de defensa antioxidante, induciendo la actividad de enzimas antioxidantes (GPX y CAT) (Ansari *et al.*, 2012). Sin embargo, para que esto ocurra dependerá del nivel o estado energético, del avance de la enfermedad y el nivel de estrés.

Los depósitos de grasa como consecuencia de una dieta alta en grasa son vulnerables a sufrir reacciones de oxidación; por tanto, si la producción de ERO excede la capacidad del sistema antioxidante de las células ocurre una peroxidación lipídica, lo cual contribuye directamente al desarrollo de enfermedades como la aterosclerosis (Olorunnisola *et al.*, 2012).

Por otro lado, la enzima GPX provee un mecanismo para la detoxificación de peróxidos de las células. Esta reacción juega un rol crucial en la protección de células del daño por radicales libres, los cuales se forman por la descomposición de peróxidos.

Además, la obesidad crónica se ha asociado con la reducción de sistemas de defensa antioxidante en diferentes órganos del cuerpo. Sin embargo, no se observa esto para la actividad de la enzima GPx en el trabajo realizado, debido a que la enzima actuó sobre su sustrato (peróxidos) el cual aún se encontraba presente al finalizar el estudio.

Catalá y colaboradores (2008) reportaron que con ratas Wistar macho y hembra de 8 semanas de edad a las cuales alimentaron con una dieta alta en grasa (55.20%) durante 14 semanas, observaron que la actividad de CAT y GPX en el hígado de los animales, disminuyó significativamente con respecto al control, probablemente por el tiempo de experimentación al que sometieron a los animales, el cual fue más largo que en el presente estudio. Así como, en el estudio de Lee y colaboradores (2009) con ratas macho Sprague-Dawley de 165-185 g de peso corporal las cuales fueron alimentadas durante 6 semanas con una dieta con 5% de grasa total para el grupo control y con 25% de grasa total para el grupo denominado alto en grasa, observándose una disminución estadísticamente significativa de las actividades enzimáticas de GPX, GST y CAT del grupo alto en grasa con respecto al control.

Los resultados anteriormente mencionados son acordes con los obtenidos para GPX y CAT en este estudio y una de las razones de ello podrían ser que el consumo diario de la bebida en nuestro estudio daba un aporte de polifenoles, lo

cual ocasionó la inducción de los sistemas antioxidantes y así la actividad de GPx y CAT tanto en el grupo obeso como en el sano más bebida.

Para el caso de el estudio de Catalá y colaboradores (2008), la edad de las ratas utilizadas representó el doble de las empleadas en este estudio y los animales tuvieron una excesiva ingesta de grasa (55.20%) comparada con nuestro estudio, cuya ingesta de grasa total fue de 20%. Esta última razón sugiere que podría haber ocasionado disminución de la actividad de GPX en los animales tratados con una dieta alta en grasa comparados con el grupo control, ya que la ingesta excesiva de sustrato para esta enzima rebasó el poder de actividad de la misma y no pudo contrarrestar la peroxidación lipídica. La reducción significativa debajo de los niveles basales de la actividad de la CAT en los estudios con animales tratados con dieta alta en grasa denota una menor formación de H_2O_2 que podría estar relacionada con una disminución de la actividad enzimática de SOD, por lo cual podría existir una excesiva acumulación de superóxidos. No obstante, en un estudio realizado por Adéchian y colaboradores (2009) con ratas macho Wistar adultas con un peso aproximado de 323 g, las cuales fueron alimentadas durante 5 semanas con una dieta alta en grasa (45%), se reportó un incremento no estadísticamente significativo de la actividad enzimática de GPX (1.05 veces) y CAT (1.05 veces) en el hígado de las ratas tratadas con una dieta alta en grasa.

Asimismo, Marczuk y colaboradores (2009) llevaron a cabo un estudio en ratas adultas hembras con un peso promedio de 230 g, las cuales fueron divididas en dos grupos: el primer grupo recibió una dieta estándar (control) enriquecida con ácido linoleico obteniendo un 15% final de grasa; el segundo grupo recibió una dieta estándar enriquecida a un total de 15% de grasa con ácido palmítico. Al final de las 4 semanas de experimentación, la actividad enzimática de CAT y GPX en hígado se incrementó estadísticamente 1.75 y 1.21 veces (para la dieta enriquecida con ácido linoleico y ácido palmítico, respectivamente) y 3.00 y 1.09 veces (para la dieta enriquecida con ácido linoleico y ácido palmítico, respectivamente) con respecto al grupo control. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en el hígado de las ratas empleadas en este estudio, sugiriendo que

al mismo tiempo que incrementa la actividad de GPX por el exceso de sustrato, la actividad de la SOD también disminuye, por lo cual hay una disminución de la peroxidación lipídica reflejada en el incremento de la actividad de CAT (Catalá *et al.*, 2008; Adéchan *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Marczuk *et al.*, 2009).

