

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE  
ALIMENTOS**

**“ELABORACIÓN DE BEBIDAS FUNCIONALES A BASE DE  
EXTRACTOS HERBALES Y SU EFECTO EN EL CONTROL  
DE LA OBESIDAD”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

QFB Julio César Rubio Rodríguez

DIRIGIDA POR

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, NOVIEMBRE DE 2015.



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

**ELABORACIÓN DE BEBIDAS FUNCIONALES A BASE DE EXTRACTOS  
HERBALES Y SU EFECTO EN EL CONTROL DE LA OBESIDAD**

**Tesis**

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

**Presenta:**

QFB Julio Cesar Rubio Rodríguez

**Dirigido por:**

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Presidente

Firma

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva  
Secretario

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Vocal

Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Suplente

Firma

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios  
Suplente

Firma

MSP. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

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

## RESUMEN

México presenta altas prevalencias de obesidad debido al elevado consumo de carbohidratos y grasas. Se ha reportado que algunas infusiones como jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), hierbabuena (*Mentha piperita*), cocolmecha (*Smitax cordifolia*) y hierba del sapo (*Eryngium carlinae*) disminuyen el peso corporal y mejoran las complicaciones asociadas a la obesidad. El objetivo del estudio fue elaborar bebidas funcionales con las infusiones anteriormente mencionadas y evaluar su efecto en el control de la obesidad. Se utilizaron diferentes proporciones de infusiones, edulcorantes (estevia y glucosa) y conservadores. Las bebidas fueron aceptadas sensorialmente. La bebida B (base colcomeca/té verde/hierbabuena) presentó mayor concentración de compuestos fenólicos ( $106.42 \pm 8.7$  mgEq. Ag/mL), flavonoides ( $15.43 \pm 4.46$  mgEq. catequina/mL) y un mayor capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) y de inhibición de enzimas digestivas. La bebida A presentó mayor concentración de compuestos antioxidantes comparado con algunas bebidas comerciales a base de extracto natural de jamaica. Se realizaron estudios con ratas Wistar alimentadas durante 4 meses con una dieta hipercalórica, estos animales consumieron *ad libitum* las bebidas como tratamiento. La bebidas B disminuyó la ganancia de peso hasta en un 10.3%. La bebida A (base de jamaica) y B disminuyeron los triglicéridos en suero en un 13.8% y 22.5% respectivamente. La bebida A produce este efecto debido a una mayor eliminación de triglicéridos en la dieta. Las bebidas A y B disminuyeron el grado de esteatosis hepática respecto al grupo obeso. Los resultados sugieren que las bebidas A y B podrían ayudar a disminuir la obesidad y sus complicaciones asociadas.

## ABSTRACT

Mexico has high prevalence of obesity due to high consumption of carbohydrates and fats. It has been reported that some teas like roselle (*Hibiscus sabdariffa*), peppermint (*Mentha piperita*), cocolmecca (*Smitax cordifolia*) and grass Toad (*Eryngium carlinae*) decrease body weight and improve complications associated with obesity. The aim of this work was to develop functional beverages with the aforementioned infusions and evaluate its effect in controlling obesity. Different proportions of teas, sweeteners (stevia and glucose) and conservatives were used. Beverages were accepted sensory. Drink B (cocolmecca / green tea / peppermint) had higher concentration of phenolic compounds ( $106.42 \pm 8.7$  mgeq. Acid galic / mL), flavonoids ( $15.43 \pm 4.46$  mgeq. Catechin / mL) and a higher antioxidant capacity (DPPH and ABTS) and inhibition of digestive enzymes. Beverage A (roselle) had higher concentration of antioxidant compounds compared to some commercial beverages based on natural roselle extract. Studies in Wistar rats fed during 4 months with a high calorie diet were performed, these animals consumed *ad libitum* beverages such treatment. The beverage B decreased weight gain up to 10.3%. Beverage A (roselle) and B decreased serum triglycerides by 13.8% and 22.5% respectively. A beverage produces this effect due to increased disposal of dietary triglycerides. Beverages A and B decreased the degree of hepatic stasis regarding the obese group. The results suggest that the beverages A and B may help reduce obesity and its associated complications.

## AGRADECIMIENTOS

*A Universidad Autónoma de Querétaro por los todos años de enseñanza y experiencias que me han ayudado a crecer profesionalmente.*

*A CONACyT por el apoyo brindado con el cual me fue posible estudiar un posgrado.*

*A la Dra. Rosalía Reynoso por todos los años en los que he recibido su apoyo, tiempo y dedicación, lo cual me ha permitido crecer de manera personal y profesional. Le agradezco también por ser siempre una guía en mi camino y ayudarme a dar lo mejor de mí. Por tenerme la confianza y ayudarme a superar tantos muros a través de los años.*

*Al Dr. Eduardo Castaño Tostado por sus consejos que los cuales sin ellos no hubiera podido concluir mi proyecto, también por ser un ejemplo de disciplina y constancia tanto de manera profesional como personal.*

*Al Dr. Mateo Mercado Silva por sus consejos y enseñanzas que me ayudaron durante mi estancia en el posgrado.*

*A la Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios por sus consejos y ayuda durante el desarrollo de mi proyecto, por ensuciarme las manos conmigo.*

*A la Dra. Silvia Lorena Amaya Llano por ayudarme cuando fue necesario y por brindarme su apoyo.*

*A Carmelita y Laurita por apoyarme siempre en todos, todos, todos los tramites que necesite durante estos años, por atenderme siempre con una sonrisa independientemente si tuvieron un mal día.*

## DEDICATORIAS

A **mis padres** Cristo Rubio y Guadalupe Rodríguez que siempre que los he necesitado han estado conmigo brindándome su apoyo. A ellos que además de darme la vida me han forjado como individuo, que han estado a mi lado para levantarme en tantas caídas. A ellos que siempre han creído en mí. A ellos que desde mis primeros pasos han estado presentes para guiarme y enseñándome la importancia de la familia. A mi mamá no tengo manera de agradecerle por siempre consentirme y ayudarme aun cuando estuviera cansada. A mi papá por enseñarme dedicación y porque ha procurado toda mi vida que no me falte nada para alcanzar mis metas. Nuevamente gracias por todo....los amo.

A **mi compañera de vida** Lucero Canto por apoyarme en esta etapa de mi vida, siempre alentándome cuando tuve problemas de esos donde el problema está dentro de nosotros, aguantando muchas veces mi mal genio y soportando muchas otras veces el no vernos lo suficiente. A ella que me ayudo a olvidarme y distraerme en los momentos de angustia y desesperación. Tantos años que llevamos juntos y aun nos divertimos y disfrutamos como al principio, pasaran los años y seguiremos envejeciendo juntos. Te agradezco cada día, cada momento que has estado a mí lado inspirándome a ser una mejor persona....TE AMO

A **mis hermanos** Mariana y Cristo Rubio que siempre estuvieron a mi lado, que cuando necesitaba hablar con alguien siempre estuvieron conmigo. A mi hermanito querido que amo, mi compañero de juego, gracias por estar en los momentos más importantes de mi vida y apoyarme de muchas maneras, nunca cambiaría nada de lo que hemos vivido, eres mi mejor amigo y confidente. A mi hermana que siempre presume lo que hago con sus amigos porque nunca ha dejado de creer en mí y en lo que puedo llegar hacer.

A mis amigos y compañeros de la maestría a ellos con los que compartí esta etapa de mi vida. A Dianita por sus consejos y ser siempre una voz de consciencia para mí. A Geraldinho mi amigo de relajo con quien me divertí tanto y tanto platicando. A Cesar por siempre recordarnos no estresarnos de más, Sarita gracias por todo eres sin duda muy especial para mí. A Rocío por apoyarnos y alegrar el laboratorio. A Fany por tener siempre una buena actitud y contagiarnos con ella. A Jenny por considerarme siempre y contarme de tu vida. A Dalia siempre que he necesitado algo me has ayudado y muchas veces sin pedir ayuda. A Magda quien a pesar de tener que hacer mil cosas en el día cuando la necesite siempre me apoyo y escucho. A Marely aún recuerdo la primera vez que te vi eras tan tranquila y callada; te convertiste en parte fundamental del laboratorio siempre sonriendo y

*ayudando a todos. A Mayris mi hermana quien siempre me apoyo en mis experimentos, demostrándome lo importante que es la disciplina y dedicación, A Pame que me ayudo con su voz del conocimiento. A “Don Resveratrol” mejor conocido como Beto por esos buenos momentos y consejos que me han ayudado a salir adelante durante esta etapa, gracias amigo. A todos los integrantes de mi generación, a todos ustedes quiero también agradecerles por los buenos momentos que hemos pasado y por todo lo que me han aguantado: Omar a quien nunca vendí, Francisco “cross-fit”, al “papi” digo Javier, Yedaiel el de la FAO, Joshua, Adriana mi colega QFB, Carlitos, Ivanita Eztevelana, Ricardo el monje, Paty, Mary, Dr. Granados, Nataly, Alí, Wendy la dueña de LA-LA y Edelí; sin lugar a duda creo que somos de las mejores generaciones que ha tenido este posgrado ya que siempre nos apoyamos uno a otros.*

## ÍNDICE GENERAL

### CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIAS.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	2
2.1  Obesidad y sobrepeso.....	2
2.1.1  Epidemiología.....	2
2.2  Metabolismo y obesidad.....	3
2.3  Complicaciones del sobrepeso y la obesidad.....	4
2.3.1  Resistencia a la insulina y diabetes.....	5
2.3.2  Esteatosis.....	6
2.3.3  Daño renal.....	7
2.4  Implicaciones terapéuticas.....	8
2.5  Infusiones o extractos herbales.....	10
2.5.1  Flor de Jamaica.....	11
2.5.2  Hierbabuena.....	13
2.5.3  Cocolmecha.....	13
2.5.4  Hierba del sapo.....	14
2.6  Edulcorantes y las bebidas hipocalóricas.....	14
III. Justificación.....	16
IV. Objetivos.....	18
4.1  Objetivo general.....	18
4.2  Objetivos específicos.....	18
V. Materiales y métodos.....	19



5.1	Materiales .....	19
5.1.1	Vegetal.....	19
5.1.2	Biológico.....	19
5.2	Métodos.....	19
5.2.1	Preparación de los extractos.....	19
5.2.2	Formulación de las bebidas .....	20
5.2.2.1	Formulación bebida A.....	20
5.2.2.2	Formulación bebida B.....	21
5.2.2.3	Formulación bebida C.....	21
5.2.3	Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de las bebidas .....	22
5.2.3.1	Parámetros de color .....	22
5.2.3.2	pH.....	22
5.2.3.3	Acidez titulable .....	23
5.2.3.4	Grados brix .....	23
5.2.4	Caracterización nutracéutica de las bebidas funcionales.....	23
5.2.4.1	Cuantificación de fenoles totales .....	23
5.2.4.2	Cuantificación de flavonoides totales.....	24
5.2.4.3	Cuantificación de antocianinas monoméricas.....	24
5.2.5	Evaluación sensorial de los extractos herbales.....	25
5.2.6	Evaluación <i>in vitro</i> de las propiedades nutracéuticas de los extractos herbales .....	25
5.2.6.1	Capacidad de atrapamiento del radical ABTS .....	25
5.2.6.2	Capacidad de atrapamiento del radical DPPH .....	26
5.2.6.3	Capacidad de inhibición de la $\alpha$ -amilasa .....	26
5.2.6.4	Capacidad de inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa .....	26
5.2.6.5	Capacidad de inhibición de la actividad de la enzima lipasa de lipoproteína .....	27
5.2.7	Vida de anaquel .....	27
5.2.8	Evaluación <i>in vivo</i> de las bebidas para el control de la obesidad y sus complicaciones.....	28
5.2.8.1	Grupos de experimentación.....	28

5.2.8.2	Determinación del perfil lipídico sérico .....	29
5.2.8.3	Cuantificación de triglicéridos en hígado y heces .....	29
5.2.8.4	Evaluación de hipertrofia del tejido adiposo .....	30
5.2.8.5	Cuantificación de moléculas relacionadas con resistencia a la insulina e inflamación.....	30
5.2.9	Evaluación de daño hepático .....	30
5.3	Evaluación de esteatosis hepática.....	31
5.4	Análisis estadístico .....	31
VI.	Resultados y discusiones .....	32
6.1	Formulación de bebidas .....	32
6.1.1	Formulación de la bebida A.....	32
6.1.2	Formulación de la bebida B.....	33
6.1.3	Formulación de la bebida C .....	35
6.1.4	Formulación de bebidas funcionales.....	36
6.2	Caracterización fisicoquímica .....	37
6.3	Caracterización nutracéutica .....	38
6.3.1	Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides .....	38
6.3.2	Cuantificación antocianinas.....	39
6.3.3	Capacidad antioxidante.....	40
6.4	Pruebas de vida de anaquel .....	41
6.4.1	Parámetros microbiológicos .....	42
6.4.2	Parámetros fisicoquímicos y compuestos fenólicos .....	42
6.4.3	Inhibición de enzimas de digestión .....	45
6.5	Efecto del consumo de las bebidas formuladas con extractos herbales sobre el control de la obesidad y sus complicaciones .....	46
6.5.1	Consumo de alimento .....	46
6.5.2	Peso corporal .....	48
6.5.3	Perfil lipídico.....	50
6.5.4	Triglicéridos en heces .....	51
6.5.5	Resistencia a la insulina.....	52
6.5.6	Evaluación de daño hepático .....	55

6.5.6.1	Triglicéridos en hígado .....	55
6.5.6.2	Actividad de enzimas relacionadas con daño hepático .....	57
6.5.6.3	Estudio histopatológico de hígado.....	58
VII.	Conclusiones.....	60
VIII.	Referencias bibliográficas .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cambios metabólicos inducidos por una dieta alta en grasa y fructosa	3
2	Desarrollo de esteatosis	6
3	Cambios en el gasto en alimentos entre 1986 y 1998	8
4	Consumo energético diario de bebidas por grupo de edad en México	9
5	Ganancia peso corporal de animales obesos tratados con extractos herbales	10
6	Escala hedónica de nueve puntos	24
7	Evaluación sensorial bebida A	32
8	Evaluación sensorial bebida B	33
9	Evaluación sensorial bebida C	35
10	Concentración de compuestos polifenólicos y flavonoides	38
11	Comparación de antocianinas respecto a bebidas comerciales	39
12	Consumo de alimento de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa y bebidas funcionales	46
13	Peso corporal de ratas con obesidad inducida con una dieta alta en grasa y fructosa y bebidas funcionales	47
14	Efecto de las bebidas sobre el área bajo la curva de ganancia de peso corporal.	48
15	Efecto de las bebidas sobre la concentración de triglicéridos en heces de los animales de experimentación	49
16	Concentración de IL-6 en suero	53
17	Efecto de las bebidas sobre la concentración de triglicéridos en hígado de los animales obesos	54
18	Microfotografías de tejido hepático de los grupos de experimentación	58

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Relación peso volumen de los extractos del proceso y tiempo de extracción.	18
2	Diseño factorial para la formulación de la bebida A	19
3	Diseño factorial para la formulación de la bebida B	20
4	Diseño en mezclas para la formulación de la bebida C	21
5	Especificaciones microbiológicas para bebidas saborizadas no alcohólicas y bebidas adicionadas con cafeína	26
6	Contenido nutrimental de las dietas del estudio <i>in vivo</i>	27
7	Tratamientos por grupo del estudio <i>in vivo</i>	27
8	Factores incluidos en la elaboración de la bebida B y su evaluación sensorial	34
9	Componentes las bebidas funcionales	34
10	Parámetros fisicoquímicos de las bebidas	36
11	Capacidad antioxidante de las bebidas funcionales	40
12	Parámetros microbiológicos de las bebidas después de cinco semanas de almacenamiento	41
13	Parámetros fisicoquímicos y compuestos fenólicos de la bebida A durante las pruebas de estabilidad a 25 °C	42
14	Parámetros fisicoquímicos y compuestos fenólicos de la bebida B durante las pruebas de estabilidad a 25 °C	43
15	Parámetros fisicoquímicos y compuestos fenólicos de la bebida C durante las pruebas de estabilidad a 25 °C	43
16	Efecto de las bebidas sobre el porcentaje inhibición de enzimas de digestión	45
17	Efecto de las bebidas sobre el perfil lipídico de los animales obesos	49
18	Efecto de las bebidas sobre la resistencia a la insulina y	52

	marcadores de inflamación en suero de los animales en estudio	
19	Actividad de enzimas de daño hepático de animales tratados con las diferentes bebidas funcionales	56

## I. Introducción

El mexicano en los últimos años ha modificado su patrón dietario, incrementando el consumo de alimentos altos en calorías, compuestos principalmente de grasas y azúcares refinados. Y respecto a las bebidas, México se encuentra dentro de los principales consumidores de refrescos, obteniendo hasta un 20% de las calorías diarias por el consumo de bebidas hipercalóricas (Rivera, 2008).

El sobrepeso y la obesidad están relacionados con el aumento de grasa corporal causando un desequilibrio bioquímico del metabolismo en el organismo. La insulina debido a su acción activadora de la lipasa de la lipoproteína favorece en los adipocitos, el almacén de triglicéridos. Esto produce un aumento en tamaño y número de adipocitos y por lo tanto, un incremento en la secreción de proteínas conocidas como citocinas proinflamatorias, moléculas relacionadas con el desarrollo de complicaciones de la obesidad, como la diabetes y alteraciones cardiovasculares.

Por lo anterior, la prevención y el control del sobrepeso y la obesidad son primordiales para disminuir los problemas de salud que enfrenta en la actualidad la población mexicana. Como estrategia para alcanzar este objetivo se busca elaborar productos bajos en calorías y con efectos benéficos adicionales a la salud que puedan disminuir los problemas derivados del sobrepeso y la obesidad. Por lo tanto, en el presente estudio se desarrollaron bebidas bajas en calorías, elaboradas con extractos naturales de plantas de la medicina tradicional mexicana a las cuales se les han atribuido propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiobesigénicas, como la hierbabuena (*Mentha piperita*), la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y cocolmecha (*Smilax cordifolia*) entre otras. Adicional a los beneficios anteriormente mencionados, es importante que estos productos sean aceptados por el

consumidor y que cumplan con las especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas establecidas por la NOM-218-SSA1-2011 para bebidas.

## **II. Antecedentes**

### **2.1 Obesidad y sobrepeso**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. La relación entre peso y la talla se define como el índice de masa corporal (IMC), el cual es un indicador simple que ayuda a identificar y clasificar al sobrepeso y la obesidad en los adultos. Para la OMS, un IMC igual o superior a 25 determina sobrepeso mientras que un IMC igual o superior a 30 determina obesidad, misma definición que utiliza la NORMA Oficial Mexicana (NOM-008-SSA3-2010) para la clasificación integral del peso corporal (OMS, 2012).

