

Jesús Eduardo
Serna Tenorio

Efecto del subproducto de la decocción de jamaica (*Hibiscus
sabdariffa* L.) sobre las alteraciones metabólicas en un modelo
in vivo de diabetes mellitus tipo 2 de Maestría en Ciencias de
la Nutrición Humana.

2023



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**“Efecto del subproducto de la decocción de
jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) sobre las alteraciones
metabólicas en un modelo *in vivo* de diabetes mellitus
tipo 2.”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta

Jesús Eduardo Serna Tenorio

Dirigido por

Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola

Codirigido por

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Querétaro, Qro. Diciembre 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Efecto del subproducto de la decocción de jamaica
(Hibiscus sabdariffa L.) sobre las alteraciones
metabólicas en un modelo in vivo de diabetes
mellitus tipo 2.

por

Jesús Eduardo Serna Tenorio

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNMAC-309390



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana

**“Efecto del subproducto de la decocción de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)
sobre las alteraciones metabólicas en un modelo *in vivo* de diabetes mellitus
tipo 2.”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

Jesús Eduardo Serna Tenorio

Dirigido por:

Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola

Codirigido por:

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola.
Presidente

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez.
Secretario

Dra. Rosalía Reynoso Camacho.
Vocal

Dra. Olga Patricia García Obregón.
Suplente

Dra. Iris del Carmen Nieves Anaya.
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

México



DEDICATORIAS

A Dios y mi madre María, por mostrarme el camino correcto, y darme fuerza en los momentos difíciles, por mantener mi llama de amor encendida en medio de las situaciones.

A Citlally Elizabeth Serrato González, por darme ánimos aun después de formar parte de la bella eternidad, por enseñarme que el amor se puede demostrar aun después del final.

A mis padres, Rosaura y Jesús, por siempre apoyarme en cumplir todos mis sueños y nunca desistir en su amor y aceptación hacia mí y mis metas.

A Sofía, Santiago y Naomi, por ser los sobrinos a los cuales quiero darles muchas oportunidades tales como me las han dado a mí.

A Osmayda, Omar y Javier, por estar y darme ánimos, apoyo, regalos, pero sobretodo, mucho amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por brindarme el apoyo económico necesario durante este proyecto de investigación.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, la Facultad de Ciencias Naturales y la Facultad de Química por abrirme las puertas de su casa y permitirme aumentar mis capacidades.

A la Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez, millones de gracias por sus conocimientos y el apoyo que me dio, pero sobretodo, agradecido estaré por siempre por ser un apoyo emocional y mental, y permitirme ser tal como soy en mi proceso de aprendizaje. Es y será uno de mis mejores ejemplos de lo que el mundo de la ciencia necesita, sabiduría y humanidad.

A la Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola por su apoyo constante, dirección y recomendaciones dentro de mi formación académica y en el proyecto realizado.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Rosalía Reynoso, Dra. Olga Obregón y Dra. Iris de las Nieves, por cada una de sus observaciones y aportaciones de calidad.

A mis compañeros Estefanía, Adriana y Román por ser un pequeño grupo, pero una gran familia.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1. Diabetes mellitus | 3 |
| 2.1.1. Diabetes mellitus tipo 2 | 4 |
| 2.1.2. Resistencia a la insulina | 5 |
| 2.1.3. Alteraciones metabólicas causadas por la diabetes mellitus | 6 |
| 2.1.4. Complicaciones de la diabetes mellitus | 8 |
| 2.1.4.1. Retinopatía diabética | 8 |
| 2.1.4.2. Neuropatía diabética | 9 |
| 2.1.4.3. Nefropatía diabética | 9 |
| 2.1.4. Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 | 9 |
| 2.1.4.1. Tratamiento farmacológico | 10 |
| 2.1.4.2. Tratamiento no farmacológico | 10 |
| 2.2. <i>Hibiscus sabdariffa</i> L | 11 |
| 2.2.1. Usos comunes | 12 |
| 2.2.2. Fitoquímica | 12 |
| JUSTIFICACIÓN | 1 |
| 3. HIPÓTESIS | 16 |
| 4. OBJETIVOS | 17 |
| 4.1. Objetivo general | 17 |
| 4.2. Objetivos específicos | 17 |
| 5. MATERIALES Y METODOS | 18 |
| 5.1. Materiales | 18 |
| 5.1.1. Material vegetal | 18 |
| 5.2. Métodos | 18 |
| 5.2.1. Obtención del subproducto de decocción de cálices de jamaica | 18 |
| 5.2.2. Caracterización del subproducto de decocción de cálices de jamaica | 18 |