Por otro lado, en un estudio en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa, la actividad de SOD y GPx, como captadores principales del anión superóxido (O_2^-), aumentó después de la administración de vitamina D; se reportó en los resultados que los grupos que recibieron la dieta alta en grasa y fructosa presentaron una actividad basal de CAT más alta en comparación con grupos que recibieron dieta normal y la actividad de CAT se normalizó después de la administración de vitamina D. Lo anterior concuerda con los resultados de este estudio, en los cuales la actividad de CAT se vió normalizada tras el consumo de la bebida en el grupo obeso más bebida comparado con el grupo control obeso (Ansari *et al.*, 2012).

Similar a nuestros resultados, también se ha reportado el incremento 2.2 veces más en la actividad de GPx en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa (Ansari *et al.*, 2012). De hecho, este hallazgo puede explicarse por la adaptación compensatoria del organismo al estrés oxidativo por la obesidad inducida en dieta alta en grasa. Numerosos estudios previos han sugerido que el cambio en el sistema de defensa antioxidante y marcadores de estrés oxidativo en el cuerpo es específico del tejido; en otras palabras, diferentes órganos del cuerpo pueden responder al estrés oxidativo selectivamente por disminución o aumento en las concentraciones de marcadores de estrés oxidativo (Hünkar *et al.*, 2002). Aumentar la actividad de CAT del tejido hepático en ratas obesas puede ser una respuesta adaptativa importante a las condiciones de mayor estrés oxidativo en la obesidad y la disponibilidad biológica de radicales O_2^- y H_2O_2 en tejido adiposo. El aumento de la actividad de CAT refleja el aumento de radicales O_2^- y el H_2O_2 a medida que la CAT descompone el H_2O_2 en H_2O y O_2 (Maritim *et al.*, 2003).

Estos resultados indican que existe un desequilibrio del estado oxidativo, por lo cual se considera que la dieta alta en grasa y fructosa incrementó la oxidación de

los ácidos grasos a través de la vía de oxidación peroxisomal que se asocia con una mayor generación de H_2O_2 , por lo cual la actividad enzimática de la CAT, una enzima localizada en los peroxisomas que cataliza la descomposición de H_2O_2 incrementó. Por lo tanto, el aumento de la actividad de la CAT sugiere una respuesta compensatoria del sistema de defensa bajo una condición de incremento de generación hepática de H_2O_2 . Por último, se considera que los resultados sugieren que las actividades de GPx y CAT son espacial y temporalmente coordinadas.

IX. Conclusiones

La bebida final formulada a base de extracto de jamaica, té verde, hierbabuena y hierba del sapo fue aceptada sensorialmente y presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos y una de las más altas concentraciones de flavonoides del total de 20 formulaciones evaluadas.

El consumo de la bebida final por/durante 4 semanas disminuyó el peso corporal en el grupo obeso con tratamiento y este efecto no está relacionado con un menor consumo de alimento.

La ingesta de la bebida en ratas con obesidad inducida con dieta alta en grasa y fructosa mejoró el metabolismo de lípidos, atenuando la hipertrofia de adipocitos, así como su concentración de triglicéridos, lo que podría estar relacionado con una menor síntesis de *novo* de ácidos grasos y un aumento en la β -oxidación hepática.

La menor concentración de triglicéridos en suero, tejido adiposo y tejido hepático detectada en los animales del grupo control obeso más bebida, comparados con los valores en el grupo obeso, se debe a que el consumo subcrónico de polifenoles presentes en la bebida inducen el sistema de defensa antioxidante y, por ende, disminuyen la adipogénesis y la acumulación de lípidos en sangre.