La obesidad se origina por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, el exceso de energía es transformado en triglicéridos y almacenado en los adipocitos, los cuales pueden aumentar en tamaño, en número o ambos. Se ha reportado que el contenido de grasa visceral representa un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes tipo 2 e hipertensión (Manzur *et al.*, 2010).

#### **2.1.1 Epidemiología**

La obesidad y sobrepeso se ha 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. Respecto a la población infantil y adolescente, el 34% de los niños de 5 a 11 años tienen sobrepeso u obesidad, además se reporta una



prevalencia de sobrepeso de 34.12% en hombres y 35.8% en mujeres en un rango de edad de 13 a 19 años (ENSANUT, 2012).

## **2.2 Metabolismo y obesidad**

El organismo tiene como primer objetivo ante el consumo de alimentos, cubrir sus necesidades energéticas, sin embargo, 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, en donde la lipasa de la lipoproteína (LPL) hidroliza a las lipoproteínas liberando ácidos grasos libres los cuales se transportan y almacenan en los adipocitos, re esterificándose y formando nuevamente triglicéridos (Steinberger *et al.* 2009).

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 TAG en el tejido adiposo y por lo tanto, la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos (Figura 1) (Eckel y Grundy, 2006).

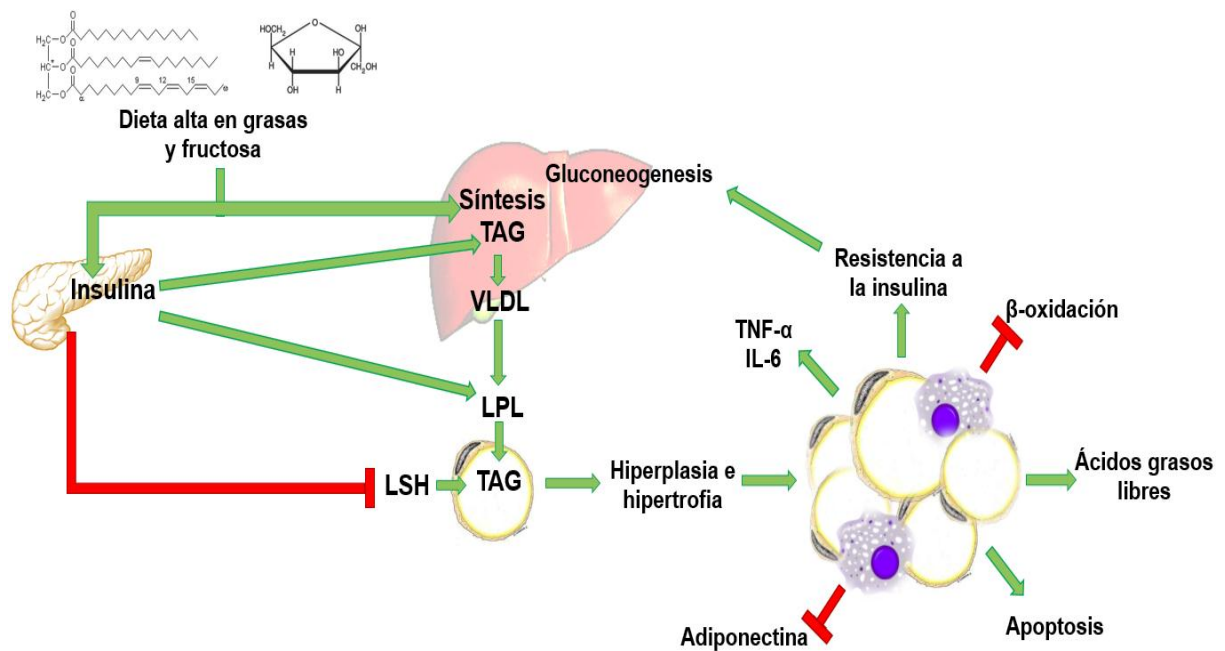


Figura 1. Cambios metabólicos inducidos por una dieta alta en grasa y fructosa

### 2.3 Complicaciones del sobrepeso y la obesidad

La obesidad y el sobrepeso desencadenan un estado de inflamación que se vincula con el desarrollo de enfermedades metabólicas como diabetes tipo 2 e hipertensión (Jakobsdosttir *et al.*, 2013).

Como ya se mencionó un exceso en el consumo de energía tiene como consecuencia la hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo el cual se encuentra constituido por adipocitos, preadipocitos, células inmunológicas y células endoteliales. Esta alteración del tejido adiposo provoca un estado de inflamación derivado de la reducción del abastecimiento de sangre a los adipocitos, y por lo tanto un inadecuado suministro de oxígeno, promoviendo necrosis, infiltración de macrófagos y un aumento en la producción de factores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), y la interleucina-6 (IL-6), las cuales están relacionadas con la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa. Y por otro

lado, disminuye la producción de la adiponectina, una citocina exclusiva del tejido adiposo que ejerce un efecto protector contra la inflamación y la resistencia a la insulina (Halberg *et al.*, 2008; Fernández-Sánchez *et al.*, 2011; Suganami *et al.*, 2012).

Otra proteína inflamatoria es la proteína C reactiva (CRP), la cual es sintetizada por hepatocitos y células del endotelio vascular la cual durante procesos inflamatorios incrementa la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 (Molécula de adhesión intercelular), VCAM-1 (Molécula de adhesión vascular) y proteínas quimioatrayentes de monocitos. Por lo tanto, forma parte del proceso de disfunción endotelial vascular relacionado con aterosclerosis. Se ha reportado que la CRP aumenta durante procesos inflamatorios como la obesidad donde incrementan las citocinas IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$  (Maiz, 2005; Amezcua, 2007).

### **2.3.1 Resistencia a la insulina y diabetes**

Durante la inflamación en el tejido adiposo se estimula la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6, ambas citocinas fosforilan en residuos de serina y treonina al substrato del receptor de insulina (IRS-1), esto produce alteraciones en la cascada de señalización de la insulina, generando problemas como la resistencia a la insulina que posteriormente puede ocasionar diabetes tipo 2, esta alteración se manifiesta como un trastorno metabólico que cursa con hiperglucemia a causa del inadecuado uso de la insulina. La diabetes tipo 2 tiene una prevalencia del 90% de los casos reportados de diabetes a nivel mundial (Eckel y Grundy, 2006; American Heart Association, 2012).

Debido a la resistencia a la insulina, el hígado activa la síntesis de glucosa mediante la gluconeogénesis, aumentando de esta manera los niveles plasmáticos de glucosa y generando que las células  $\beta$  pancreáticas, las cuales son las encargadas de secretar insulina, aumenten la secreción de esta hormona. Este

estado de hiperinsulinemia en el páncreas puede generar un proceso de oxidación provocando la apoptosis de las células  $\beta$  pancreáticas, y por lo tanto una menor concentración de insulina (Eckel y Grundy, 2006).

La de hiperglucemia que se presenta en un estado de resistencia a la insulina, incrementan la producción de productos finales de glucosilación que son el resultado de la reacción del grupo carbonilo de glucosa y el grupo amino terminal de proteínas y aminoácidos. De este modo se producen moléculas modificadas química y biológicamente, capaces de ocasionar graves daños al organismo. Estos productos de la glucosilación son producidos por las células endoteliales y liberados a la circulación donde se unen a receptores de las mismas células endoteliales, células mesangiales, glomerulares y macrófagos, donde incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales activan al Factor Nuclear Kappa-b (NF- $\kappa$ b), el cual promueve la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  (Karasu, 2010; Giacco y Browlee, 2010).

### **2.3.2 Esteatosis**

La esteatosis hepática o hígado graso no alcohólico es la acumulación de vacuolas de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos, este exceso puede ser ocasionado por diferentes mecanismos; mayor consumo de grasas en la dieta, liberación de ácidos grasos del tejido adiposo, ya que la lipasa sensible a la hormona es activada debido a la resistencia a la insulina provocando el aumento de lipólisis en el tejido adiposo y liberación de ácidos grasos. Así mismo en la esteatosis se incrementa la síntesis de *novo* y disminución de la oxidación de estos. Esto se ha relacionado con el estado de hiperinsulinemia que provoca una mayor lipogénesis de *novo* (Nagle *et al.*, 2009)

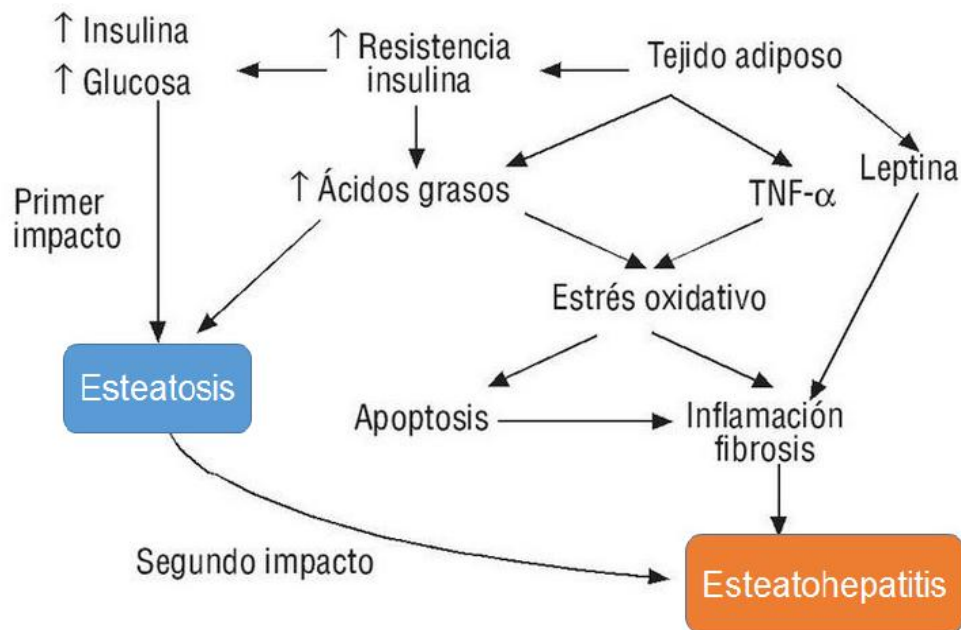


Figura 2. Desarrollo de esteatosis (López-Capapé *et al.*, 2009)

La esteatosis simple se caracteriza por ausencia de fibrosis y necrosis siendo un estado reversible, pero debido a la inflamación crónica durante el sobrepeso y obesidad, y la continua acumulación de grasas en el hígado puede desarrollarse fibrosis y necrosis dando lugar a la esteatohepatitis y posteriormente a cirrosis (Burt y Mutton, 1998) (Figura 2).

### 2.3.3 Daño renal

El sobrepeso y la obesidad están considerados como factores de predisposición a daño renal. Existen diferentes etapas dentro de la enfermedad renal, esta comienza con una ligera excreción de albúmina por la orina, etapa denominada microalbuminuria, siendo el valor de microalbumina marcador de daño temprano. La siguiente etapa se caracteriza por un aumento en la excreción de albúmina (macroalbuminuria o proteinuria), la presencia de grandes cantidades de proteína en la orina es evidencia de una disfunción renal la cual progresa a

enfermedad crónica (Jafar *et al.*, 2003). Las principales alteraciones durante la enfermedad renal son la glomeruloesclerosis, alteración caracterizada por la cicatrización del tejido glomerular afectando la filtración de los riñones y aumentando la pérdida de proteínas en orina (proteinuria); fibrosis tubulointersticial, inflamación de estructuras tubulares y aumento de matriz intersticial (Elmarakby *et al.*, 2010).

En condición de sobrepeso, se incrementan los niveles renales de ácidos grasos libres, triacilglicéridos y colesterol, promoviendo un efecto lipotóxico debido en parte a la síntesis de diacilglicéridos y ceramidas, los cuales son mediadores de apoptosis (Jiang *et al.*, 2005). La insulina y la leptina, ambas incrementadas en el sobrepeso y la obesidad, están relacionadas con el aumento de factores de crecimiento como TGF-B y el aumento de moléculas como colágeno y fibronectina relacionadas al desarrollo de glomeruloesclerosis.

## **2.4 Implicaciones terapéuticas**

La prevención de la obesidad es un punto medular en la prevención del desarrollo de otras enfermedades metabólicas como diabetes mellitus tipo 2 así como enfermedades cardiovasculares. La Secretaría de Salud recomienda el consumo de alimentos con bajo contenido calórico, así como, un alto consumo de compuestos antioxidantes, tales como las vitaminas A, C y E, compuestos fenólicos como flavonoides, entre otros; debido a su relación con la reducción del estrés oxidativo y obesidad (SSA, 2008).

Sin embargo, actualmente México se caracteriza por el consumo de dietas con un alto valor calórico, y la disminución en el grado de actividad física, lo cual se ha documentado desde hace algunos años, donde la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares en 1998 describe el incremento en el porcentaje de alimentos ricos en carbohidratos refinados, mientras que se reporta una disminución del consumo de frutas, vegetales, carnes y lácteos (Figura 3) (Secretaría de Salud, 2006).

PORCENTAJE DE CAMBIO

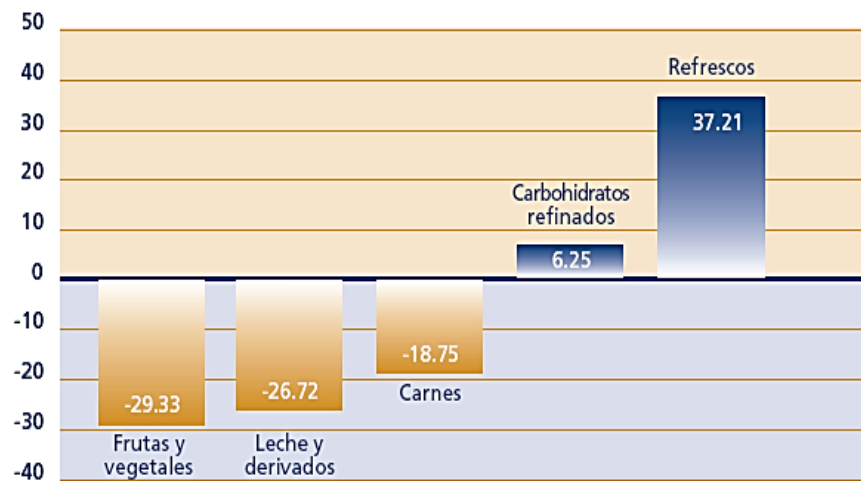


Figura 1. Cambios en el gasto en alimentos entre 1986 y 1998 (Secretaría de Salud, 2006).

La Figura 4 se muestra el patrón de consumo de bebidas en México, dividido por diferentes grupos de edad. Todos los grupos de edad presentan un elevado consumo de bebidas con un aporte energético alto, siendo los refrescos (carbonatados y no carbonatados) la bebida más consumida seguida por aguas frescas o con jugo.

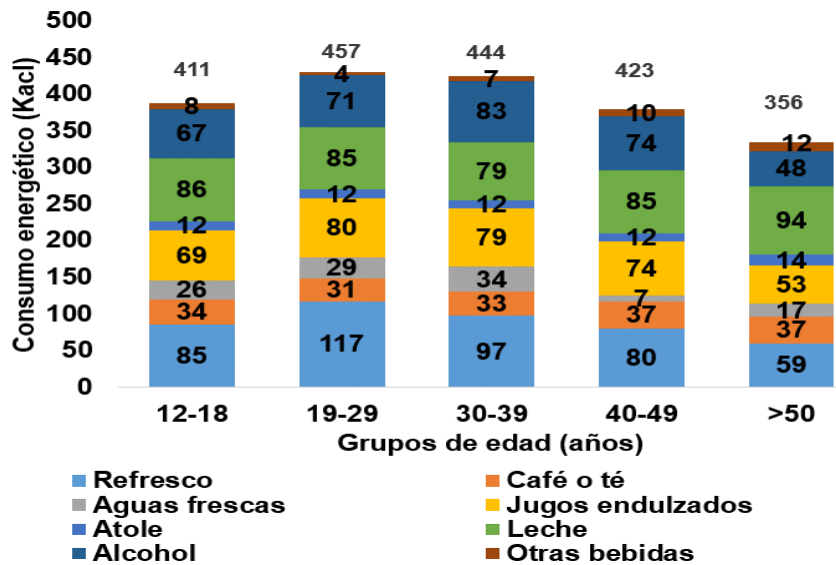


Figura 4. Consumo energético diario de bebidas por grupo de edad en México (2006) (Rivera *et al.*, 2008)

## 2.5 Infusiones o extractos herbales

En México, el aumento en el consumo de infusiones es reciente, ya que se ha reportado que muchas de estos materiales vegetales producen propiedades benéficas para la salud. Se ha reportado que varias hierbas han sido usadas para tratar alteraciones producidas por la obesidad, como desordenes relacionadas con estrés oxidativo e inflamación.

Pérez (2013), demostró en un modelo *in vivo* con ratas tipo wistar alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa, y tratados con infusiones de diferentes plantas presentaron una disminución en la ganancia de peso corporal respecto al control obeso, siendo los extractos de jamaica, hierbabuena y cocolmecca los que promovieron menor ganancia de peso (Figura 5).



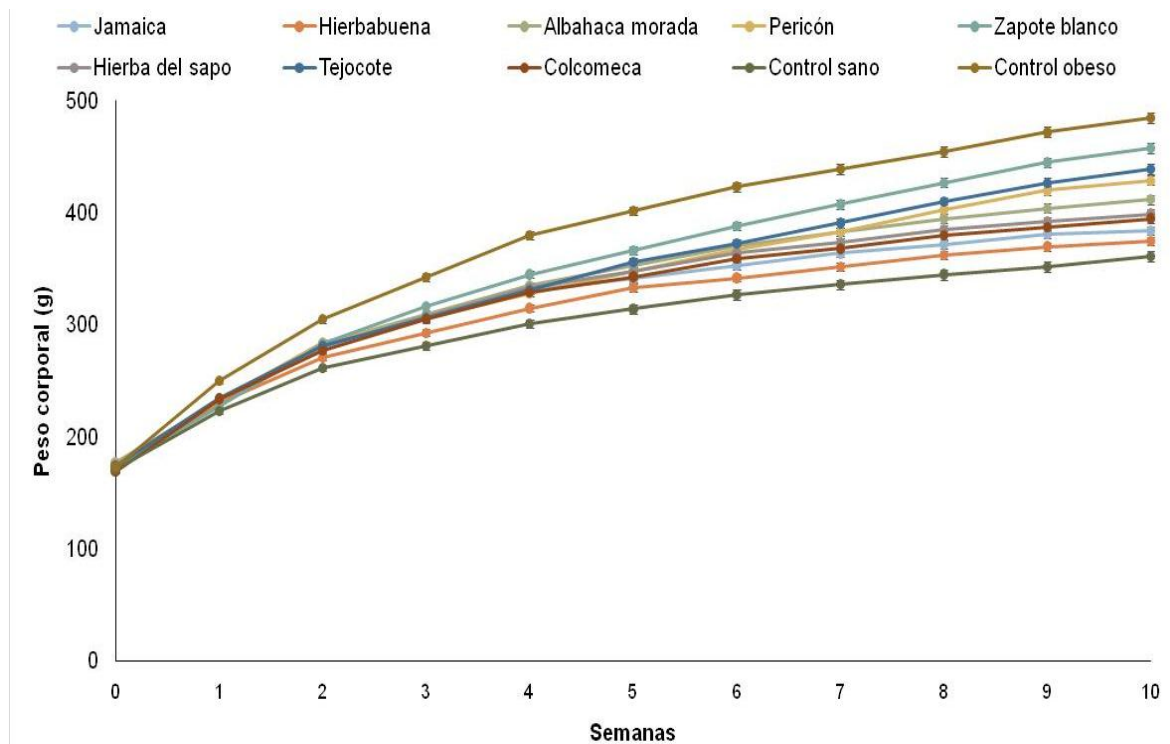


Figura 5. Ganancia de peso corporal de animales obesos tratados con extractos herbales (Pérez, 2013 datos sin publicar).