| | |
|---|----|
| 5.2.2.1. Composición nutrimental | 18 |
| 5.2.2.2. Análisis de polifenoles extraíbles | 18 |
| 5.2.2.3. Análisis de polifenoles no extraíbles | 20 |
| 5.2.2.4. Perfil de polifenoles y ácidos orgánicos extraíbles y no extraíbles | 21 |
| 5.2.2.5. Capacidad antioxidante | 22 |
| 5.2.2.5.1. DPPH. | 22 |
| 5.2.2.5.2. ABTS | 22 |
| 5.2.2.5.3. FRAP | 23 |
| 5.2.2.5. Análisis microbiológicos | 23 |
| 5.2.3. Modelo animal | 23 |
| 5.2.3.1. Inducción de diabetes mellitus tipo 2..... | 24 |
| 5.2.3.2. Grupos controles | 25 |
| 5.2.3.3. Grupos de tratamientos | 25 |
| 5.2.3.4. Monitoreo de los animales..... | 26 |
| 5.2.3.5. Eutanasia y obtención de muestras biológicas..... | 27 |
| 5.2.4. Determinación del estado de resistencia a la insulina | 27 |
| 5.2.5. Determinación del perfil lipídico..... | 28 |
| 5.2.6. Determinación de la función renal | 28 |
| 5.2.7. Evaluación del estado antioxidante | 29 |
| 5.2.8. Análisis estadísticos | 29 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 30 |
| 6.1. Caracterización del subproducto de la decocción de cálices de jamaica | 30 |
| 6.1.1. Caracterización nutrimental y nutracéutica..... | 30 |
| 6.1.2. Perfil de polifenoles y ácidos orgánicos extraíbles y no extraíbles..... | 32 |
| 6.1.3. Capacidad antioxidante | 37 |
| 6.2. Evaluación del efecto de la suplementación con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica sobre un modelo <i>in vivo</i> de diabetes mellitus tipo 2 | 39 |
| 6.2.1. Peso corporal | 39 |
| 6.2.2. Consumo de alimento y agua..... | 40 |