En conclusión, estos resultados sugieren que la administración de una dieta alta en grasa y fructosa promueve un estrés oxidativo que compromete los mecanismos endógenos de defensa antioxidante, elevando la actividad de enzimas antioxidantes (GPX y CAT) que juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis redox celular. Los peróxidos lipídicos son removidos de manera eficiente por la GPX y, en última instancia, el H₂O₂ por la CAT por lo que la concentración de SOD no se incrementa. Bajo estas condiciones, el tratamiento con la bebida mostró beneficios sobre alteraciones metabólicas en las ratas obesas; por lo tanto, esta bebida es una alternativa viable para contrarrestar las alteraciones causadas y mejorar el estado redox en modelos de obesidad. Así mismo, se observa una inducción de estos sistemas antioxidantes en animales sanos, lo que podría considerarse como una estrategia preventiva efectiva contra el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas asociadas al estrés oxidativo.

En general, estos resultados nos indican que al tener un aporte de polifenoles en la dieta, en los animales tratados con la bebida se inducen los sistemas antioxidantes y por ende, disminuyen la adipogénesis y la acumulación de LDL, triglicéridos, colesterol total y glucosa en sangre.

Como perspectiva se pretende probar la bebida en un estudio clínico con adición de edulcorante a individuos que realicen actividad física a una intensidad alta, moderada y sedentarios, para así poder medir la inducción de sistema antioxidante y el estado redox.

X. Referencias

Adéchián, S., Giardina, S., Rémond, D., Papet, I., Buonocore, D., Gaudichon, C., & Mosoni, L. (2009). Excessive Energy Intake Does Not Modify Fed-state Tissue Protein Synthesis Rates in Adult Rats. *Obesity*, 17(7), 1348-1355.

Ansari, J. A., Bhandari, U., Haque, S. E., & Pillai, K. K. (2012). Enhancement of antioxidant defense mechanism by pitavastatin and rosuvastatin on obesity-induced oxidative stress in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(1), 67-73.

Anton, S. D., Martin, C. K., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W. T., Geiselman, P. & Williamson, D. A. (2010). Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, 55(1), 37-43.

Aune, D., Chan, D. S., Lau, R., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., & Norat, T. (2011). Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *British Medical Journal*, 343, d6617.

Bao, S., Cao, Y., Fan, C., Fan, Y., Bai, S., Teng, W., & Shan, Z. (2014). Epigallocatechin gallate improves insulin signaling by decreasing toll-like receptor 4 (TLR4) activity in adipose tissues of high-fat diet rats. *Molecular nutrition & food research*, 58(4), 677-686.

Barquera, S., Hernandez-Barrera, L., Tolentino, M. L., Espinosa, J., Ng, S. W., Rivera, J. A. & Popkin, B. M. (2008). Energy intake from beverages is increasing among Mexican adolescents and adults. *The Journal of Nutrition*, 138(12), 2454-2461.

Basaga, H. S. (1990). Biochemical aspects of free radicals. *Biochemistry and Cell Biology*, 68(7-8), 989-998.

Bingham, S. A., Day, N. E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T. & Tjønneland, A. (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *The Lancet*, 361(9368), 1496-1501.

Bose, M., Hao, X., Ju, J., Husain, A., Park, S., Lambert, J. D. & Yang, C. S. (2007). Inhibition of tumorigenesis in Apc Min/+ mice by a combination of (-)-epigallocatechin-3-gallate and fish oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7695-7700.

Bose, M., Lambert, J. D., Ju, J., Reuhl, K. R., Shapses, S. A., & Yang, C. S. (2008). The major green tea polyphenol,(-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *The Journal of Nutrition*, 138(9), 1677-1683.

Brown, A. L., Lane, J., Coverly, J., Stocks, J., Jackson, S., Stephen, A., & Hendrickx, H. (2008). Effects of dietary supplementation with the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on insulin resistance and associated metabolic risk factors: randomized controlled trial. *British Journal of Nutrition*, 101(6), 886-894.

Brownell, K. D., Farley, T., Willett, W. C., Popkin, B. M., Chaloupka, F. J., Thompson, J. W. & Ludwig, D. S. (2009). The public health and economic benefits of taxing sugar-sweetened beverages. *New England Journal of Medicine*, 361(16), 1599-1605.