### 2.5.1 Flor de Jamaica

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).

Las infusiones de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es una de las más estudiadas debido a sus efectos benéficos a la salud. Se ha reportado que disminuye la oxidación de la LDL *in vitro*. Estudios *in vivo*, realizados con conejos alimentados por 10 semanas con una dieta alta en colesterol y extracto de Jamaica como tratamiento, se observó una reducción de los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y LDL, así como, una reducción de aterosclerosis, demostrado mediante estudios histopatológicos (Chen *et al.*, 2003).

Diversos estudios reportan que extractos acuosos de esta planta mejoran la hipertensión, ya que éstos disminuyeron los niveles de presión arterial en individuos pre-hipertensos e hipertensos (Hopkins *et al.*, 2013). Mazoffari *et al.* (2009), reportaron que pacientes con diabetes tipo 2 que fueron tratados diariamente con dos tazas de extracto de jamaica (4 g/día) por un mes, disminuyeron de manera significativa sus niveles de colesterol LDL, además de incrementar la concentración de HDL, sugiriendo un efecto cardioprotector.

En un estudio con la administración de un extracto acuoso de Jamaica por un periodo de 4 semanas a ratas hipertensas y a pacientes con síndrome metabólico, mostraron disminución de la presión arterial, este efecto se asoció a la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (Joven *et al.*, 2014).

Por otro lado, también se ha demostrado un efecto en la reducción en las concentración plasmática de creatinina y urea en de ratas tratadas con una dosis de 50 mg/kg de peso de extracto de Jamaica durante 28 días (Olatunji *et al.*, 2012).

La flor de jamaica contiene ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y polifenoles, como las antocianinas delfinidina-3-glucósido y la cianidina-3-glucósido, a todos estos compuestos antioxidantes se les atribuyen sus efectos antiinflamatorios, cardioprotectores, reguladores de colesterol y presión arterial (Al-Bradeldín *et al.*, 2005; Mamadou *et al.*, 2009; McKay *et al.*, 2010; Kuriyan *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 por kg de peso 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).

### **2.5.2 Hierbabuena**

La hierbabuena (*Mentha piperita*) es una planta más relacionada con productos de confitería o gastronomía, sin embargo, estudios con extractos han reportado que éstos reducen de manera significativa los niveles de glucosa, triacilglicéridos, colesterol total y LDL; así mismo, dichos extractos tienen la capacidad de incrementar 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, a estos compuestos también se les ha relacionado con la inhibición de la peroxidación lipídica en ratas diabéticas (Dorman *et al.*, 2009; Sharafi *et al.*, 2010; Barbalho *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2012).

Mani *et al.* (2011) reportaron una disminución de los niveles séricos de glucosa, colesterol, triglicéridos, así como, del índice aterogénico por el consumo de un extracto acuoso de esta planta en ratas con una dieta alta en fructosa, también reportaron un aumento en la concentración de colesterol HDL.

### **2.5.3 Cocolmecca**

Cocolmecca (*Smilax cordifolia*) es una planta que se cultiva en el estado de Tabasco, donde los pobladores prepararan una infusión de su raíz, la cual se recomienda para disminuir el peso corporal y para mejorar la circulación sanguínea. Actualmente no hay estudios sobre esta raíz o derivados, sin embargo, se ha reportado que Guduchi (*Tinospora cordifolia*), una planta de la India que

pertenece a la misma familia de cocolmea disminuye la síntesis de TNF- $\alpha$  e IL-1 en macrófagos de ratones (Spelman *et al.*, 2006).

#### **2.5.4 Hierba del sapo**

La hierba del sapo (*Eryngium carlinae*) es una planta a la que la medicina tradicional le ha atribuido efectos curativos para distintas afecciones como disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos, así como para el control de la hipertensión, diabetes y arteriosclerosis; siendo utilizada principalmente por su efecto hipocolesterolemico. Estudios reportan que la administración de extracto acuoso a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal disminuyó en un 9% el colesterol sérico en ratones alimentados con una dieta alta en colesterol (Vázquez *et al.*, 2006). Noriega-Cisneiros *et al.* (2012) reportaron que el consumo por 40 días de extracto etanólico (30 mg/kg de peso corporal) por ratas tipo Wistar con diabetes inducida por estreptozotocina, mostraron menores niveles séricos de glucosa, creatinina, ácido úrico, colesterol total y triglicéridos respecto al control diabético.

#### **2.6 Edulcorantes y las bebidas hipocalóricas**

El alto consumo de bebidas azucaradas en México nos sitúa como el primer consumidor de refresco en el mundo y los efectos negativos de los edulcorantes como la fructosa se ha relacionado con el desarrollo de la resistencia a la insulina, hígado graso y de diabetes tipo 2 (Rivera *et al.*, 2013).

Por lo tanto, se ha planteado utilizar edulcorantes que no tengan efectos colaterales para la salud, tales como los endulzantes naturales. La estevia (*Stevia rebaudiana*) es una planta de origen sudamericano, del extracto steviosidio de las hojas se obtienen compuestos dulces llamados glucósidos de steviol o comúnmente llamado estevia, el cual es usado como un edulcorante natural, el cual

provee un sabor dulce pero que no tiene contenido energético (Tavarini y Angelini, 2013).

El Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la OAA/OMS ha concluido que los edulcorantes de estevia son metabolizados en el organismo a steviol. El steviol es secretado en la orina como glucurónido de steviol. Los metabolitos son eliminados del cuerpo y no hay acumulación de los mismos. Adicionalmente, estevia como edulcorante se ha reportado que incrementa la sensibilidad de la insulina en modelos animales, además es un producto más anorexigénico que la sacarosa, ya que aumenta la saciedad. Aunado a lo anterior, es importante señalar otras propiedades que son importantes y deseables en un aditivo alimenticio, como el ser un componente inocuo, económico y de fácil obtención (Gregersen *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005; Anton *et al.*, 2010).

En el presente proyecto se pretende elaborar una bebida hipocalórica con extractos naturales de flor de jamaica, hierbabuena, cocolmea y hierba del sapo, demostrar sus beneficios en el control de la obesidad y sus complicaciones, así como determinar su estabilidad.

### **III. Justificación**

Actualmente la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México es del 71% en la población adulta y 33% de la población juvenil, y cada año se presentan alrededor de 200 mil defunciones asociadas a esta enfermedad. Esta cifra de prevalencia para adolescentes es muy similar a la que se presenta en el estado de Querétaro.

La obesidad en la población juvenil al igual que en los adultos favorece las alteraciones de los lípidos, por tanto, la prevalencia de enfermedades cardiovasculares. Con respecto a la diabetes tipo 2, ésta también ha aumentado considerablemente, alrededor del 5% de los jóvenes obesos presentan intolerancia a la glucosa y por lo tanto, tienen un alto riesgo de desarrollar diabetes. La transición de tolerancia normal a la glucosa a un estado prediabético en jóvenes, se encuentra asociada con la rápida ganancia de peso.

Estos problemas se agudizan debido a las modificaciones dietarias, ya que la población mexicana ha incrementado la ingesta de carbohidratos en forma de almidones, harinas y bebidas azucaradas (sacarosa, glucosa y fructosa). Los carbohidratos consumidos en exceso, elevan el nivel de glucosa en sangre sobre todo, los de alto índice glucémico. Un ejemplo de ellos son: carbohidratos refinados contenidos en refrescos, cereales, pan y pastas; lo que ocasiona una mayor liberación de insulina por el páncreas, sobrepeso y eventualmente resistencia a la insulina, característica de la diabetes tipo 2 y/o hipertensión.

La Encuesta Nacional de Salud reportó en el 2006 que de las 411 kcal consumidas en bebidas por la población de 12 a 18 años, 34% de éstas son altas en energía y con pocos beneficios a la salud y 64% con alto contenido de azúcar. Por lo tanto se requiere ofrecer nuevas alternativas para el consumo de bebidas.

En México, las infusiones herbales son ampliamente consumidas por la población, ya sea por cuestiones culinarias o medicinales, puesto que las hierbas, flores y frutos utilizados contienen componentes activos utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes mellitus, hipertensión, enfermedad renal y hepática, entre otras.

Dentro de las plantas y frutos utilizados para el tratamiento de la hipertensión, dislipidemias y la diabetes destacan: jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), hierbabuena (*Mentha piperita*), la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), hierbabuena (*Mentha pippetita*), cocolmecha (*Smilax cordifolia*) y hierba del sapo (*Eryngium carlinae*); las cuales pueden utilizadas en bebidas refrescantes como una alternativa con beneficios a la salud debido a su alto contenido de compuestos bioactivos, compuestos a los que se les ha reportado efectos antioxidantes, antiobesogénicos y antiinflamatorios. Algunos de estos materiales adicionalmente presentan una buena aceptabilidad por su sabor y aroma, y por lo tanto pueden emplearse para la preparación de bebidas funcionales.

## **IV. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Elaborar bebidas hipocalóricas a base de extractos naturales de plantas de la medicina tradicional mexicana y evaluar su efecto sobre el control de la obesidad y sus complicaciones.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Elaborar diferentes formulaciones de bebidas hipocalóricas con extractos de plantas y determinar su aceptabilidad sensorial
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las bebidas funcionales elaboradas con extractos naturales.
- Determinar la estabilidad fisicoquímica, microbiológica y de compuestos con propiedades funcionales.
- Evaluar el efecto de las bebidas sobre el control del peso y alteraciones asociadas a la obesidad como resistencia a insulina, alteraciones lipídicas, inflamación y daño hepático, en ratas de la cepa Wistar.



## V. Materiales y métodos

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Vegetal

Se utilizaron flores de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), hojas de hierbabuena (*Mentha piperita*), corteza de cocolmeca (*Smilax cordifolia*), y la planta completa sin raíces de la hierba del sapo (*Eryngium carlinae*).

#### 5.1.2 Biológico

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

### 5.2 Métodos

#### 5.2.1 Preparación de los extractos

El material seco fue extraído con agua a punto de ebullición y agitación, utilizando diferentes relaciones peso volumen y distintos tiempos de extracción como se muestran en el Cuadro 1. Los tiempos de extracción fueron seleccionados de acuerdo a sus propiedades organolépticas.

Cuadro 1. Relación peso volumen de los extractos del proceso y tiempo de extracción.

<b>Extracto</b>	<b>g/L</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Jamaica 6%	60	15
Cocolmeca 5%	50	30
Hierbabuena 4%	40	10
Hierba del sapo 3%	30	10

## 5.2.2 Formulación de las bebidas

Para la formulación de la bebida A y B se utilizó un diseño factorial, siendo la concentración de azúcar y porcentaje de extracto (Jamaica) los factores para la bebida A; para la bebida B los factores fueron porcentaje de extracto (cocolmecha), concentrado de té verde y extracto de limón. Para la bebida C se utilizó un diseño en mezclas usando el porcentaje de extractos (hierbabuena, cocolmecha y hierba del sapo) como factores.

Se utilizó ácido cítrico y citrato de sodio como reguladores de pH, sorbato de potasio como conservador, azúcar y estevia (Adquirida a la empresa Dohler S.A de C.V) como edulcorantes. Los rangos de concentración de los aditivos utilizados estuvieron de acuerdo a lo establecido por la NOM-218-SSA1-2011. Para asegurar la inocuidad de las bebidas se realizó una pasteurización, con una temperatura máxima de 76 °C por un minuto y enfriamiento a 4 °C.

### 5.2.2.1 Formulación bebida A

Se utilizó para la formulación de la bebida A un diseño factorial  $2^3$  en bloques, bloqueando al panelista debido a la cantidad de tratamientos. Utilizando como factores el tiempo de extracción, concentración de azúcar y porcentaje del extracto de Jamaica (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diseño factorial para la formulación de la bebida A

	No	Tiempo (min)	Azúcar (g/L)	Jamaica (%)
<b>Bloque 1</b>	1	15	40	2
	2	30	40	1.5
	3	15	30	1.5
	4	30	30	2
<b>Bloque 2</b>	5	30	40	2
	6	15	30	2
	7	15	40	1.5
	8	30	30	1.5

### 5.2.2.2 Formulación bebida B

Para la formulación de la bebida B se utilizó un diseño factorial  $2^3$  en bloques con un punto central, bloqueando al panelista de igual manera que la bebida A. Utilizando como factores el porcentaje de cocolmeca, concentración de extracto de té verde y concentración de extracto de limón para conferir sabor (Cuadro 3).

Cuadro 3. Diseño factorial para la formulación de la bebida B

	No	Cocolmeca (%)	Té verde (g/L)	Limón (g/L)
<b>Bloque 1</b>	33	1.25	1.5	1.5
	88	1.5	1.5	1
	68	1.25	1.25	1
	77	1.5	1.25	1.5
<b>Central</b>	52	1.375	1.375	1.25
<b>Bloque 2</b>	81	1.25	1.5	1
	94	1.5	1.5	1.5
	41	1.5	1.25	1
	10	1.25	1.25	1.5

### 5.2.2.3 Formulación bebida C

Para la bebida C se utilizó un diseño en mezclas con 12 tratamientos y dividido en bloques de cuatro tratamientos, donde los factores son los extractos de hierbabuena, cocolmeca y hierba del sapo.

Cuadro 4. Diseño en mezclas para la formulación de la bebida C

	No	Hierbabuena (%)	Cocolmecha (%)	Hierba del sapo (%)
<b>Bloque 1</b>	1	1	0.3	0.7
	2	1.5	0.1	0.4
	3	0.8	0.7	0.5
	4	1.276	0.505	.219
<b>Bloque 2</b>	5	1.2	0.70	0.1
	6	0.99	0.514	0.514
	7	1.2	0.1	0.7
	8	1.5	0.25	0.25
<b>Bloque 3</b>	9	0.8	0.5	0.7
	10	1.5	0.4	0.1
	11	1.285	0.22	0.495
	12	1.0	0.7	0.3

### 5.2.3 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de las bebidas

#### 5.2.3.1 Parámetros de color

El color se determinó mediante el sistema CIEL\*a\*b\* (International Commission on Illumination, Viena), en donde L\* indica la luminosidad, a\* la coloración rojo-verde y b\* la coloración amarillo-azul. Las muestras fueron centrifugadas a 1800 g durante 10 min y se realizó la medición de los parámetros a\*, b\* y L\* de los sobrenadantes por medio de un colorímetro Minolta, CM-2002 y procesados en el Software: Spectral Magic versión 1.01).

#### 5.2.3.2 pH

El pH de cada bebida fue determinado utilizando un potenciómetro con electrodo de vidrio (F-74BW, Horiba) una vez que fue calibrado con soluciones buffer.

### 5.2.3.3 Acidez titulable

La acidez total titulable se determinó mediante la titulación de 10 mL de cada bebida con una solución de hidróxido de sodio 100 mM hasta alcanzar un pH de Con el volumen gastado se determinó el % de acidez titulable usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ acidez titulable} = \frac{(\text{Vol. NaOH}) (N \text{ NaOH}) (\text{Eq. del ácido})}{(\text{Vol. de la muestra})} * 100$$

$$\% \text{ acidez titulable} = \text{al valor anterior} * \text{FD}$$

Donde:

Vol. de NaOH = volumen de NaOH gastado en la titulación

N NaOH = Normalidad del NaOH utilizado

Eq. del ácido = equivalente del ácido más abundante en el fruto, para el ácido cítrico es 0.064

Vol. de la muestra = volumen de la muestra a titular

FD = Factor de dilución de la muestra para titular.

### 5.2.3.4 Grados brix

La determinación de la concentración de sólidos solubles totales se expresaron como grados brix (°Bx), para esta determinación se uso un refractómetro colocando una gota de la bebida en la celda del equipo y determinando el índice de refracción de la luz.

## 5.2.4 Caracterización nutracéutica de las bebidas funcionales

### 5.2.4.1 Cuantificación de fenoles totales

Una alícuota de 20 µL de cada muestra se llevó a un volumen final de 250 µL con agua destilada, se adicionaron 125 µL del reactivo de Folin Coicalteu 1N y

625  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio al 20%. Se dejó reposar la mezcla en oscuridad y temperatura ambiente durante 2 h, tras lo cual se realizó la medición de las absorbancias a 765 nm en un lector de microplaca Thermoscientific, Varioskan (Singleton *et al.*, 1999). Para la cuantificación se utilizó ácido gálico como estándar y se expresaron los resultados como mg eq. ácido gálico  $\text{mL}^{-1}$ .

#### 5.2.4.2 Cuantificación de flavonoides totales

A una alícuota de 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra se le adicionaron 75  $\mu\text{L}$  de nitrato de sodio al 5%, 150  $\mu\text{L}$  de cloruro de aluminio al 10% y 500  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio 1 M. La mezcla se dejó reposar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 min, posteriormente se realizó la medición de las absorbancias a 510 nm en un lector de microplaca Thermoscientific, Varioskan (Liu, 2002). Se utilizó catequina como estándar y los resultados se expresaron como mg eq. catequina  $\text{mL}^{-1}$ .

#### 5.2.4.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas

A una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra se le adicionaron 700  $\mu\text{L}$  de cada solución amortiguadora: cloruro de potasio (0.025 M, pH 1.0) y acetato de sodio (0.4 M, pH 4.5). Se realizó la medición de las absorbancias a 510 y 700 nm en un lector de microplaca Thermoscientific, Varioskan (Giusti *et al.*, 2000). La cuantificación de las antocianinas totales (mg eq. delfinidina-3-glucósido  $\text{mL}^{-1}$ ) se obtuvo por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Abs}_{\text{total}} = [(\text{Abs}_{510 \text{ nm}} - \text{Abs}_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1} - (\text{Abs}_{510 \text{ nm}} - \text{Abs}_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}]$$

$$\text{Antocianinas monoméricas} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (\text{Abs}_{\text{total}} * \text{PM} * \text{FD} * 1000) / (\varepsilon * d)$$

donde Abs representa las absorbancias,  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar de la delfinidina-3-glucósido (26,900), PM es el peso molecular de la delfinidina-3-glucósido (449,2) y C es la concentración de la muestra.