| | |
|---|-----|
| 6.2.4. Estado glicémico | 47 |
| 6.2.5. Dislipidemia diabética..... | 53 |
| 6.2.6. Función renal..... | 55 |
| 6.2.7. Capacidad antioxidante plasmática..... | 60 |
| 7. CONCLUSIONES | 63 |
| 8. REFERENCIAS..... | 645 |
| 9. Anexos..... | 74 |
| 9.1. Dictamen de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales..... | 74 |
| 9.2. Análisis microbiológico de la decocción y el subproducto de jamaica..... | 75 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Compuestos fitoquímicos reportados en <i>Hibiscus sabdariffa</i> L (Riaz & Chopra, 2018)..... | 13 |
| Cuadro 2. Contenido nutrimental de las dietas aplicadas a los modelos biológicos.. | 26 |
| Cuadro 3. Análisis químico proximal del subproducto de la decocción de cálices de jamaica | 31 |
| Cuadro 4. Contenido de compuestos polifenólicos simples y poliméricos del subproducto de la decocción de cálices de jamaica | 31 |
| Cuadro 5. Perfil de polifenoles y ácidos orgánicos extraíbles y no extraíbles del subproducto de la decocción de cálices de jamaica. | 33 |
| Cuadro 5 (Continuación). Identificación tentativa de polifenoles extraíbles, no extraíbles y ácidos orgánicos por UPLC-DAD-ESI-QTOF del subproducto de la decocción de jamaica..... | 34 |
| Cuadro 6. Capacidad antioxidante del subproducto..... | 38 |
| Cuadro 7. Porcentaje de animales inducidos en las semanas posteriores a la inyección con estreptozotocina..... | 47 |
| Cuadro 8. Índices relacionados con el desarrollo diabético en un modelo <i>in vivo</i> de DM2. | 52 |
| Cuadro 9. Índices relacionados con las dislipidemias en un modelo <i>in vivo</i> de DM2. | 57 |
| Cuadro 10. Parámetros bioquímicos y matemáticos relacionados con el estado renal en un modelo <i>in vivo</i> de DM2. | 59 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrategia experimental para la inducción de RI y DM2 en ratas <i>Wistar</i> macho..... | 25 |
| Figura 2. Monitoreo de peso corporal promedio de animales sanos, enfermos y suplementados con el subproducto de la decocción de jamaica. | 41 |
| Figura 3. Monitoreo del consumo de alimento promedio de animales sanos, enfermos y suplementados con el subproducto de la decocción de jamaica..... | 42 |
| Figura 4. Monitoreo del consumo de agua promedio de animales sanos, enfermos y suplementados con el subproducto de la decocción de jamaica..... | 44 |
| Figura 5. Monitoreo de glucosa sérica en las 4 semanas posteriores a la inducción (semanas 14, 15, 16 y 17) en animales sanos, enfermos y suplementados con el subproducto de la decocción de jamaica. | 46 |
| Figura 6. Efecto de la suplementación con subproducto de la decocción de jamaica sobre los niveles de glucosa en suero en un modelo <i>in vivo</i> de DM2..... | 48 |
| Figura 7. Efecto de la suplementación con subproducto de la decocción de jamaica sobre los niveles de insulina en suero en un modelo <i>in vivo</i> de DM2. | 49 |
| Figura 8. Efecto de la suplementación con subproducto de la decocción de jamaica sobre los niveles de triglicéridos en suero en un modelo <i>in vivo</i> de DM2. | 54 |
| Figura 9. Efecto de la suplementación con subproducto de la decocción de jamaica sobre los niveles de colesterol total en suero en un modelo <i>in vivo</i> de DM2. | 55 |
| Figura 10. Efecto de la suplementación con subproducto de la decocción de jamaica sobre los niveles de colesterol HDL en suero en un modelo <i>in vivo</i> de DM2..... | 56 |
| Figura 11. Efecto de la suplementación con subproducto de la decocción de jamaica sobre el ensayo de atrapamiento del radical ABTS en plasma de rata en un modelo <i>in vivo</i> de DM2. | 60 |
| Figura 12. Efecto de la suplementación con subproducto de la decocción de jamaica sobre el ensayo del poder reductor del hierro (FRAP) en plasma de rata ajustado por los valores de ácido úrico en un modelo <i>in vivo</i> de DM2. | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|--------------------|--|
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| DM | Diabetes mellitus |
| Ensanut | Encuesta Nacional de Salud y Nutrición |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| RI | Resistencia a la insulina |
| OGTT | Prueba de tolerancia oral a la glucosa |
| HbA1c | Hemoglobina glicada |
| GLUT4 | Proteína transportadora de glucosa |
| AMPK | Proteína quinasa activada por AMP |
| DD | Dislipidemia diabética |
| TG | Triglicéridos |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidad |
| LTR | Lipoproteínas ricas en triglicéridos |
| VLDL | Lipoproteínas de muy baja densidad |
| IDL | Lipoproteínas de densidad intermedia |
| ApoA1 | Apolipoproteína A1 |

| | |
|-----------------------|---|
| ApoB | Apolipoproteína B |
| ROS | Especies reactivas de Oxígeno |
| AGE | Productos finales de glicación avanzada |
| RD | Retinopatía diabética |
| RDNP | Retinopatía diabética no proliferativa |
| RDP | Retinopatía diabética proliferativa |
| SRAA | Sistema renina-angiotensina-aldosterona |
| SGLT2i | Inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa-2 |
| ECV | Enfermedad cardiovascular |
| AR GLP-1 | Agonistas del receptor del péptido 1 similar al glucagón |
| AOAC | Asociación Oficial de Químicos Analistas |
| MeOH | Metanol |
| TEAC | Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox |
| ABTS | Ensayo del ácido 2,2-azinobis3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico |
| FRAP | Ensayo del poder reductor del Hierro |
| DPPG | Ensayo del atrapamiento del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo |
| UPLC-DAD-ESI-QToF MSE | Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Resolución acoplado a un Detector de Arreglo de Diodos y un Espectrómetro de Masas de Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo con una interfase de Ionización por Electrospray |

| | |
|-----------|--|
| NOM | Norma Oficial Mexicana |
| DAGF | Dieta alta en grasa y fructosa |
| SJ | Subproducto de jamaica |
| DAGF+SJ | Dieta alta en grasa y fructosa suplementada con 6.2% de subproducto de jamaica |
| STZ | Estreptozotocina |
| MET | Metformina |
| HOMA-IR | Modelo homeostático de actividad de las células beta |
| HOMA-beta | Modelo homeostático de resistencia a la insulina |
| QUICKY | Índice de verificación de sensibilidad cuantitativa a la insulina |
| FGIR | Relación glucosa-insulina en ayunas |
| TFG | Tasa de filtración glomerular |
| PE | Polifenoles extraíbles |
| PNE | Polifenoles no extraíbles |
| SM | Síndrome metabólico |