Byun, J. K., Yoon, B. Y., Jhun, J. Y., Oh, H. J., Kim, E. K., Min, J. K., & Cho, M. L. (2014). Epigallocatechin-3-gallate ameliorates both obesity and autoinflammatory arthritis aggravated by obesity by altering the balance among CD4+ T-cell subsets. *Immunology Letters*, 157(1), 51-59.

Catala-Niell, A., Estrany, M., Proenza, A., Gianotti, M., & Llado, I. (2008). Skeletal muscle and liver oxidative metabolism in response to a voluntary isocaloric intake of a high fat diet in male and female rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 22(1-4), 327-336.

Chang, C. S., Chang, Y. F., Liu, P. Y., Chen, C. Y., Tsai, Y. S., & Wu, C. H. (2012). Smoking, habitual tea drinking and metabolic syndrome in elderly men living in rural community: the Tianliao old people (TOP) study 02. *PLoS One*, 7(6), e38874.

Chang, H. C., Peng, C. H., Yeh, D. M., Kao, E. S., & Wang, C. J. (2014). *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits obesity and fat accumulation, and improves liver steatosis in humans. *Food & Function*, 5(4), 734-739.

Chang, J. C., Wu, M. C., Liu, I. M. & Cheng, J. T. (2005). Increase of insulin sensitivity by stevioside in fructose-rich chow-fed rats. *Hormone and Metabolic Research*. 37(10), 610-616.

Cossio-Bolaños, M., Gómez Campos, R., Vargas Vitoria, R., Fogaça, H., Tadeu, R., & Arruda, M. D. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), 2151-2156.

Dashwood, W. M., Orner, G. A. & Dashwood, R. H. (2002). Inhibition of β -catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H₂O₂ at physiologically relevant EGCG concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(3), 584-588.

Daza, C. H. (2002). La obesidad: un desorden metabólico de alto riesgo para la salud. *Colombia Médica*, 33(2).

DiMeglio, D. P. & Mattes, R. D. (2000). Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. *International Journal of Obesity*, 24(6), 794-800.

Faloia, E., Michetti, G., De Robertis, M., Luconi, M., Furlani, G., & Boscaro, M. (2012). Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. *Journal of nutrition and metabolism*, 2012.

Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, Á., Esquivel-Chirino, C. & Morales-González, J. A. (2011). Inflammation, oxidative stress, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3117-3132.

Gao, Z., Xu, Z., Hung, M. S., Lin, Y. C., Wang, T., Gong, M. & You, L. (2009). Promoter demethylation of WIF-1 by epigallocatechin-3-gallate in lung cancer cells. *Anticancer Research*, 29(6), 2025-2030.

Gregersen, S., Jeppesen, P. B., Holst, J. J. & Hermansen, K. (2004). Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism*, 53(1), 73-76.

Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(5), 367-377.

Gutteridge, J., & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 136-147.

Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I. & Scherer, P. E. (2008). The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 37(3), 753-768.

Hodin, R. A., Meng, S., Archer, S. & Tang, R. (1996). Cellular growth state differentially regulates enterocyte gene expression in butyrate-treated HT-29 cells. *The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(5), 647-653.

Houstis, N., Rosen, E. D. & Lander, E. S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, 440(7086), 944-948.

Hsieh, M. H., Chan, P., Sue, Y. M., Liu, J. C., Liang, T. H., Huang, T. Y. & Chen, Y. J. (2003). Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clinical Therapeutics*, 25(11), 2797-2808.

Hu, F. B. & Malik, V. S. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiology & Behavior*, 100(1), 47-54.

Huang, T. W., Chang, C. L., Kao, E. S., & Lin, J. H. (2015). Effect of Hibiscus sabdariffa extract on high fat diet-induced obesity and liver damage in hamsters. *Food & Nutrition Research*, 59(1), 29018.

Hünkar, T., Aktan, F., Ceylan, A., & Karasu, C. (2002). Effects of cod liver oil on tissue antioxidant pathways in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Cell Biochemistry and Function*, 20(4), 297-302.

Jou, J. & Techakehakij, W. (2012). International application of sugar-sweetened beverage (SSB) taxation in obesity reduction: factors that may influence policy effectiveness in country-specific contexts. *Health Policy*, 107(1), 83-90.

Kim, J., Zhang, X., Rieger-Christ, K. M., Summerhayes, I. C., Wazer, D. E., Paulson, K. E. & Yee, A. S. (2006). Suppression of Wnt signaling by the green tea compound (–)-epigallocatechin 3-gallate (EGCG) in invasive breast cancer cells requirement of the transcriptional repressor HBP1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), 10865-10875.