## 5.2.5 Evaluación sensorial de los extractos herbales

Se realizó un análisis sensorial de las bebidas funcionales, con la participación de un panel no entrenado, integrado por jóvenes de 18-25 años de edad, alumnos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Querétaro. El análisis consistió en la evaluación de los parámetros de color, olor, sabor. Se utilizó una escala hedónica de nueve puntos donde el punto nueve fue me gusta mucho y el punto uno me disgusta mucho (Figura 6). Para la evaluación sensorial de la bebida A y B se utilizó panel con n=50 mientras que la bebida C fue un panel de n=45.



Figura 6. Escala hedónica de nueve puntos utilizada en la evaluación sensorial de bebidas.

## 5.2.6 Evaluación *in vitro* de las propiedades nutracéuticas de los extractos herbales

### 5.2.6.1 Capacidad de atrapamiento del radical ABTS

El radical ABTS<sup>•+</sup> (7 mM) fue preparado por medio de la disolución de ABTS en persulfato de potasio (2.45 mM), y su posterior incubación en obscuridad durante 12 h. Posteriormente se diluyó la solución de ABTS con amortiguador de fosfatos (pH 7.4) hasta obtener una absorbancia de 0.70 ( $\pm 0.02$ ) a 734 nm. Se adicionó 950  $\mu$ L de la solución diluida de ABTS a 50  $\mu$ L de diversas concentraciones de cada muestra y se midió las absorbancias a 734 nm en un lector de microplaca Thermoscientific, Varioskan (Re *et al.*, 1999). La inhibición del

radical ABTS<sup>•+</sup> se expresó como la concentración media de inhibición (IC<sub>50</sub>), al graficar el logaritmo de la concentración contra el porcentaje de inhibición. Se utilizó catequina como estándar.

#### **5.2.6.2 Capacidad de atrapamiento del radical DPPH**

El radical DPPH<sup>•</sup> fue disuelto en metanol hasta obtener una absorbancia de 0.75 (±0.03) a 515 nm. Se adicionaron 50 µL de diversas concentraciones de cada muestra a 450 µL de la solución diluida de DPPH. Se dejó reposar la mezcla en obscuridad a temperatura ambiente durante 30 min, tras lo cual se realizó la medición de las absorbancias a 517 nm en un lector de microplaca Thermoscientific, Varioskan (Brand-Williams *et al.*, 1995). Los resultados se expresaron como IC<sub>50</sub>.

#### **5.2.6.3 Capacidad de inhibición de la α-amilasa**

La enzima α-amilasa fue disuelta en una solución amortiguadora de fosfatos (40 mM, pH 6.9), la cual consiste de 0.4 g L<sup>-1</sup> de almidón y diversas concentraciones de cada muestra. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 39 min, tras lo cual las muestras fueron diluidas en metanol (1:4) y centrifugadas a 700 g durante 10 min (Kandra *et al.*, 2005). Se realizó la cuantificación de glucosa utilizando un kit que determina la actividad de la glucosa oxidasa a 300 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición.

#### **5.2.6.4 Capacidad de inhibición de la enzima α-glucosidasa**

1 U mL<sup>-1</sup> de la enzima α-glucosidasa fue disuelta en una solución amortiguadora de fosfatos (100 mM; pH 6.9) con 5 mM de p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido en amortiguador de fosfatos y diversas concentraciones de cada muestra. La mezcla fue incubada a 25 °C durante 15 min y centrifugada a 700 g durante 10 min (Apostolidis *et al.*, 2007). Se realizó la cuantificación de glucosa utilizando un kit que determina la actividad de glucosa oxidada a 300 nm en un



lector de microplca Thermoscientific, Varioskan. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición.

#### **5.2.6.5 Capacidad de inhibición de la actividad de la enzima lipasa de lipoproteína**

Se preparó una solución de lipasa porcina pancreática (Sigma) en agua grado HPLC a una concentración de 10 mg/mL, la solución fue centrifugada a una velocidad de 16,000 rpm por 5 min, utilizando solo el sobrenadante. Se preparó un buffer de ensayo Tris 100 mM (pH 8.2). La solución del sustrato contiene p-nitrofenil laurato 0.08% p/v en acetato de sodio 5 mM (pH 5.0) al cual a temperatura de ebullición se le adiciono 1% de Triton X-100. Como control del ensayo se mezclaron 450 µL de buffer de ensayo, 450 µL de solución de sustrato y 150 µL de lipasa. Para las muestras a lo anterior se le adicionó 50 µL de las bebidas. Las muestras y el control fueron incubados por 2 h a 37°C. Las muestras fueron centrifugadas a 16,000 rpm por 2.5 min, los sobrenadantes fueron leídos a una longitud de onda de 400 nm en un lector de Elisa Varioskan Flash de la marca Thermo Scientific (McDougall *et al.* 2009).

#### **5.2.7 Vida de anaquel**

Las pruebas de estabilidad se realizaron para determinar la vida de anaquel de la bebida, la cual se define como el tiempo en el cual éste conservará sus propiedades fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas y nutricionales. (Houggh y Fiszman, 2005). Por lo cual, se evaluó cada quince días por un periodo de 5 semanas los parámetros de color, pH, grados brix, concentración de antocianinas, fenoles totales y se realizaron análisis de acuerdo a las especificaciones microbiológicas de la NOM-218-SSA (Cuadro 5).

Cuadro 5. Especificaciones microbiológicas para bebidas saborizadas no alcohólicas y bebidas adicionadas con cafeína.

<b>Microorganismo</b>	<b>Límite máximo</b>
-----------------------	----------------------

<b>Mesófilos aerobios UFC/mL</b>	50
<b>Coliformes totales NMP/mL</b>	10
<b>Coliformes fecales NMP/mL</b>	n.a.

## 5.2.8 Evaluación *in vivo* de las bebidas para el control de la obesidad y sus complicaciones

### 5.2.8.1 Grupos de experimentación

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de  $160 \pm 20$  g, las cuales fueron alimentadas con una dieta estándar o una dieta obesogénica (alta en lípidos y fructosa) como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Contenido nutrimental de las dietas del estudio *in vivo*

<b>Nutrientes</b>	<b>Dieta estándar</b>	<b>Dieta alta en grasas y fructosa (obesogénica)</b>
<b>Energía</b>	337 kcal	635 kcal
<b>Proteínas</b>	22%	11%
<b>Carbohidratos</b>	45%	55%
<b>Lípidos</b>	5%	14%

Los animales alimentados con dieta estándar fueron denominados control sano ( $n=8$ ) y consumieron agua *ad libitum*. Los animales alimentados con una dieta obesogénica fueron divididos en grupo de ocho ratas, denominando a un grupo control obeso el cual consumió agua *ad libitum*, los otros grupos con dieta obesogénica consumieron las bebidas formuladas *ad libitum* durante 8 h (Cuadro 7). El estudio se llevó a cabo durante un periodo de 16 semanas.

Cuadro 7. Tratamientos por grupo del estudio *in vivo*

<b>Grupo</b>	<b>Dieta</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>Control sano</b>	Estándar	Agua
<b>Control obeso</b>	Obesogénica	Agua
<b>Bebida A</b>	Obesogénica	Bebida funcional

<b>Bebida B</b>	Obesogénica	Bebida funcional
<b>Bebida C</b>	Obesogénica	Bebida funcional

Semanalmente se midió el peso corporal, y tres veces por semana se evaluó el consumo de alimento y de bebida. Al finalizar el estudio se recolectó orina en jaulas metabólicas, se sacrificaron los animales, los cuales se anestesiaron con eter etílico y se les extrajo sangre por punción cardiaca. El suero se separó inmediatamente por centrifugación de las muestras de sangre, estos se congelaron y almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Finalmente, se extrajeron los riñones, el hígado y el tejido adiposo, estos se lavaron con amortiguador de fosfatos salino frío; una parte se almacenó en solución de formaldehído para análisis histopatológico, y la otra parte se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis.

El estudio en animales fue aprobado por el comité de bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro.

### **5.2.8.2 Determinación del perfil lipídico sérico**

Se realizó un perfil lipídico en suero que consistió de colesterol total, HDL, LDL triglicéridos utilizando kits de química clínica de la marca Spin-react. Se utilizó un lector de Elisa Varioskan Flash de la marca Thermo Scientific.

### **5.2.8.3 Cuantificación de triglicéridos en hígado y heces**

Se pesaron 100 mg de la muestra a analizar y se les añadió 350  $\mu\text{L}$  de hidróxido de potasio etanólico incubándose toda la noche a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una vez digeridas las muestras, se llevaron a un volumen de 1000  $\mu\text{L}$  con etanol-agua (1:1), posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por cinco min. Se llevaron a un volumen de 1200  $\mu\text{L}$  con etanol-agua (1:1). Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  y se le agregaron

215  $\mu$ L de cloruro de magnesio (1 M). Esta mezcla se mantuvo 10 min en hielo para poder centrifugarse después a una velocidad de 5000 rpm por 5 min. Se realizó la medición de triglicéridos del sobrenadante mediante un kit enzimático de la marca Spin-react.

#### **5.2.8.4 Evaluación de hipertrofia del tejido adiposo**

Se realizó la recolección del tejido adiposo visceral, el cual fue colocado en una solución de formalina al 4%. Se realizaron cortes de 5 mm de los tejidos previamente incluidos en parafina y posteriormente fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Posteriormente se midió en un microscopio el diámetro y el número de adipocitos por campo.

#### **5.2.8.5 Cuantificación de moléculas relacionadas con resistencia a la insulina e inflamación**

Se realizó la cuantificación sérica de resistina y leptina por medio de kits de ELISA de la marca sigma-aldrich y de IL- 6 por medio de un kit de ELISA de la marca Bioscience. Para la insulina se utilizó un kit de la marca eBiosciencie La medición se realizó en un lector de microplaca de la marca Thermoscientific modelo Varioskan.

#### **5.2.9 Evaluación de daño hepático**

Se cuantificaron en el suero las enzimas fosfatasa alcalina, alanina amino transferasa y aspartato amino transferasa, utilizando kits enzimáticos de la marca Spin-react.

### **5.3 Evaluación de esteatosis hepática**

Se realizó la recolección del tejido hepático, el cual fue colocado en una solución de formalina al 4%. Se realizaron cortes de 5 mm de los tejidos previamente incluidos en parafina y posteriormente fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Posteriormente se observó en un microscopio los depósitos de grasa en los hepatocitos clasificando el grado de acuerdo a la escala de Brunt (Brunt *et al.*, 1999).

### **5.4 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (EE). La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, además se realizó un análisis de comparación de medias aplicando la prueba de Tukey-Kramer y cuando se comparó contra un control se utilizó la prueba de Dunnett. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico JMP versión 10.0.1.

## **VI. Resultados y discusiones**

### **6.1 Formulación de bebidas**

#### **6.1.1 Formulación de la bebida A**

Para la formulación de la bebida A se utilizó como base el extracto de Jamaica, principalmente por sus efectos antioxidantes, renoprotector, hepatoprotector, antidiabético, antihipertensivo e hipocolesterolémico (Da Costa *et al.*, 2014).

La evaluación sensorial se muestra en la Figura 7 se observa que los tratamientos 1, 3 y 7 tuvieron una mayor aceptación respecto al sabor con valores superiores a 7, clasificándose de acuerdo a la escala hedónica dentro del rango de me gusta mucho, siendo el tratamiento 1 el que obtuvo el mayor valor de sabor ( $7.3 \pm 0.7$ ). Respecto al color, el tratamiento 3 obtuvo la mayor evaluación con un valor de 7.7, sin embargo todos los tratamientos de acuerdo a la escala hedónica fueron aceptados satisfactoriamente. Por otro lado, el color de los tratamientos se mantuvo en el rango 6-7, me gusta moderadamente.

De manera general las bebidas cuya base era de Jamaica, y tenían un mayor tiempo de extracción presentaban un ligero sabor amargo, el cual en algunas ocasiones se enmascaró con el azúcar adicionado. El sabor astringente y amargo de las infusiones se atribuyen a los compuestos polifenólicos, los cuales además están relacionados con las propiedades antioxidantes y otros beneficios a la salud del extracto de flor de Jamaica (Lesscheveae y Noble, 2005). La preferencia por parte de los panelistas se inclinó por las formulaciones cuyo extracto fue sometido a menor tiempo de extracción, se ha reportado que entre mayor tiempo sea la extracción, existe un mayor grado de polimerización de antocianinas, lo cual aumenta el sabor amargo y astringente (Tsai y Huang, 2004).

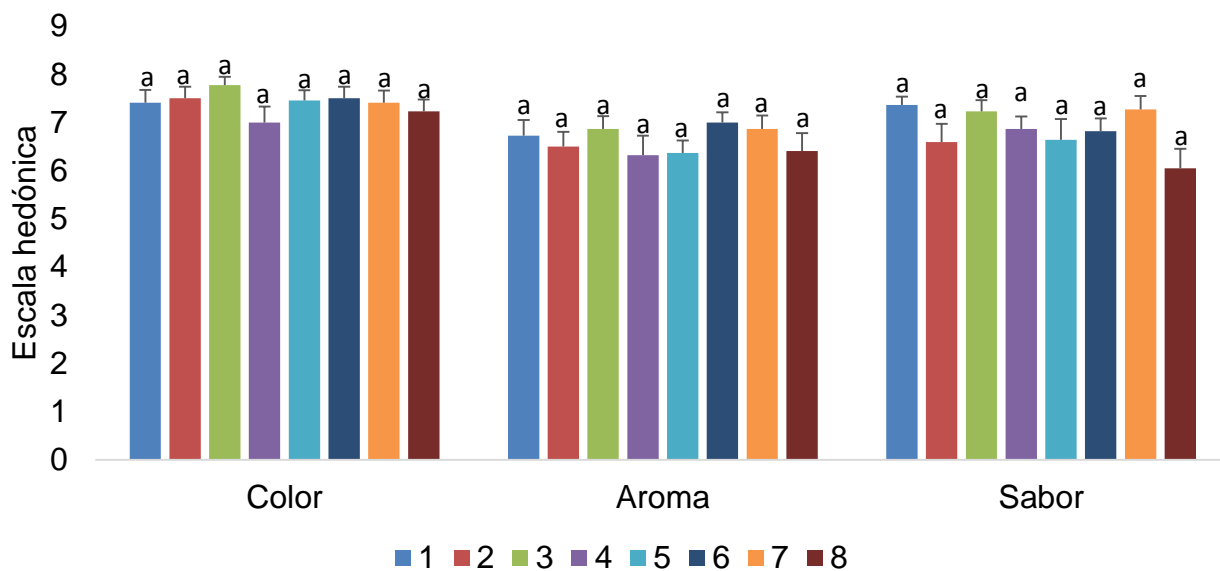


Figura 7. Evaluación sensorial de la bebida A. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Letras iguales indican que no existe diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), con la prueba de Tukey-Kramer.

En base a estos resultados, el tratamiento 1 fue el que se seleccionó para las siguientes determinaciones; fisicoquímicas, nutracéuticas y funcionales.

### 6.1.2 Formulación de la bebida B

La bebida B fue elaborada con la finalidad de incluir extractos con beneficios principalmente para la disminución de peso corporal, por lo cual se utilizó el extracto de cocolmecca como base, ya que en estudios previos en el laboratorio de bioquímica molecular del PROPAC se demostró que el extracto de cocolmecca al 2% disminuyó la ganancia de peso corporal hasta en un 27% en ratas alimentas con una dieta alta en grasa y fructosa respecto al grupo control (Pérez, 2013 datos sin publicar). Debido a sus propiedades benéficas, se adicionó extracto natural de té verde, este té contiene como principal compuesto fenólico al galato de epigallocatequina, compuesto que posee efectos antiobesogénicos (Mohsen y Hasan, 2010).

En la Figura 8 se observa que la formulación 94 obtuvo la mejor evaluación con un valor de 6.8 correspondiente al rango 6-7, me gusta moderadamente, tanto para color, aroma como sabor. Esta formulación presenta la mayor concentración de los tres factores, extracto de cocolmecha (1.5%), extracto de té verde (1.5 g/L) y concentrado de limón (1.5 g/L).

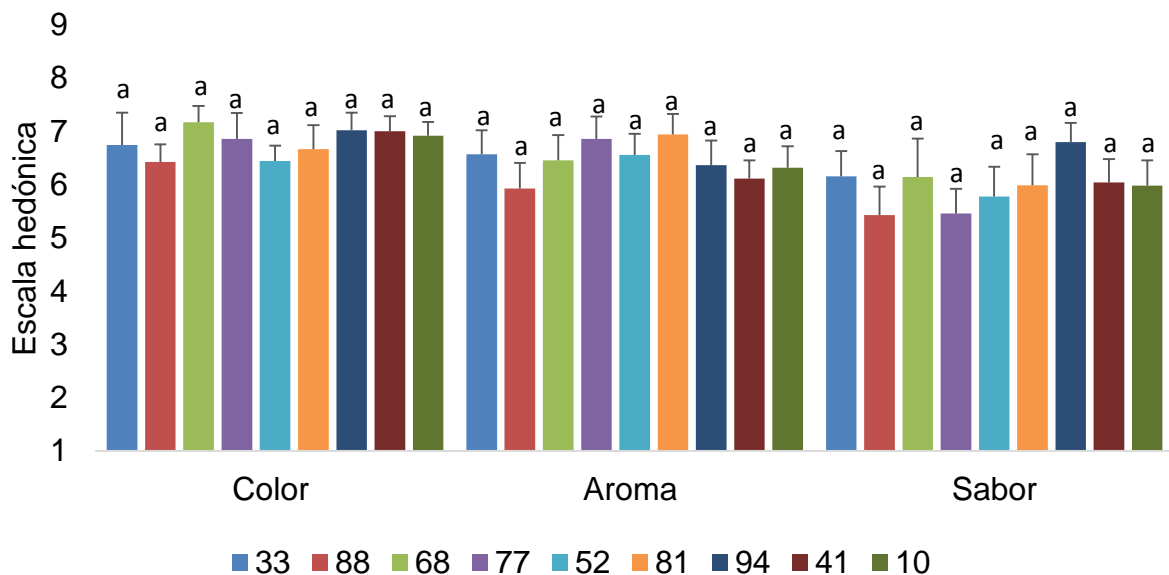


Figura 8. Evaluación sensorial de la bebida B. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Letras iguales indican que no existe diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), con la prueba de Tukey-Kramer.

Para mejorar la formulación 94, se adicionó extracto de hierbabuena, ya que posee compuestos que le proporciona un sabor más refrescante, ya que la hierbabuena o el aceite esencial suele usarse para enmascarar sabores (Chen *et al.* 2011). La formulación 94-1 aumento su aceptabilidad sensorial hasta en un 18.33% en la propiedad de sabor y 8.82% respecto al aroma comparado con la formulación 94 (Cuadro 8).



Cuadro 8. Factores incluidos en la elaboración de la bebida B y su evaluación sensorial.