Kurahashi, N., Sasazuki, S., Iwasaki, M. & Inoue, M. (2008). Green tea consumption and prostate cancer risk in Japanese men: a prospective study. *American Journal of Epidemiology*, 167(1), 71-77.

Le Jian, M. D. & Binns, C. W. (2007). Tea and lycopene protect against prostate cancer. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 453-461.

Lee, S. J., Choi, S. K., & Seo, J. S. (2009). Grape skin improves antioxidant capacity in rats fed a high fat diet. *Nutrition Research and Practice*, 3(4), 279-285.

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D. & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11070-11075.

Luyckx, F. H., Lefebvre, P. J., & Scheen, A. J. (2000). Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes and Metabolism*, 26(2), 98-106.

Malik, V. S., Schulze, M. B. & Hu, F. B. (2006). Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(2), 274-288.

Marczuk-Krynicka, D., Hryniewiecki, T., Paluszak, J., Krauss, H., & Nowak, D. (2009). High Fat Content in Diets and Oxidative Stress in Livers of Non-Diabetic and Diabetic Rats. *Polish Journal of Environmental Studies*, 18(2), 249-253.

Maritim, A. C., Sanders, A., & Watkins, J. 3. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 24-38.

Maydata, A. G. (2002). Vino, polifenoles y protección a la salud. *Revista Cubana Aliment Nutr*, 16(2), 134-41.

McCullough, A. J. (2004). The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinics in Liver Disease*, 8(3), 521-533.

Meydani, M., & Hasan, S. T. (2010). Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients*, 2(7), 737-751.

Morales Clavijo, M., & Carvajal Garcés, C. F. (2010). Obesidad y resistencia a la leptina. *Gaceta Médica Boliviana*, 33(1), 63-68.

Mortensen, F. V., Langkilde, N. C., Joergensen, J. C. & Hesso, I. (1999). Short-chain fatty acids stimulate mucosal cell proliferation in the closed human rectum after Hartmann's procedure. *International Journal of Colorectal Disease*, 14(3), 150-154.

Mukamal, K. J., Alert, M., Maclure, M., Muller, J. E., & Mittleman, M. A. (2006). Tea consumption and infarct-related ventricular arrhythmias: the determinants of myocardial infarction onset study. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(6), 472-479.

Neilson, A., & Ferruzzi, M. (2012). Bioavailability and metabolism of bioactive compounds from foods. *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*, 407-423.

- Nguyen, D. M. & El-Serag, H. B. (2010). The epidemiology of obesity. *Gastroenterology Clinics of North America*, 39(1), 1-7.
- Okuda, M. H., Zemdegs, J. C., de Santana, A. A., Santamarina, A. B., Moreno, M. F., Hachul, A. C., & Oyama, L. M. (2014). Green tea extract improves high fat diet-induced hypothalamic inflammation, without affecting the serotonergic system. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(10), 1084-1089.
- Olorunnisola, O. S., Bradley, G., & Afolayan, A. J. (2012). Protective effect of *T. violacea* rhizome extract against hypercholesterolemia-induced oxidative stress in Wistar rats. *Molecules*, 17(5), 6033-6045.
- Pahlke, G., Ngiewih, Y., Kern, M., Jakobs, S., Marko, D. & Eisenbrand, G. (2006). Impact of quercetin and EGCG on key elements of the Wnt pathway in human colon carcinoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7075-7082.
- Paul, S., DeCastro, A. J., Lee, H. J., Smolarek, A. K., So, J. Y., Simi, B. & Suh, N. (2010). Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the β -catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 31(7), 1272-1278.
- Pegg, A. (2013). Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chemical Research in Toxicology*, 26(12):1782-800
- Pérez-Ramírez, I. F., Enciso-Moreno, J. A., Guevara-González, R. G., Gallegos-Corona, M. A., Loarca-Piña, G. & Reynoso-Camacho, R. (2016). Modulation of renal dysfunction by *Smilax cordifolia* and *Eryngium carlinae*, and their effect on kidney proteome in obese rats. *Journal of Functional Foods*, 20, 545-555.
- Popkin, B. M. (2012). Sugary beverages represent a threat to global health. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(12), 591-593.
- Prins, J. B., Niesler, C. U., Winterford, C. M., Bright, N. A., Siddle, K., O'Rahilly, S. & Cameron, D. P. (1997). Tumor necrosis factor- α induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes*, 46(12), 1939-1944.