No.	Factores				Evaluación sensorial	
	Cocolmecha (%)	Té verde (g/L)	Limón (g/L)	Hierbabuena (%)	Sabor	Aroma
<b>94</b>	1.5	1.5	1.5	---	6.7 ± 0.5 <sup>b</sup>	6.4 ± 0.5 <sup>b</sup>
<b>94-1</b>	1.5	1.5	1.5	0.25	7.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	7.4 ± 0.6 <sup>b</sup>
<b>94-2</b>	1.5	1.5	1.5	0.125	6.9 ± 0.4 <sup>b</sup>	6.8 ± 0.6 <sup>ab</sup>

Los valores representan la media ± DE. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba de Tukey-Kramer.

### 6.1.3 Formulación de la bebida C

Para la bebida C, el extracto de hierbabuena fue el componente principal, estudios han reportado que este extracto mejora el perfil lipídico en diferentes modelos animales; disminuyendo LDL, colesterol total y aumentando HDL (Badal *et al.*, 2011). Se ha reportado que el extracto de hierba del sapo, al igual que la hierbabuena presenta propiedades hipolipidémico en un modelo animal de diabetes (Noriega *et al.*, 2012).

Se puede observar en la Figura 9 que no hay diferencia respecto a la preferencia por el color de las bebidas, la formulación 3 fue la menos aceptada con respecto al sabor y esta se caracterizó por una menor concentración de hierbabuena y alta concentración de hierba del sapo, mientras que la formulación 12 obtuvo la mayor puntuación tanto en aroma como sabor con valores de 7.03 y 7.22 respectivamente.

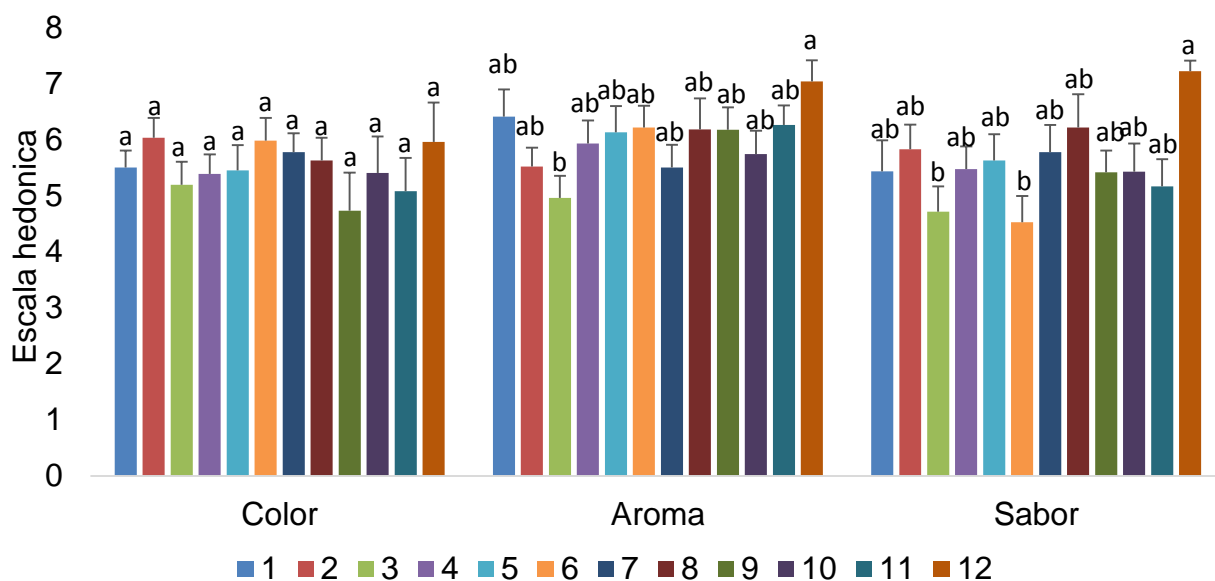


Figura 9. Evaluación sensorial de bebida C. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), con la prueba de Tukey-Kramer.

#### 6.1.4 Formulación de bebidas funcionales

Las bebidas finales formuladas para el presente trabajo se muestran en el Cuadro 8, los componentes incluyeron en orden descendente de acuerdo a su concentración. De igual manera se incluyen los aditivos utilizados para la formulación de las bebidas.

Cuadro 9. Componentes de las bebidas funcionales

Bebida	Componentes
A	Jamaica
B	Cocolmecca/té verde/Hierbabuena
C	Hierbabuena/cocolmecca/Hierba del sapo
<b>Aditivos:</b> Azúcar, ácido cítrico, citrato de sodio, sorbato de potasio y estevia	

## 6.2 Caracterización fisicoquímica

La acidez titulable, el pH y los grados brix se determinaron en las diferentes bebidas. Estos son parámetros utilizados para cuantificar la acidez y el porcentaje de azúcares disueltos en una muestra. Se observa en el Cuadro 10 que no hay diferencia entre los valores de grados brix de las bebidas y el pH. El valor ácido del pH es importante en el desarrollo de bebidas, ya que el pH óptimo para el crecimiento de la mayoría de las bacterias deterioradoras asociadas a alimentos está en el rango 6.5-7.5, y algunas bacterias patógenas pueden crecer a pH 4. Dentro de la acidez titulable, la bebida que presentó la mayor acidez fue la bebida A ( $2.77 \pm 0.73$ ), seguido de la bebida B y finalmente la bebida C. Se ha reportado que los extractos de Jamaica poseen altas cantidades de ácidos orgánicos como ácido hibicus, ácido cítrico, ácido málico y ácido hidroxícitrico, los cuales contribuyen a la acidez de dichos extractos (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014).

Uno de los primeros parámetros cualitativos que observa un consumidor en los alimentos es el color (Bruhn, 2007). El color en los vegetales es originado principalmente por clorofilas y compuestos fenólicos como los flavonoides y las antocianinas. En el Cuadro 10 se muestran los parámetros de color de las bebidas, donde el valor de  $L^*$  de las bebidas B y C es mayor a la bebida A, esto se le puede atribuir a la pigmentación de los flavonoides, mientras que para la bebida A su contenido mayoritario son las antocianinas, las cuales brindan colores menos luminosos como rojo, morado y azul (Lansky y Newman, 2007).

La bebida A presentó el valor más alto para el parámetro denominado  $a^*$ , esto nos indica una tendencia a los tonos rojos, característicos de los extractos de Jamaica. Galicia-Flores *et al.* (2007) reportan valores de  $a^*$  de 30.3 para extracto de Jamaica 1%. Respecto al valor  $b^*$  las bebidas B y C mostraron valores superiores, esto debido a la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides.

Cuadro 10. Parámetros fisicoquímicos de las bebidas.

Bebida	Grados brix	pH	Acidez titulable (%)	L*	a*	b*
A	3.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.85 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.77 ± 0.73 <sup>a</sup>	16.58 ± 1.07 <sup>c</sup>	40.84 ± 1.7 <sup>a</sup>	7.73 ± 0.81 <sup>b</sup>
B	3.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.32 ± 0.36 <sup>a</sup>	2.01 ± 1.47 <sup>b</sup>	22.67 ± 3.02 <sup>a</sup>	-4.90 ± 0.71 <sup>c</sup>	47.65 ± 3.27 <sup>a</sup>
C	3.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.33 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.40 ± 1.28 <sup>c</sup>	20.47 ± 1.93 <sup>b</sup>	4.46 ± 1.22 <sup>b</sup>	45.46 ± 2.94 <sup>a</sup>

Los valores representan la media ± DE. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba de Tukey-Kramer.

### 6.3 Caracterización nutracéutica

#### 6.3.1 Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides

Los compuestos fenólicos son los principales fitoquímicos consumidos en la dieta, estos presentan propiedades potencialmente preventivas y terapéuticas en alteraciones metabólicas como la obesidad (Mohsen y Hasan, 2010). Se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides de las tres bebidas. La bebida B presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos ( $106.42 \pm 8.7$  mg eq. ác. gálico/mL), mostrando una concentración 1.62 veces mayor y 2.2 veces mayor que la bebida A y la bebida C respectivamente (Figura 10a). De igual manera se observa en la Figura 10b que la bebida B presenta la mayor concentración de flavonoides,  $15.43 \pm 4.46$  mg eq. catequina/mL, mostrando 13.28% más concentración de flavonoides que la bebida C y 61% más en comparación con la bebida A.

La mayor concentración de compuestos fenólicos y flavonoides por parte de la bebida B puede ser originado por la adición de extracto de té verde, se determinó la concentración de compuestos fenólicos de un extracto de té verde comercial al 1% y los valores fueron de  $480 \pm 11$  mg eq. ác. gálico/mL. Los flavonoides de la bebida B puede ser catequinas como (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina-3-galate, and (-)-epigallocatequin-3-galato (Anesini *et al.*, 2008).

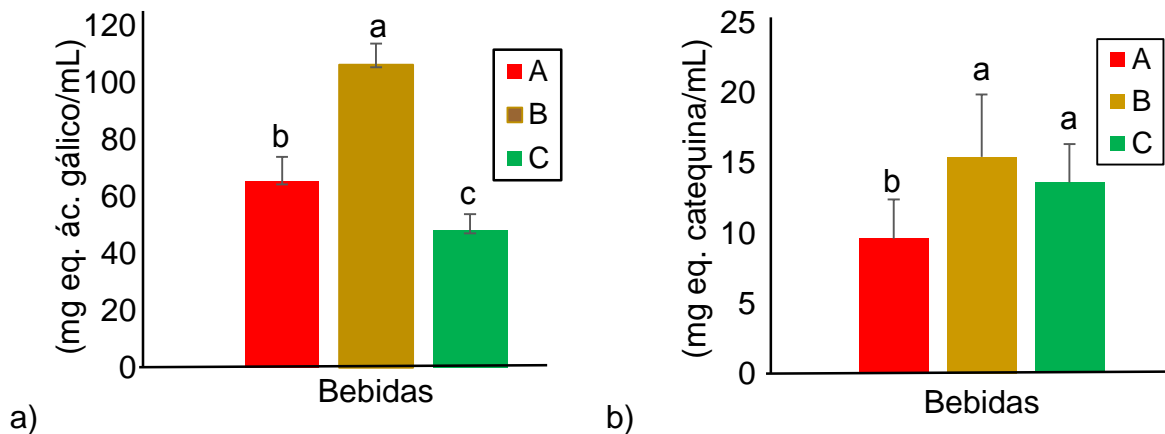


Figura 10. a) Concentración de compuestos polifenólicos y b) concentración de flavonoides. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), con la prueba de Tukey-Kramer.

### 6.3.2 Cuantificación antocianinas

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles, son las responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas y vegetales. El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen tonalidades más azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Wagner, 1982).

Se cuantificó la concentración de antocianinas en la bebida A y en diferentes bebidas comerciales preparadas con extracto natural. La bebida A presentó una concentración de  $18.36 \pm 0.80$  mg eq de cianidina 3-glucosido/L, la bebida B y C no presentaron antocianinas. Las bebidas que se comercializan con cierto porcentaje de extracto natural mostraron concentraciones muy bajas de estos compuestos ( $< 1.0$  mg eq de cianidina 3-glucosido/L) (Figura 11). NwanChukwu *et al.* (2015) reportan  $10.04 \pm 0.5$  mg eq de cianidina 3-glucosido/L para una infusión de Jamaica al 2% (p/v). Comparando con la bebida A, estos autores reportaron menor

concentración de antocianinas, esta diferencia puede deberse a la procedencia de las flores de Jamaica o al método de extracción.

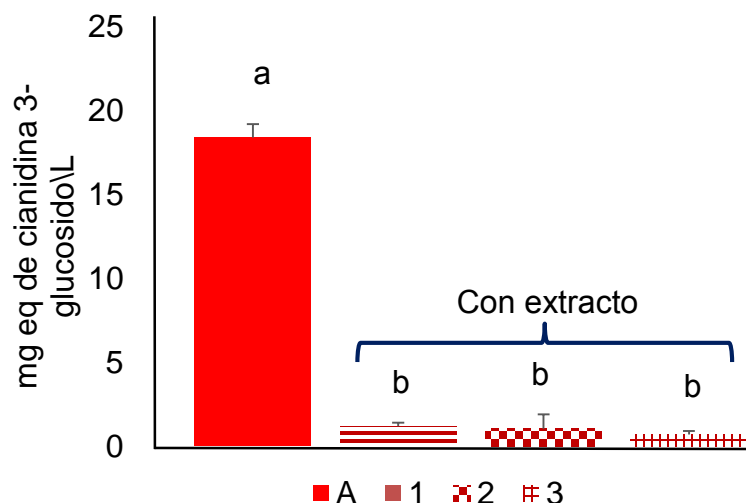


Figura 11. Concentración de antocianinas de la bebida A y de bebidas comerciales elaboradas con extractos naturales. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), con la prueba de Tukey-Kramer.

### 6.3.3 Capacidad antioxidante

Diversas enfermedades y procesos patológicos como la diabetes, cáncer y obesidad están asociadas con un desequilibrio entre los radicales libres y los agentes antioxidantes que dañan al organismo, estado conocido como estrés oxidativo. Las propiedades antioxidantes de alimentos, extractos de plantas o de bebidas funcionales son relevantes para disminuir dicha alteración, por lo anterior se evaluó la capacidad antioxidante de las bebidas formuladas.

En este estudio, la capacidad antioxidante fue determinada *in vitro* mediante dos métodos analíticos (inhibición de los radicales ABTS<sup>+</sup> y DPPH<sup>•</sup>). Los resultados se reportan como la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) la cual establece la concentración de una sustancia necesaria para inhibir en un 50 % la

formación de los radicales. De manera que valores menores de IC<sub>50</sub> reflejarían una mayor capacidad antioxidante de la muestra.

En el Cuadro 11 se observa que la bebida B fue la que presentó el menor valor de IC<sub>50</sub> respecto a la inhibición de ambos radicales y por lo tanto mayor capacidad antioxidante, esta bebida tiene la mayor concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales pueden tener un efecto sobre la actividad antioxidante.

Cuadro 11. Capacidad antioxidante de las bebidas funcionales.

<b>Bebida</b>	<b>DPPH</b>	<b>ABTS</b>
<b>A</b>	14.8 ± 0.8 <sup>a</sup>	8.4 ± 0.6 <sup>a</sup>
<b>B</b>	7.8 ± 0.5 <sup>c</sup>	7.1 ± 0.2 <sup>b</sup>
<b>C</b>	11.5 ± 0.5 <sup>b</sup>	7.7 ± 0.3 <sup>ab</sup>
<b>Trolox</b>	6.5 ± 0.4 <sup>c</sup>	4.7 ± 0.2 <sup>c</sup>

Los valores representan la concentración media de inhibición máxima (IC<sub>50</sub> mg/mL) ± DE. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05) con la prueba de Tukey-Kramer.

#### 6.4 Pruebas de vida de anaquel

La importancia de las pruebas de estabilidad radica en la necesidad de asegurarle al consumidor que el producto es inocuo y mantiene las propiedades de calidad, dicha situación tiene mayor importancia en alimentos funcionales donde además hay que asegurar la funcionalidad del producto.

Se monitoreó la estabilidad de las bebidas por un periodo de 5 semanas a 25°C de temperatura, evaluando en la semana 1, 3 y 5 diversos parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y nutracéuticos.

#### 6.4.1 Parámetros microbiológicos

Los niveles microbiológicos dentro de los alimentos son muy importantes ya que estos aseguran su inocuidad y el riesgo de contaminación con patógenos. Durante las cinco semanas de almacenamiento a 25 °C no hubo crecimiento microbiológico en las bebidas (Cuadro 12), siendo todos los resultados negativos, de acuerdo a las especificaciones para bebidas no alcohólicas de la norma NOM-218-SSA1-2011.

Cuadro 12. Parámetros microbiológicos de las bebidas después de cinco semanas de almacenamiento.

<b>Microorganismo</b>	<b>Límite máximo</b>	<b>Bebida A</b>	<b>Bebida B</b>	<b>Bebida C</b>
<b>Mesófilos aerobios UFC/mL</b>	50	0-5	0-5	0-5
<b>Coliformes totales NMP/mL</b>	10	<1.8	<1.8	<1.8
<b>Coliformes fecales NMP/mL</b>	n.a.	No detectable	No detectable	No detectable

#### 6.4.2 Parámetros fisicoquímicos y compuestos fenólicos

Mantener el rango óptimo de pH ácido es necesario para la seguridad microbiológica, así como, la estabilidad de los compuestos fenólicos la cual se ha reportado aumenta en niveles bajos de pH (Friedman y Jürgens, 2000). Por otro lado, el parámetro de grado Brix se refiere al porcentaje de sacarosa en solución; sin embargo azúcares como glucosa y fructosa también puede desviar la luz blanca; esta desviación se mide como un índice de refracción. Algunos ácidos orgánicos también pueden interferir en la refracción, de tal manera que los Sólidos solubles totales se pueden expresar como ° Bx.



Durante la pruebas de estabilidad de la bebida A se puede observar que el pH se mantiene constante a través de las 5 semanas de monitoreo, en un rango de 2.8-2.9. El mismo comportamiento se observó para los grados brix, los cuales no se ven alterado durante el almacenamiento. Respecto a la acidez titulable, se presentó una disminución de 8.85% en la semana 5 respecto a la primera semana. Los compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas, también muestran una ligera reducción de un 8.7%, 10.5% y 8% en su concentración a la quinta semana. Estos cambios observados en los compuestos fenólicos pueden deberse a su degradación o polimerización (Cuadro 13).

Cuadro 13. Parámetros fisicoquímicos y compuestos fenólicos de la bebida A durante las pruebas de estabilidad a 25 °C.

<b>Parámetros fisicoquímicos</b>			
<b>Semanas</b>	<b>pH</b>	<b>Grados Brix</b>	<b>Acidez titulable (%)</b>
<b>1</b>	2.8 ± 0.07 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.71 ± 0.05 <sup>a</sup>
<b>3</b>	2.9 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.62 ± 0.05 <sup>a</sup>
<b>5</b>	2.9 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.47 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>Compuestos fenólicos</b>			
	<b>Compuestos fenólicos totales <sup>1</sup></b>	<b>Flavonoides<sup>2</sup></b>	<b>Antocianinas<sup>3</sup></b>
<b>1</b>	63.52 ± 1.58 <sup>a</sup>	9.17 ± 0.36 <sup>a</sup>	19.24 ± 0.56 <sup>a</sup>
<b>2</b>	60.36 ± 0.52 <sup>b</sup>	9.01 ± 0.28 <sup>a</sup>	18.42 ± 0.53 <sup>ab</sup>
<b>5</b>	58.01 ± 0.72 <sup>b</sup>	8.21 ± 0.19 <sup>b</sup>	17.69 ± 0.36 <sup>b</sup>

Los datos se expresan como la media de <sup>1</sup>mg eq. ác. Gálico/mL<sup>-1</sup>, <sup>2</sup>mg eq. catequina mL<sup>-1</sup>, <sup>3</sup>mg eq de cianidina 3-glucosido/L ± DE. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05) con la prueba de Tukey-Kramer.

Los parámetros fisicoquímicos de la bebida B no presentaron diferencia significativa a través del tiempo, sin embargo, para los compuestos fenólicos se observó una disminución respecto a la primera semana del 6.8% respecto a los compuestos fenólicos totales y de un 7.8 % para flavonoides, pero esta última no fue significativa (Cuadro 14).

Cuadro 14. Parámetros fisicoquímicos y compuestos fenólicos de la bebida B durante las pruebas de estabilidad a 25 °C.

<b>Parámetros fisicoquímicos</b>			
<b>Semanas</b>	<b>pH</b>	<b>Grados Brix</b>	<b>Acidez titulable (%)</b>
<b>1</b>	3.4 ± 0.08 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.11 <sup>a</sup>
<b>3</b>	3.3 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.15 <sup>a</sup>	2.18 ± 0.10 <sup>a</sup>
<b>5</b>	3.5 ± 0.10 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.15 ± 0.10 <sup>a</sup>
<b>Compuestos fenólicos</b>			
	<b>Compuestos fenólicos totales<sup>1</sup></b>	<b>Flavonoides<sup>2</sup></b>	
<b>1</b>	103.02 ± 3.1 <sup>a</sup>	15.20 ± 0.59 <sup>a</sup>	
<b>3</b>	99.48 ± 2.66 <sup>b</sup>	14.74 ± 0.63 <sup>a</sup>	
<b>5</b>	96.45 ± 1.40 <sup>b</sup>	14.09 ± 0.29 <sup>a</sup>	

Los datos se expresan como la media de <sup>1</sup>mg eq. ác. Gálico/mL<sup>-1</sup>, <sup>2</sup>mg eq. catequina mL<sup>-1</sup> ± DE. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05) con la prueba de Tukey-Kramer.

Respecto a la bebida C se observó únicamente un aumento del 15% en los valores de pH en comparación con la primera semana, los grados brix se mantuvieron sin cambio a través del tiempo. La acidez titulable, muestra una disminución del 6.2%. La concentración final de compuestos fenólicos y flavonoides en comparación a la primera semana presentaron una disminución del 6.3% y 7.3% respectivamente (Cuadro 15).

Cuadro 15. Parámetros fisicoquímicos y compuestos fenólicos de la bebida C durante las pruebas de estabilidad a 25 °C.

<b>Parámetros fisicoquímicos</b>			
<b>Semanas</b>	<b>pH</b>	<b>Grados Brix</b>	<b>Acidez titulable (%)</b>
<b>1</b>	3.3 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.51 ± 0.05 <sup>a</sup>
<b>3</b>	3.5 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.05 <sup>ab</sup>
<b>5</b>	3.8 ± 0.10 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.04 <sup>b</sup>
<b>Compuestos fenólicos</b>			
	<b>Compuestos fenólicos totales<sup>1</sup></b>	<b>Flavonoides<sup>2</sup></b>	
<b>1</b>	47.85 ± 1.52 <sup>a</sup>	12.79 ± 0.82 <sup>a</sup>	
<b>3</b>	45.81 ± 1.34 <sup>ab</sup>	12.12 ± 0.63 <sup>ab</sup>	
<b>5</b>	42.85 ± 2.05 <sup>b</sup>	11.10 ± 0.36 <sup>b</sup>	

Los datos se expresan como la media de <sup>1</sup>mg eq. ác. Gálico/mL<sup>-1</sup>, <sup>2</sup>mg eq. catequina mL<sup>-1</sup> ± DE. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05) con la prueba de Tukey-Kramer.

### 6.4.3 Inhibición de enzimas de digestión

La enzima  $\alpha$ -amilasa tiene un rol importante en la digestión de nutrientes, y es la encargada de catalizar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -D-(1-4) del almidón, obteniéndose una mezcla de maltosa, maltotriosa y oligosacáridos de 6 a 8 unidades de glucosa (De-Sales *et al.*, 2012).

Otra enzima importante de digestión de carbohidratos es la  $\alpha$ -glucosidasa, que hidroliza los enlaces  $\alpha$ -D-(1-4) de los oligosacáridos y disacáridos para la obtención de glucosa. En los resultados obtenidos se observa que las bebidas disminuyeron *in vitro* la actividad enzimática de la enzima  $\alpha$ -amilasa, en un rango de 37.7-55.6%, donde la bebida B presentó una inhibición similar a la bebida A, y la bebida C obtuvo el menor efecto. De igual manera, la bebida B presentó el mayor efecto en la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, observándose una inhibición 1.5 veces mayor que la bebida C y 2 veces mayor que la bebida A (Cuadro 16). De acuerdo con estos datos la bebida B mostro los mayores porcentajes de inhibición de la enzimas del metabolismo de almidón.

La enzima lipasa pancreática es la principal enzima lipolítica secretada por el páncreas, tiene un papel importante en la absorción de triglicéridos ya que esta enzima se encarga de la hidrólisis del 50-70% de las grasas de la dieta. Los triglicéridos provenientes de la dieta requieren se hidrolizados en monogliceridos para poder ser rodeados por micelas formadas con sales biliares y luego así poder transportarse a los enterocitos (Birari y Bhutani, 2007).

En el Cuadro 16 se obseva que la bebida con mayor efecto inhibidor sobre la lipasa pancreática fue la A la cual presento una inhibición 42.7 % mayor a la bebida C y 34.7% respecto a la bebida B.

Cuadro 16. Efecto de las bebidas sobre el porcentaje inhibición de enzimas de digestión

<b>Bebida</b>	<b><math>\alpha</math>-amilasa</b>	<b>Glucosidasa</b>	<b>Lipasa</b>
<b>A</b>	46.5 $\pm$ 7.3 <sup>a</sup>	25.1 $\pm$ 6.5 <sup>b</sup>	26.4 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
<b>B</b>	55.6 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	51.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	19.6 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>
<b>C</b>	37.7 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	33.8 $\pm$ 7.0 <sup>b</sup>	18.5 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>

Los valores representan la media en porcentaje de inhibición  $\pm$  DE. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba de Tukey-Kramer.

Se han reportado que extractos de diversas plantas poseen un efecto inhibidor sobre estas enzimas digestivas debido a su contenido de compuestos fenólicos o ácidos orgánicos los cuales pueden inhibir competitivamente o de manera alostérica con dichas enzimas. Compuestos como el ácido hibiscus e hidroxícítrico de la Jamaica han sido reportados como inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y glucosidasa (Hansawawasdi *et al.*, 2000).

Gao *et al.*, (2013) demostraron *in vitro* que el extracto de té verde o polifenoles procedentes de este, al combinarlos con el fármaco acarbosa presentan un efecto sinérgico en la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. De igual manera Gondoin *et al.*, 2010 reportaron que el extracto de té verde inhibe a la enzima lipasa pancreática.

## **6.5 Efecto del consumo de las bebidas formuladas con extractos herbales sobre el control de la obesidad y sus complicaciones**

### **6.5.1 Consumo de alimento**

Uno de los síntomas que se presentan durante la obesidad es el aumento de apetito, relacionado con la resistencia a la leptina e insulina, provocando un consumo mayor de calorías necesarias (Serradeil-Le *et al.*, 1997). Algunos compuestos naturales como los polifenólicos tienen la facultad de producir un efecto

anorexigénico por lo cual disminuyen el consumo de alimento (D'Alessio, 2008; Panickar, 2013).

En la Figura 12 se observa que el consumo de alimento por rata al comienzo del experimento fue de 14-16.8 g para los grupos con dieta alta en grasa y fructosa, el consumo del grupo control sano fue  $21.1 \pm 0.8$  g. Sin embargo, esta diferencia de consumo fue disminuyendo a lo largo del experimento debido al incremento de consumo por parte de los grupos con dieta alta en grasa y fructosa, donde a partir de la semana trece, ya no hay diferencia en el consumo de alimento entre los grupos control sano, obeso bebida A y bebida C. Sin embargo, el grupo de la bebida B en la semana doce tiene un decremento en el consumo de 18.5% respecto al control obeso, tendencia que se mantuvo en las últimas semanas. En la última semana del experimento el grupo control sano consumió  $23.8 \pm 1.5$  g, el control obeso  $23.1 \pm 0.8$  g y solo se observó una diferencia en el consumo del grupo bebida B ( $19.9 \pm 0.3$  g).

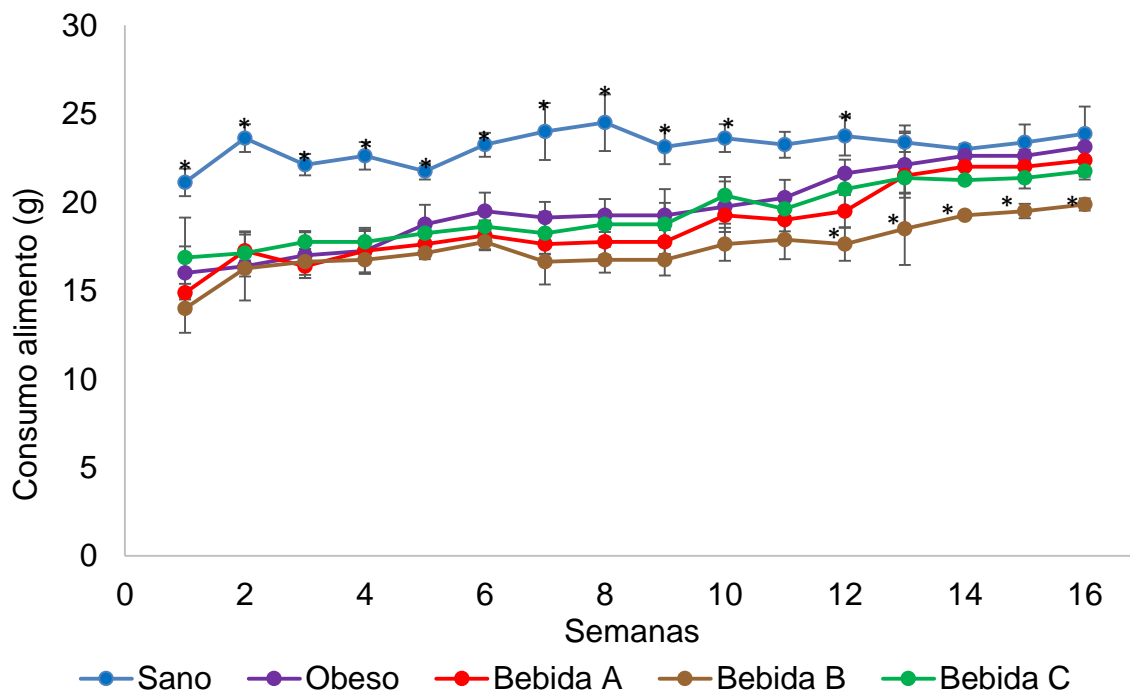


Figura 12. Consumo de alimento de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa y bebidas funcionales. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. \*Indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control obeso, con la prueba de Dunnet.

Lu *et al.* (2012) reportó una disminución en la expresión del gen de grelina por el consumo de extracto de té verde en ratas Sprague Dawley alimentados con una dieta alta en grasa. La grelina es una hormona que actúa a nivel cerebral aumentando el apetito y el consumo de alimento.

### 6.5.2 Peso corporal

En la Figura 13 se presentan los resultados del peso corporal de las ratas a lo largo del experimento. Se puede observar que en la cuarta semana se presentó un incremento del 10% del peso corporal del grupo control obeso respecto al control sano, y en la última semana de tratamiento la diferencia fue de un 27%. La bebida B fue el único tratamiento que disminuyó la ganancia de peso de manera significativa respecto al control obeso con un 10.3%. La bebida A no presentó diferencia significativa, sin embargo, logró disminuir la ganancia hasta un 7.5%.

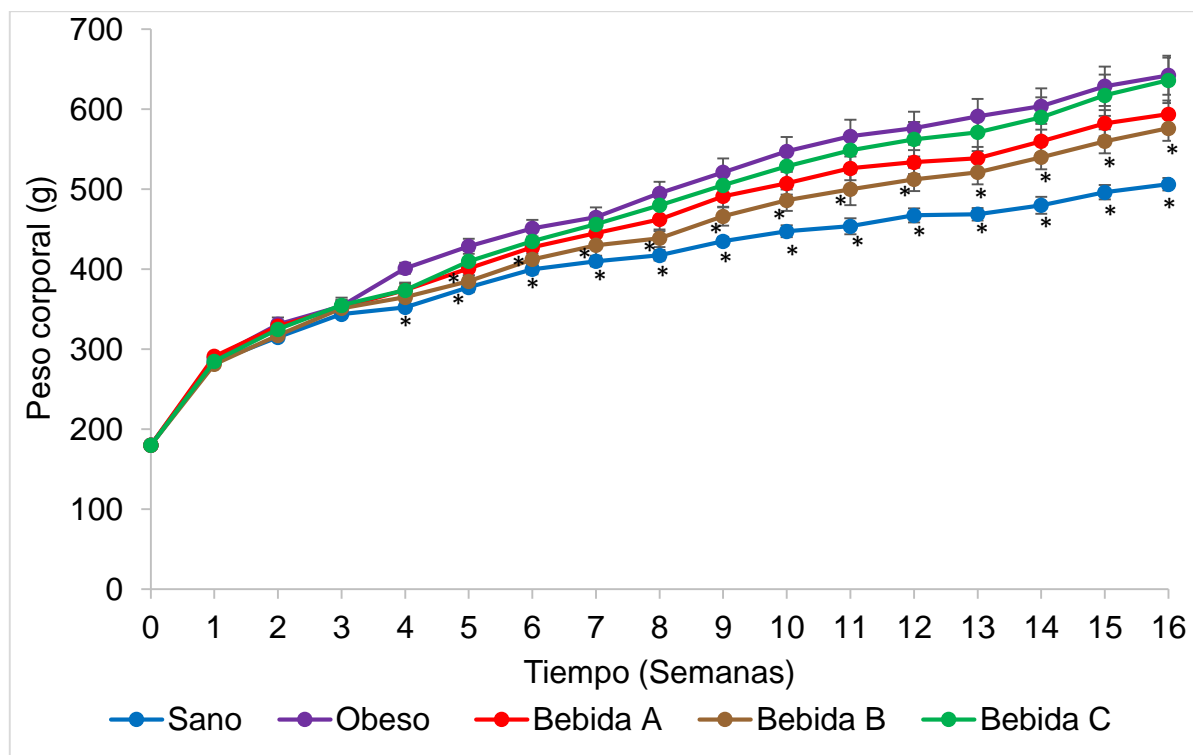


Figura 13. Peso corporal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa y bebidas funcionales. Los valores representan la media  $\pm$  E.E. \*Indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control obeso, con la prueba de Dunnet.

La bebida B en su formulación contenía té verde y se ha reportado en diversos estudios que animales alimentados con una dieta alta en grasa y glucosa, y como tratamiento té verde, disminuyeron el peso corporal, debido principalmente a los compuestos bioactivos como galato de epigallocatequina (Heber *et al.*, 2014).

Los extractos de *H. sabdariffa* por su parte también han demostrado un efecto antiobesogénico, tanto en estudios *in vivo*, como clínicos, entre los compuestos de la Jamaica que poseen esta capacidad se encuentran las antocianinas y el ácido hidroxycítrico (Da-Costa *et al.*, 2014).

En la Figura podemos observar el área bajo la curva (ABC) de los diversos grupos, donde la bebida B presento una disminución del 11.44% del ABC respecto al control obeso seguido por la bebida A con una disminución del 8% y por último la bebida C con un 5.2% presentó la menor disminución de peso.

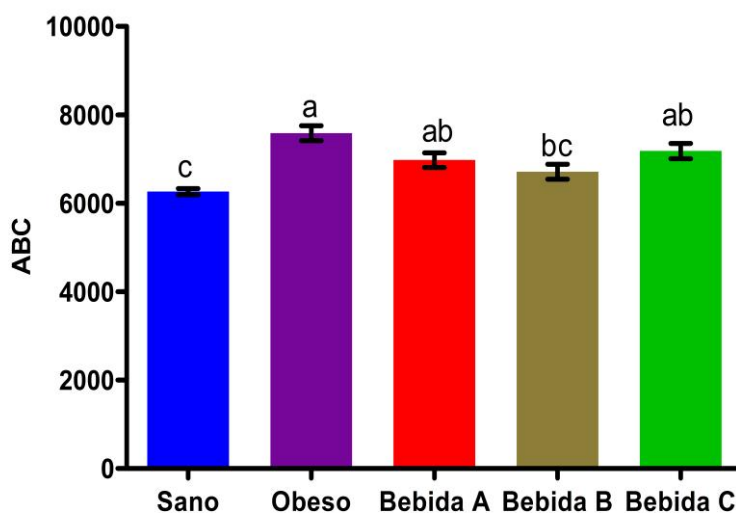


Figura 14. Efecto de las bebidas sobre el área bajo la curva de ganancia de peso corporal. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), con la prueba de Tukey-Kramer.

### 6.5.3 Perfil lipídico

En la obesidad se presenta un estado de dislipidemia, caracterizado por niveles elevados de triglicéridos, LDL (lipoproteínas de baja densidad) y bajos niveles de HDL (Steinberger *et al.*, 2009). Debido a la actividad lipolítica del tejido adiposo visceral aumentan los ácidos grasos libres 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 el Cuadro 17, se observa que no hay diferencia para colesterol total entre los grupos de experimentación. En los niveles de triglicéridos, el control obeso presento 1.9 veces más concentración que el control sano, respecto a las bebidas solo los grupos con la bebida A y B presentaron una reducción del 13.8% y 22.5% respectivamente. Para los niveles de HDL y LDL no se presentaron diferencia estadística significativa entre los diferentes grupos.

Cuadro 17. Efecto de las bebidas sobre el perfil lipídico de los animales obesos

Grupo	Triglicéridos	Colesterol total	HDL	LDL
Sano	77.37 ± 8.2 <sup>b</sup>	62.6 ± 3.4 <sup>a</sup>	34.57 ± 1.3 <sup>a</sup>	47.11 ± 1.4 <sup>a</sup>
Obeso	147.11 ± 15.2 <sup>a</sup>	62.3 ± 2.3 <sup>a</sup>	30.66 ± 0.3 <sup>a</sup>	54.72 ± 2.9 <sup>a</sup>
Bebida A	126.72 ± 6.6 <sup>ab</sup>	53.36 ± 3.1 <sup>a</sup>	31.29 ± 1.0 <sup>a</sup>	46.36 ± 2.9 <sup>a</sup>
Bebida B	113.98 ± 13.6 <sup>ab</sup>	63.48 ± 2.6 <sup>a</sup>	31.63 ± 0.7 <sup>a</sup>	50.47 ± 2.9 <sup>a</sup>
Bebida C	157.27 ± 13.1 <sup>a</sup>	66.40 ± 4.7 <sup>a</sup>	32.41 ± 1.4 <sup>a</sup>	47.14 ± 3.9 <sup>a</sup>

Los valores representan la media en mg/dL ± DE. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba de Tukey-Kramer.