Qin, B., Polansky, M. M., Harry, D., & Anderson, R. A. (2010). Green tea polyphenols improve cardiac muscle mRNA and protein levels of signal pathways related to insulin and lipid metabolism and inflammation in insulin-resistant rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(Sppl1):S14-S23.

Ransohoff, D. F. (2002). Fecal DNA tests for colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 346(24), 1912-1913.

Rivera, J. A., Muñoz-Hernández, O., Rosas-Peralta, M., Aguilar-Salinas, C. A., Popkin, B. M. & Willett, W. C. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 65(3), 208-237.

Romero-Martínez, M., Shamah-Levy, T., Franco-Núñez, A., Villalpando, S., Cuevas-Nasu, L., Gutiérrez, J. P. & Rivera-Dommarco, J. Á. (2013). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: diseño y cobertura. *Salud Pública de México*, 55, S332-S340.

Russell, W. R., Scobbie, L., Chesson, A., Richardson, A. J., Stewart, C. S., Duncan, S. H. & Duthie, G. G. (2008). Anti-inflammatory implications of the microbial transformation of dietary phenolic compounds. *Nutrition and Cancer*, 60(5), 636-642.

Schneeberger, M., Everard, A., Gómez-Valadés, A. G., Matamoros, S., Ramírez, S., Delzenne, N. M. & Cani, P. D. (2015). *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific Reports*, 5, 16643-16652.

Seo, D. B., Jeong, H. W., Cho, D., Lee, B. J., Lee, J. H., Choi, J. Y., ... & Lee, S. J. (2015). Fermented green tea extract alleviates obesity and related complications and alters gut microbiota composition in diet-induced obese mice. *Journal of Medicinal Food*, 18(5), 549-556.

Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzamelis, I., Yin, H. & Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 3015-3025.

Ślusarz, A., Shenouda, N. S., Sakla, M. S., Drenkhahn, S. K., Narula, A. S., MacDonald, R. S. & Lubahn, D. B. (2010). Common botanical compounds inhibit the hedgehog signaling pathway in prostate cancer. *Cancer Research*, 70(8), 3382-3390.

Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L., Griffen, S. C., Bremer, A. A., Graham, J. L. & McGahan, J. P. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1322-1334.

Stern, D. & Piernas, C. (2014). Caloric beverages were major sources of energy among children and adults in Mexico, 1999-2012. *The Journal of Nutrition*, 144(6), 949-956.

Sweeting, H. N. (2008). Gendered dimensions of obesity in childhood and adolescence. *Nutrition Journal*, 7(1), 1-15.

Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J. & Lochs, H. (1998). Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology*, 115(2), 281-286.

Tang, G. Q., Yan, T. Q., Guo, W., Ren, T. T., Peng, C. L., Zhao, H. & Han, X. (2010). (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis and suppresses proliferation by inhibiting the human Indian Hedgehog pathway in human chondrosarcoma cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136(8), 1179-1185.

Vartanian, L. R., Schwartz, M. B. & Brownell, K. D. (2007). Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Public Health*, 97(4), 667-675.

- Velmurugan, B., Singh, R. P., Kaul, N., Agarwal, R. & Agarwal, C. (2010). Dietary feeding of grape seed extract prevents intestinal tumorigenesis in APC min/+ mice. *Neoplasia*, 12(1), 95-102.
- Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X. & Louis, P. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 5(2), 220-230.
- Walters, W. A., Xu, Z. & Knight, R. (2014). Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *Letters*, 588(22), 4223-4233.
- Wattenberg, L. W. (1996). Chemoprevention of cancer. *Preventive Medicine*, 25(1), 44-45.
- Yang, C. S., Zhang, J., Zhang, L., Huang, J., & Wang, Y. (2016). Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea. *Molecular Nutrition & Food research*, 60(1), 160-174.
- Zhang, M. M., Cheng, J. Q., Xia, L., Lu, Y. R. & Wu, X. T. (2011). Monitoring intestinal microbiota profile: a promising method for the ultraearly detection of colorectal cancer. *Medical Hypotheses*, 76(5), 670-672.