Se ha reportado que el consumo de extracto de Jamaica en diferentes modelos de animales y estudios clínicos tiene un efecto reductor de los niveles séricos de triglicéridos atribuido principalmente a compuestos como las antocianinas y el ácido protocatecuico (Da Costa *et al.*, 2014).

#### 6.5.4 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 15 muestra que el grupo control obeso presentó un aumento en la excreción de triglicéridos respecto al control sano en un 42%. Los grupos tratados con las bebidas B y C no mostraron diferencia significativa respecto al control obeso a pesar de que el grupo de la bebida B aumento su excreción en un 30%. El grupo que consumió la bebida A presenta la mayor excreción de triglicéridos (2.19 mg/g  $\pm$  0.8), lo que representa un 71% en comparación al control obeso.

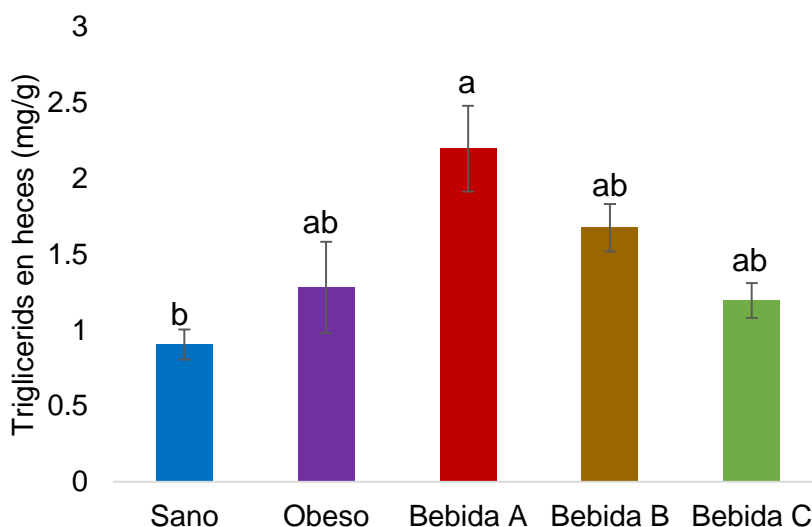


Figura 15. Efecto de las bebidas sobre la concentración de triglicéridos en heces de los animales de experimentación. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), con la prueba de Tukey-Kramer.

Como ya se mencionó, la bebida A obtuvo la mayor inhibición de la lipasa pancreática *in vitro* y el grupo tratado con esta bebida presentó la mayor excreción de triglicéridos en heces. Lo anterior sugiere que la inhibición de absorción de lípidos de la dieta puede ser uno de los mecanismos por lo cual el grupo tratado con la bebida A disminuyó la ganancia de peso en 7.5% respecto al control obeso.

### **6.5.5 Resistencia a la insulina**

En el sobrepeso y la obesidad aumenta la inflamación crónica de bajo grado, dicha inflamación puede provocar resistencia a la insulina. En este estado, el hígado aumenta la producción de glucosa, provocando a su vez mayor síntesis de insulina dando lugar a un estado de hiperinsulinemia (Taniguchi *et al.*, 2006).

El grupo control obeso presentó un 21.4% mayor concentración de glucosa en comparación al grupo control sano. Los grupos de las tres bebidas presentaron una disminución en la concentración de glucosa respecto al control obeso, siendo el grupo de la bebida B quien presentó el mayor decremento, sin embargo, este efecto no fue significativo. La concentración de insulina aumento 1.7 veces en el grupo control obeso respecto al control sano. El único tratamiento que disminuyo la concentración de insulina fue la bebida A, en un 19% respecto al control obeso. La bebida B y C mostraron valores similares al control obeso (Cuadro 18).

El índice HOMA (Homeostasis model assessment) es un método simple que permite evaluar el grado de resistencia a la insulina, mediante las concentraciones de glucosa e insulina. En el Cuadro 18 se observa que el grupo control obeso presento un índice 2.18 veces mayor que el control sano. Los tratamientos tuvieron un decremento respecto al control obeso, siendo la bebida A la que tuvo el mayor decremento con 23.8%.

Otra proteína evaluada fue la resistina, la cual obtiene su nombre de resistencia a la insulina, esta es secretada por los macrófagos del tejido adiposo, y dicha molécula se incrementa cuando se presenta obesidad y resistencia a la insulina. La concentración de resistina en el grupo control obeso fue 2.8 veces mayor respecto al grupo control sano. Todos los tratamientos tuvieron una menor concentración de resistina respecto al obeso siendo la bebida B, la que presentó la menor concentración con 0.54 ng/mL seguido por la bebida A con niveles de 0.68 ng/mL (Cuadro 18).

La concentración de leptina del grupo obeso fue 4.2 veces mayor a la del grupo sano. Todos los grupos tratados con las diferentes bebidas presentaron una disminución de leptina respecto al grupo obeso, hasta de 56.5%, mostrando el mayor efecto los grupos de las bebidas A y B (Cuadro 18). La leptina es una molécula secretada principalmente por los adipocitos y principalmente relacionada con metabolismo de nutrientes y control de peso, la leptina ayuda a disminuir la acumulación de lípidos en el hígado y musculo esquelético a través de la activación indirecta de AMPK, sin embargo durante procesos como la obesidad se presenta un resistencia a esta adipocitocina aumentando su concentración en suero y permitiendo la acumulación de lípidos en diversos tejidos (Yadav *et al.*, 2013).

Cuadro 18. Efecto de las bebidas sobre la resistencia a la insulina y marcadores de inflamación en suero de los animales en estudio.

<b>Grupo</b>	<b>Glucosa (mg/dL)</b>	<b>Insulina (ng/mL)</b>	<b>Índice HOMA</b>	<b>Leptina (pg/mL)</b>	<b>Resistina (ng/mL)</b>
<b>Sano</b>	92.3 ± 4.9 <sup>b</sup>	1.26 ± 0.18 <sup>b</sup>	7.1 ± 1.2 <sup>b</sup>	704 ± 73 <sup>c</sup>	0.56 ± 0.17 <sup>b</sup>
<b>Obeso</b>	112.1 ± 6.2 <sup>a</sup>	2.24 ± 0.19 <sup>a</sup>	15.5 ± 1.8 <sup>a</sup>	2967 ± 29 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.39 <sup>a</sup>
<b>Bebida A</b>	104.1 ± 6.3 <sup>ab</sup>	1.81 ± 0.19 <sup>ab</sup>	11.8 ± 1.5 <sup>ab</sup>	1290 ± 20 <sup>bc</sup>	0.68 ± 0.10 <sup>b</sup>
<b>Bebida B</b>	96.4 ± 4.8 <sup>ab</sup>	2.26 ± 0.22 <sup>a</sup>	13.6 ± 1.7 <sup>ab</sup>	1685 ± 26 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.08 <sup>b</sup>
<b>Bebida C</b>	106.3 ± 5.0 <sup>ab</sup>	2.21 ± 0.24 <sup>a</sup>	14.9 ± 2.1 <sup>ab</sup>	1655 ± 21 <sup>bc</sup>	0.77 ± 0.16 <sup>ab</sup>

Los valores representan la media ± EE. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05) con la prueba de Tukey-Kramer.

Estudios con diversos extractos de plantas reportan una disminución de insulina, leptina y resistina. Joven *et al.* (2014), administraron extracto de polifenoles de *H. sabdariffa* (125 mg/kg/ día) por cuatro semanas a un grupo de personas con síndrome metabólico, observando una disminución de los niveles séricos de leptina. De igual manera Xu *et al.* (2015) reportaron un decremento en la concentración de leptina en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y tratadas con los polifenoles de *C. sinensis*.

Otra proteína relacionada con inflamación es la IL-6. En la Figura 16 se muestra la concentración de esta proteína en el suero de los grupos experimentales donde el grupo control obeso presenta una concentración 7.3 veces mayor al control sano. Los grupos tratados con las bebidas disminuyeron su concentración respecto al control obeso, siendo las bebidas A y C las que presentaron mayor disminución con un 21.7 % y 29.8 % respectivamente.

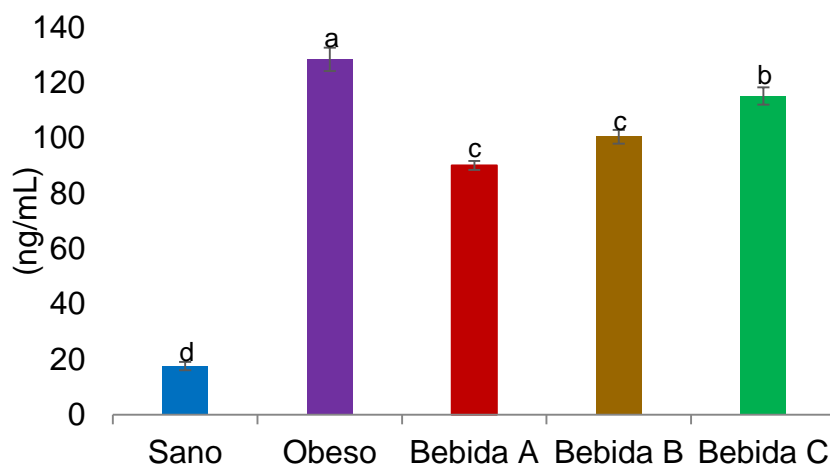


Figura 16. Concentración de IL-6 en suero de los animales de los grupos experimentales. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), con la prueba de Tukey-Kramer.

El tejido adiposo contribuye hasta en un 35% con la IL-6 circulante por lo cual durante un proceso inflamatorio como el que se presenta durante la obesidad hay un aumento de IL-6, citocina relacionada con la resistencia a la insulina debido a

que fosforila en residuos de serina y treonina al substrato del receptor de insulina (IRS-1), disminuyendo la cascada de señalización.

Estudios *in vitro* demostraron que EGCG, constituyente del té verde, inhibe la inflamación, disminuyendo la concentración de CRP en macrófagos estimulados con TNF- $\alpha$  e IL-6 (Li *et al.*, 2012). La administración de polifenoles y polisacáridos del té verde por un periodo de 6 semanas disminuye la expresión del de IL-6 en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (Xu *et al.*, 2015)

## 6.5.6 Evaluación de daño hepático

### 6.5.6.1 Triglicéridos en hígado

Durante la obesidad debido al alto consumo de ácidos grasos se excede la capacidad del adipocito para poder almacenar estos ácidos grasos, además la resistencia a la insulina provoca que se realice lipólisis en el organismo, dando como resultado un aumento de ácidos grasos 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 ácidos grasos libres (McCullough, 2004).

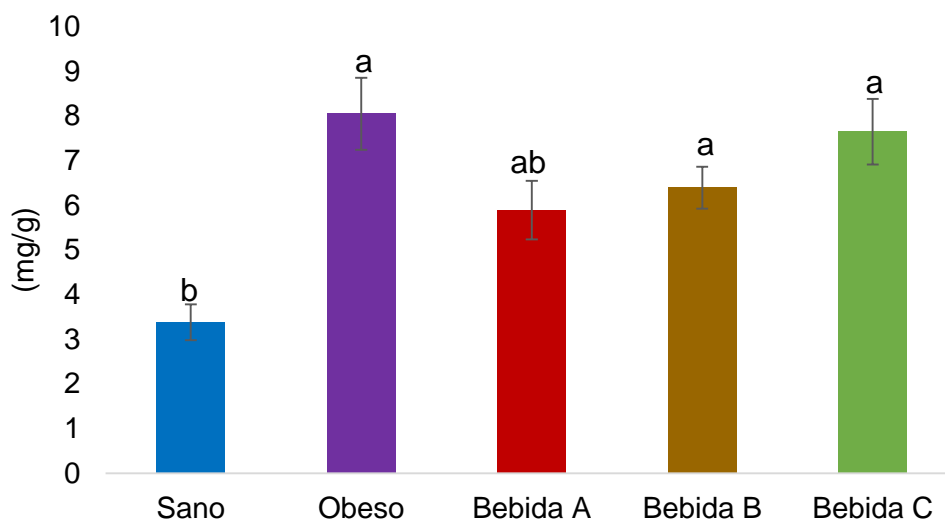


Figura 17. Efecto de las bebidas sobre la concentración de triglicéridos en hígado de los animales obesos. Los valores representan la media  $\pm$  D.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), con la prueba de Tukey-Kramer.

Los resultados de la concentración de triglicéridos en hígado son presentados en la Figura 17, donde se puede observar que el grupo control obeso presento 2.38 veces mayor concentración que el grupo control sano. El grupo de la bebida A presento menor concentración con una disminución de un 34% en comparación al control obeso.

Durante la esteatosis no alcohólica presente en pacientes con obesidad se ha observado una elevada concentración circulante de leptina, la cual aumenta el proceso de lipotoxicidad y en consecuencia la progresión de esteatosis y fibrosis hepática. De igual manera, la resistina aumenta su concentración en la circulación durante un proceso de esteatosis (Vettickattuparambil & Thekkuttuparambil, 2014). El grupo tratado con la bebida A presento la menor concentración de leptina ( $1290.5 \pm 73.2$  pg/mL) e insulina ( $1.81 \pm 0.19$  ng/mL) presentando un decremento en la concentración de triglicéridos en hígado de un 26.7% respecto al control obeso. Por otro lado el grupo tratado con la bebida B presento la menor concentración de resistina ( $0.53 \pm 0.08$  ng/mL) y un decremento de 20.5% en triglicéridos en hígado

La disminución observada en la concentración de triglicéridos en los grupos tratados con las bebidas puede deberse a una menor absorción de triglicéridos de la dieta, por una disminución de síntesis de *novo* o por aumento de la  $\beta$ -oxidación, se ha reportado que diversos compuestos como las antocianinas, catequina, epigallocatequina galato, curcumina entre otros pueden activar AMPK lo cual inhibe la lipogénesis y aumentan la  $\beta$ -oxidación lo cual ocasiona una menor acumulación de triglicéridos en el hígado (Zang *et al.*, 2006).

### 6.5.6.2 Actividad de enzimas relacionadas con daño hepático

La enzima aspartato amino transferasa (AST) es una enzima intracelular abundante en órganos como el corazón e hígado que cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al  $\alpha$ -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato, su elevada concentración en suero no es específica de un daño hepático pero sugiere un posible daño, por lo cual se miden otras enzimas como la enzima alanino amino transferasa (ALT), esta enzima transfiere un grupo amino de la alanina al  $\alpha$ -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El aumento de ALT en suero es más específico e indicativo de un posible daño hepático. Estos estudios clínicos suelen completarse con la medición en suero de la fosfatasa alcalina (ALP), enzima presente en todos los tejidos del organismo pero con mayor concentración en el sistema óseo, hígado y riñón (Bayard *et al.*, 2006).

En este estudio no se presentaron cambios en la actividad de las enzimas AST y ALP en los grupos de experimentación (Cuadro 19). Por otro lado, la actividad de la enzima ALT aumentó en los grupos tratados con la dieta alta en grasa y fructosa, el grupo obeso mostró 1.9 veces más actividad en comparación al grupo sano. Dentro de los grupos tratados, el grupo de la bebida B y el de la bebida A, presentaron un decremento del 22.5 % y 13.8% en la actividad de esta enzima respecto al control obeso (Cuadro 19).

Cuadro 19. Actividad de enzimas de daño hepático de animales tratados con las diferentes bebidas funcionales

Grupo	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)
Sano	62.6 ± 3.4 <sup>a</sup>	77.3 ± 8.26 <sup>b</sup>	34.5 ± 1.3 <sup>a</sup>
Obeso	62.3 ± 2.3 <sup>a</sup>	147.1 ± 15.2 <sup>a</sup>	30.6 ± 0.3 <sup>a</sup>
Bebida A	53.3 ± 3.1 <sup>a</sup>	126.7 ± 6.5 <sup>ab</sup>	31.2 ± 1.0 <sup>a</sup>
Bebida B	63.4 ± 2.5 <sup>a</sup>	113.9 ± 13.6 <sup>ab</sup>	31.6 ± 0.7 <sup>a</sup>
Bebida C	66.4 ± 4.7 <sup>a</sup>	157.2 ± 13.1 <sup>a</sup>	32.4 ± 1.4 <sup>a</sup>

Los valores representan la media  $\pm$  DE. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba de Tukey-Kramer.

### **6.5.6.3 Estudio histopatológico de hígado**

Para confirmar posibles alteraciones hepáticas es recomendable realizar estudios histopatológicos. Este estudio histopatológico permite observar la integridad del tejido y definir el grado de esteatosis (Sattar *et al.*, 2014). En las microfotografías de la Figura 18a se observa que el tejido hepático del grupo control sano no presenta daño y es clasificado como grado 0 de acuerdo a la clasificación de Brunt. La figura 18b correspondiente al grupo obeso muestra claras vacuolas dentro de los hepatocitos, siendo clasificado como grado 3 donde hay vacuolas de grasa en más del 66% de hepatocitos. En la figura 18c se observa que el grupo que consumió la bebida A, presenta una menor cantidad de vacuolas, clasificado como grado 1 (<33% de hepatocitos con vacuolas). Los grupos que consumieron la bebida B y C son clasificados como grado 2 (33-66% de hepatocitos con vacuolas) correspondientes a las figuras 18d y 18e respectivamente.



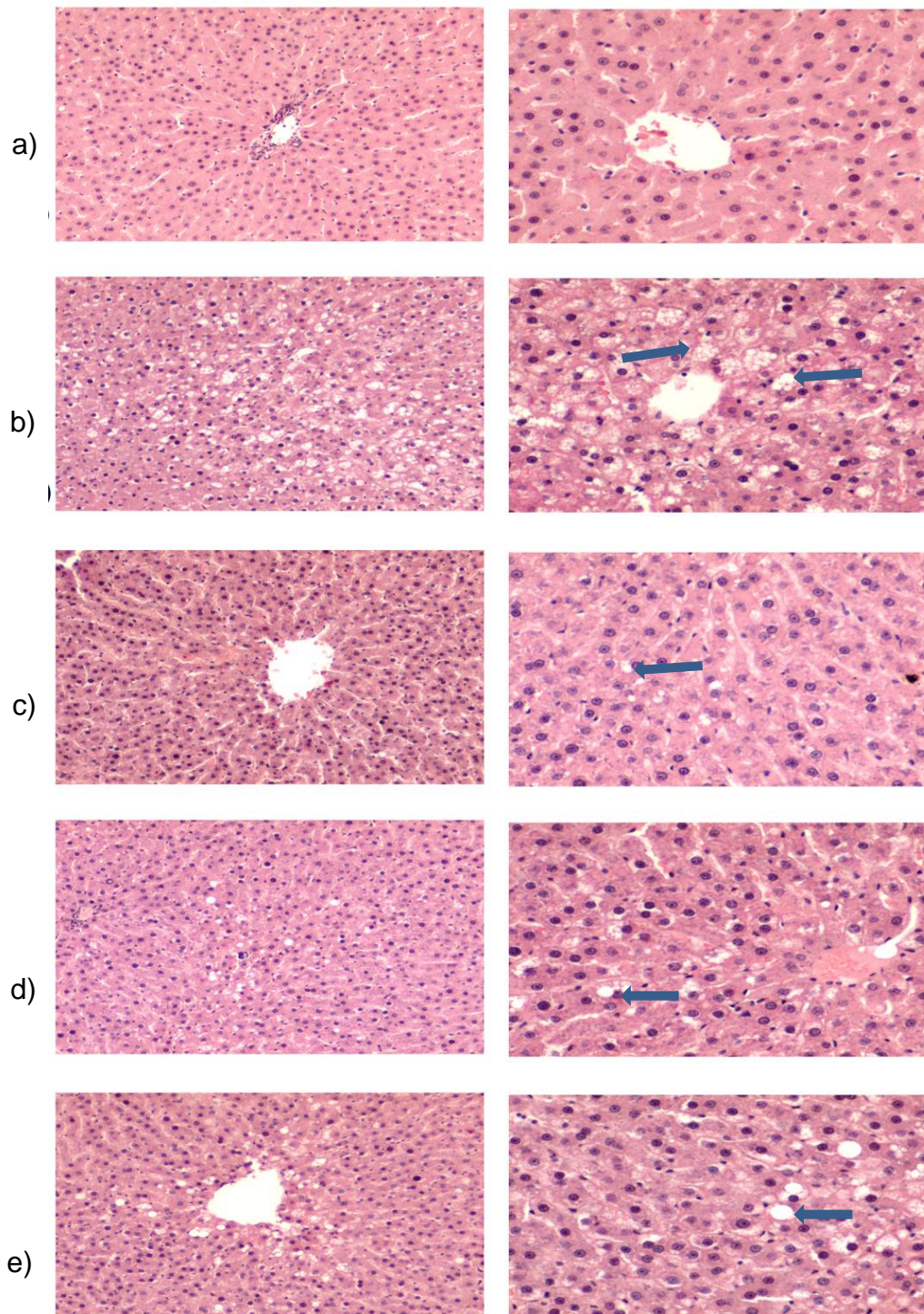


Figura 18. Microfotografías de tejido hepático de los grupos de experimentación. Tinción de hematoxilia y eosina, amplificación de 100x (izquierda) y 200x (derecha). a) Control sano, b) control obeso, c) bebida A, d) bebida B, e) bebida C. La flecha señala los depósitos de lípidos.

## **VII. Conclusiones**

Las bebidas elaboradas a base de extracto de Jamaica (A), cocolmecha / té verde / hierbabuena (B) y hierbabuena / cocolmecha / hierba del sapo (C) fueron aceptadas sensorialmente, la segunda formulación presento la mayor concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y mayor capacidad antioxidante e inhibición de enzimas digestivas.

Las tres bebidas preservaron sus propiedades fisicoquímicas y microbiológicas después de 5 semanas de almacenamiento a 25 °C. Sin embargo, los compuestos fenólicos presentan una ligera disminución como los flavonoides que disminuyeron en un 11% en la bebida de Jamaica.

El consumo de la bebida A y B disminuyeron el peso corporal y este efecto no está relacionado con un menor consumo de alimento. Posiblemente podría asociarse a una disminución de la actividad de enzimas relacionadas con la digestión de almidón y lípidos en el intestino.

La menor concentración de triglicéridos en suero en los animales tratados con la bebida A (Jamaica), puede relacionar con una mayor eliminación de triglicéridos en la dieta, menor depósito en el hígado, sin embargo, la bebida B no muestra esta asociación.

El consumo de la bebida C no disminuyó el peso corporal y su consumo no mostro efecto protector para las consecuencias por el consumo de dieta alta en grasa y fructosa en los animales tratados.

Las bebidas a base de jamaica, cocolmecha y té verde, y endulzadas con estevia pueden ser una alternativa para el control de la obesidad y sus complicaciones.

## VIII. Referencias bibliográficas

**Ahmad N**, Fazal H, Ahmad I, Abbasi BH. Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* species. *Toxicol Ind Health*. 28, **2012**.

**Al-Bradeldin H**, Al-Wabel N, Gerald B. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L: a review. *Phytother Res*, **2005**. 19:369-375.

**American Diabetes Association**. *Diabetes Care*. **2012**. 35:564-572.

**Amezcuca L**, Springall R, Bojalil R. Proteína C Reactiva: aspectos cardiovasculares de una proteína de fase aguda. *Arch Card Méx*. **2007**. 77: 58-66.

**Anesini C**, Ferraro G, Filip R. Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Commercially Available Tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Agric. Food Chem*. **2008**. 56:9225–9229

**Anton SD**, Martin CK, Han H, Coulon S, Cefalu WT, Geiselman P, Williamson DA. Effects of stevia, aspartame and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, **2010**. 55: 37-43.

**Apostolidis E**, Kwon Y and Shetty K, Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innov Food Sci Emerg Technol*. **2007**. 8: 46-54.

**Badal R**, Badal D, Badal P, Khare A, Shrivastava J, Kumar V. Pharmacological Action of *Mentha piperita* on Lipid Profile in Fructose-Fed Rats. *Iran J Pharm Res*. **2011**. 10: 843–848.

**Barbalho SM**, Damasceno DC, Spada APM, Silva VSD, Martuchi KA, Oshiiwa M, Machado F, Mendes CG. Metabolic profile of offspring from diabetic Wistar rats treated with *Mentha piperita* (peppermint). *Evid-based compl alterna*. **2011**. 1:1-6.

**Bayard M**, Holt J, Boroughs E. Nonalcoholic fatty liver disease. *Am Fam Physician*. **2006**. 73:1961-1968.

**Birari R**, Bhutani K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today*. **2007**. 12: 879-889.

**Brand-Williams W**, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*. **1995**. 28: 25-30

**Bruhn C**. Aspectos de calidad y seguridad alimentaria de interés para el consumidor. En *Tecnología Pos-cosecha de Productos Hortofrutícolas*. 3ª edición.

**Brunt A**, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol*. **1998** 15:246-58.

**Chang JC**, Wu MC, Liu IM, Cheng JT. Increase of insulin sensitivity by stevioside in fructose-rich chow-fed rats. *Horm Metab Res*. **2005**. 37: 610-616.

**Chen CC**, Hsu JD, Wang SF, Chiang HC, Yang MY, Kao ES, Ho YC, Wang CJ. *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Agric Food*. **2003**.51: 5472-77.

**Chen M**, Trinnaman L, Bardsley K, St Hilaire C, Da Costa N. Volatile compounds and sensory analysis of both harvests of double-cut Yakima peppermint (*Mentha piperita* L.). *J Food Sci*. **2011**. 76:1032-1038.

**D'Alessio D**. Intestinal hormones and regulation of satiety: the case for CCK, GLP-1, PYY, and Apo A-IV. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. **2008**. 32:567-8

**Da-Costa-Rocha I**, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinri M. *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chem*. **2014**. 165:424–443.

**Dorman HJ**, Kosar M, Baser KHC, Hiltunen R. Phenolic profile and antioxidant evaluation of *Mentha piperita* L. extracts. *Nat Prod Commun*. **2009**. 4: 535-542.

**De-Sales P**, De-Souza P, Simeoni L.  $\alpha$ -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. *J Pharm Pharmaceut Sci*. **2012**. 15:141–183.

**Eckel R**, Grundy S. Insensibilidad a la insulina y obesidad: la causa subyacente. *Diab Voic*. **2006**. 51: 28-30.

**Elmarakby A**, Abdelsayed R, Liu J, Mozaffari M. Inflammatory cytokines as predictive markers for early detection and progression of diabetic nephropathy. *EPMA J*. **2010**. 1:117-129.

**Fernández-Sanchez** A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sanchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-Gonzalez JA. Inflammation, oxidative stress and obesity. *Int J Molec Sci.* **2011.** 12: 3117-32.

**Friedman** M, Jürgens H. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J AgricFood Chem.* **2000.** 48:2101–2110.

**Galicia-Flores** L Salinas Y, Espinoza B, Sánchez-Feria C. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* **2008.** 14:121-129.

**Gao** J, Xu P, Wang Y, Wang Y, Hochstetter D. Combined Effects of Green Tea Extracts, Green Tea Polyphenols or Epigallocatechin Gallate with Acarbose on Inhibition against  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase *in Vitro*. *Molecules* 2013, 18:11614-11623.

**Giacco** F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *J Am Heart Assoc.* **2010.** 107:1058-1070.

**Giusti** MM, Wrolstad ER. Caracterización and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. **2000.** *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* F:F1:F1.2.

**Gondoin** A, Grussu D, Stewart D, McDougall G. White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase *in vitro*. *Food Res Intern.* 2010. 43: 1537-1544.

**Gregersen** S, Jeppesen PB, Holst JJ, Hermansen K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism,* **2004.** 53: 73

**Halberg** N, Wernstedt I, Scherer P. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metabol Clin North Am.* **2008.** 37: 1-15.

**Hansawasdi** C, Kawabata J, Kasai T. Alpha-amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Biosci Biotechnol Biochem.* **2000.** 64:1041-3.

**Heber** D, Zhang Y, Yang J, Ma J, Henning S, Li Z. Green tea, black tea, and oolong tea polyphenols reduce visceral fat and inflammation in mice fed high-fat, high-sucrose obesogenic diets. *J Nutr.* **2014.** 144:1385-93.

**Hopkins** A, Lamm M, Funk J, Ritenbaugh C. Hibiscus sabdariffa L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia*. **2013**. 85:84-94.

**Hough** G y Fiszman S. Estimación de la vida útil de los alimentos. *Cyted*. 2005. 13.

**Hsu** T, Kusumoto A, Abe K, Hosoda K, Kiso Y, Wang M, Yamamoto S. Polyphenol-enriched oolong tea increases fecal lipid excretion. *European Journal of Clinical Nutrition*. **2006**. 60:1330–1336.

**Jafar** TH, Stark PC, Schmid CH, Landa M, Maschio G, de Jong P, de Zeeuw D, Shahinfar S, Toto R, Levey AS. Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta analysis. *Ann Intern Med*. **2003**. 139: 244-252.

**Jakobsdottir** G, Xu J, Molin G, Ahrne S, Nyman M. High-Fat Diet Reduces the Formation of Butyrate, but Increases Succinate, Inflammation, Liver Fat and Cholesterol in Rats, while Dietary Fibre Counter acts These Effects. *PLoS One*. **2013**. 8:1-15.

**Jiang** T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T, Lucia MS, Li J, Levi M. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element- binding protein-1c-dependent pathway. *J Biol Chem*. **2005**. 280: 32317–32325.

**Joven** J, March I, Espinel E, Fernandez S, Rodríguez E, Aragonés G. Hibiscus sabdariffa extract lowers blood pressure and improves endothelial function. *Mol. Nutr. Food Res*. **2014**. 58:1374–1378.

**Kandra** L, Zajacz A, Remenyik J, Gyemant G. Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary alpha-amylase. *Biochem Biophys Res Commun*, **2005**. 334: 824-828.

**Karasu** C. Glycoxidative Stress and Cardiovascular Complications in Experimentally Induced DM2: Effects of Antioxidant Treatment. *Open cardiovasc med j*. **2010**. 4:240-256.

- Kuriyan R**, Kumar DR, Rajendran R, Kurpad AV. An evaluation of the hypolipidemic effect of an extract of *Hibiscus sabdariffa* leaves in hyperlipidemic Indians: a double blind, placebo controlled trial. *BMC Comp Alt Med*. **2010**. 10: 01-08.
- Lansky E**, Newman R. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol*; **2007**.109:177-206.
- Lesschaveae I**, Noble A. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am J Clin Nutr*. **2005**. 81(suppl):330S–5S.
- López-Capapé M**, López-Bermejo A, Alonso-Blanco M, Lara E, Corbatón J y Barrio R. Esteatosis hepática, resistencia a la insulina y adiponectina en una población con obesidad. *An Pediatr (Barc)*. **2009**.71:495–501.
- Li M**, Liu J, Pang X, Han C, Mao J. Epigallocatechin-3-gallate inhibits angiotensin II and interleukin-6-induced C-reactive protein production in macrophages. *Pharmacol Rep*. **2012**. 64:912-8. .
- Liu Y**, Hu M. Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perfused rat intestinal model. *Drug Metabol Dispos*. **2002**. 30: 370-377.
- Lu C**, Zhu W, Shen C, Gao W. Green tea polyphenols reduce body weight in rats by modulating obesity-related genes. *PLoS One*. **2012**. 7:1-11.
- Mamadou Sarr**, Ngom S, Kane MO, Wele A, Diop D, Sarr B, Gueye L. In vitro vasorelaxation mechanisms of bioactive compounds extracted from *Hibiscus sabdariffa* on rat thoracic aorta. *Nutr Met*. **2009**. 6: 1-12.
- Mani R**, Badal D, Badal P, Khare A, Shrivastava J, Kumar V. Pharmacological Action of *Mentha piperita* on Lipid Profile in Fructose-Fed Rats. *Iran J Pharm Res*. **2011**. 10: 843-848.
- Manzur F**, Alvear C, Alayón A. Adipocytes, visceral obesity, inflammation and cardiovascular disease. *Rev Colomb Cardiol*. **2010**. 17: 207-213.
- Maiz A**. El síndrome metabólico y riesgo cardiovascular. *Bol Esc Med*. **2005**. 30: 25-30.

**McCullough A.** The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis.* **2004.** 8:521-33.

**McDougall G,** Kulkarni N y Stewart D. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity *in vitro*. *Food Chemistry.* **2009.** 115: 193–199.

**McKay DL,** Chen CY, Saltzman E, Blumberg JB. Hibiscus sabdariffa L. Tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *J Nutr.* **2010.** 140: 298-303.

**Mohsen M,** Hasan S. Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients.* **2010.** 2:737-751.

**Mozaffari-Khosravi H,** Jalali-Khanabadi B, Afkhami-Ardekani M, Fatehi F. Effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on lipid profile and lipoproteins in patients with type II diabetes. *J Altern Complement Med.* **2009.** 15:899-903.

**Nagle C,** Klett E, Coleman R. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res.* **2009.** 50: S74–S79

**Noriega-cisneiros R,** Ortiz O, Esquivel E, Clemente M, Manzo S, Salgado R, Cortés C, Boldogh I, Saavedra A. Hypolipidemic Activity of *Eryngium carlinae* on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biochem Res Int.* **2012.** 2012: 1-5

**NOM-008-SSA3-2010** NORMA Oficial Mexicana, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad.

**NOM-218-SSA1-2011** NORMA Oficial Mexicana, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba.

**Nwachukwu D,** Aneke E, Nwachukwu N, Obika L, Nwagha U, Eze A. Effect of Hibiscus sabdariffa on blood pressure and electrolyte profile of mild to moderate hypertensive Nigerians: A comparative study with hydrochlorothiazide Niger *J Clin Pract.* **2015.** 18:762-70.

**Olatunji L,** Usman T, Adebayo J, Olatunji V. Effects of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* on renal Na(+)-K(+)-ATPase and Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase activities in Wistar rats. *J Chin Integr Med.* **2012.** 10:1049-55.



**Organización Mundial de la Salud (OMS), 2012.**

**Panickar K.** Effects of dietary polyphenols on neuroregulatory factors and pathways that mediate food intake and energy regulation in obesity. *Mol Nutr Food Res.* **2013** 57:34-47.

**Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med.* **1999.** 26: 1231-1237.

**Rivera JA, Muñoz-Hernández O, Rosas-Peralta M, Aguilar-Salinas CA, Popkin BM, Willett W.** Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Salud Pub Mex.* **2008.** 50:172-94.

**Rivera JA, Velasco B, Carriedo A.** Consumo de refrescos, bebidas azucaradas y el riesgo de obesidad y diabetes. *Salud Pub Mex.* **2013.** 50:172-94.

**Sabater D, Agnelli S, Arriarán S, et al.** Altered Nitrogen Balance and Decreased Urea Excretion in Male Rats Fed Cafeteria Diet Are Related to Arginine Availability. *BioMed Res Int.* **2014.** 1:9. VOL

**Sattar N, Forrest E, Preiss D.** Non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ.* **2014.** 349.

**Secretaría de salud.** Encuesta nacional de salud y nutrición. **2012.**

**Secretaría de Salud.** Prevención y diagnóstico de sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes en el primer nivel de atención, México, **2008;** 1-27.

**Secretaría de Salud.** Instituto Nacional de Salud Pública. Boletín de Práctica Médica Efectiva, Obesidad Infantil, Noviembre 2006. **2006.** Consultada el 02 de diciembre del 2013 en [http://www.insp.mx/Portal/Centros/ciss/nls/boletines/PME\\_14.pdf](http://www.insp.mx/Portal/Centros/ciss/nls/boletines/PME_14.pdf).

**Sharafi SM, Rasooli I, Owlia P, Taghizadeh M, Astaneh SD.** Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. *Pharmacogn Mac.* **2010.** 6:147-153.

**Singleton V, Orthofer R, Lamuela R.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol.* **1999.** 299:152-178.

**Spelman** K, Burns J, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, Tenborg M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Altern Med Rev.* **2006.** 11:128-50.

**Serradeil-Le** C, Raufaste D, Brossard G, Pouzet B, Marty E, Maffrand J, Le Fur G. Characterization and localization of leptin receptors in the rat kidney. *FEBS Lett.* **1997.** 404:185-191.

**Steinberg** J, Daniels SR, Eckel RH, Hayman L, Lustig RH, McCrindle B, Mietus-Snyder ML. Progress and challenges in metabolic syndrome in children and adolescents. *Circulation.* **2009.** 119: 628-647.

**Suganami** T, Tanaka M, Ogawa Y. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. *Endocrine J.* **2012.** 59:849-857.

**Tavarini** S, Angelini L. *Stevia rebaudiana Bertoni* as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. *J Sci Food Agric.* **2013.** 93:2121-9.

**Taniguchi** CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2006.** 7:85–96.

**Tsai** P, Huang H. Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. *Food Res Intern.* **2004.** 37:313–318.

**Vettickattuparambil** G, Thekkuttuparambil A. Role of adipokines and peroxisome proliferator-activated receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* **2014.** 6: 570-579.

**Wagner** G. Cellular and Subcellular Location in Plant Metabolism. *Recent advances in Phytochemistry.* **1982.** 1-45.

Wolf G, Ziyadeh F. Leptin and renal fibrosis. *Contrib Nephrol.* **2006.** 151:175-83.

**Xu** Y, Zhang M, Wu T, Dai S, Xu J, Zhoua Z. The anti-obesity effect of green tea polysaccharides, polyphenols and caffeine in rats fed with a high-fat diet. *Food Funct.* **2015.** 6:296-303

**Yadav** A, Kataria M, Saini V. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica Chimica Acta.* **2013.** 80–84

**Zang** M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*. **2006**. 55:2180-91.