RESUMEN

La diversidad botánica mexicana es una de las más importantes y extensas a nivel mundial. *Hibiscus sabdariffa* L. es una planta herbácea anual cultivada en México, tiene un cáliz rojo y carnosos, el cual es utilizado para la elaboración de una bebida conocida como “agua de jamaica”; a esta se le han identificado diversas propiedades por su contenido de compuestos fenólicos y fibra dietaria. En nuestro país comúnmente el subproducto de esta elaboración es desechado por lo que podría utilizarse como un potencial ingrediente para desarrollar alimentos funcionales. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto del subproducto de la decocción de cálices de jamaica sobre las alteraciones metabólicas en un modelo *in vivo* de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) inducido con una dieta alta en grasa y fructosa y estreptozotocina. El trabajo fue en dos etapas, la primera fue la obtención y caracterización del subproducto de jamaica, al secar los cálices después de su decocción y posteriormente caracterizar sus polifenoles y ácidos orgánicos extraíbles y no extraíbles por métodos cromatográficos. En la segunda etapa, se realizó un estudio *in vivo* donde se utilizaron 70 ratas macho *Wistar*, las cuales fueron aleatorizadas en siete grupos (n=10), 10 ratas fueron alimentadas con una dieta estándar (control negativo) y los grupos restantes recibieron una dieta alta en grasa y fructosa *ad libitum* por 17 semanas, inducidos a DM2 con una dosis de estreptozotocina (30 mg/Kg) en la semana 13 y divididos en un grupo control enfermo, dos grupos de prevención suplementados con un 6.2% de subproducto en la semana 1 y 9, y tres grupos de tratamiento suplementados en la semana 14 con 6.2% subproducto, 200 mg/Kg de metformina y la combinación de ambos como tratamiento coadyuvante. Entre los principales resultados obtenidos destaca el alto contenido de fibra dietaria, principalmente insoluble, y de polifenoles no extraíbles con alta capacidad antioxidante, por lo que el subproducto de la decocción de cálices de jamaica tiene potencial como fibra dietaria antioxidante. La suplementación con el subproducto de jamaica previno y controló la hiperglucemia y dislipidemia asociada a la DM2, observando resultados similares cuando la suplementación se llevó a cabo en animales sanos, con resistencia a la insulina y con DM2. Con base en lo anterior, la conclusión de este estudio es que el subproducto de la decocción de los cálices de jamaica puede ser aprovechado como un suplemento dietario para la prevención, coadyuvancia y/o tratamiento de las alteraciones metabólicas asociadas a la DM2.

(Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa* L, diabetes mellitus tipo 2, alteraciones metabólicas, modelo *in vivo*, resistencia a la insulina, subproducto).

ABSTRACT

Mexican botanical diversity is one of the most important and extensive in the world. *Hibiscus sabdariffa* L. is an annual herbaceous plant cultivated in Mexico, it has a red and fleshy calyx, which is used to make a drink known as “agua de jamaica”; Various properties have been identified as the content of phenolic compounds and dietary fiber. In our country, the decoction’s by-product is commonly discarded so it could be used as a potential ingredient to develop functional foods. The aim of this project was to evaluate the effect of the decoction’s by-product of *Hibiscus sabdariffa* calyces on metabolic alterations in an *in vivo* model of type 2 diabetes mellitus induced with a high-fat and high-fructose diet and streptozotocin. The investigation was carried out in two stages, the first was the obtaining and characterization of the by-product, by drying the calyces after their decoction and subsequently characterizing their polyphenols and extractable and non-extractable organic acids by chromatographic methods. In the second stage, an *in vivo* study was carried out where 70 male *Wistar* rats were used, which were randomized into seven groups (n=10), 10 rats were fed a standard diet (negative control) and the remaining groups received a high-fat and high-fructose diet *ad libitum* for 17 weeks, induced type 2 diabetes with a dose of streptozotocin (30 mg/Kg) in week 13 and divided into a diabetic control group, two prevention groups supplemented with 6.2% of by-product in weeks 1 and 9, and three groups of treatment supplemented in week 14 with 6.2% of by-product, 200 mg/Kg of metformin and the combination of both as adjuvant treatment. Main results obtained, the high content of dietary fiber, mainly insoluble, and non-extractable polyphenols with high antioxidant capacity stands out, so the by-product of the decoction of hibiscus calyces has potential as antioxidant dietary fiber. Supplementation with the by-product prevented and controlled hyperglycemia and dyslipidemia associated with type 2 diabetes, observing similar results when supplementation was carried out in healthy, insulin resistance and diabetic animals. Based on the above, the conclusion of this study is that the decoction’s by-product of *Hibiscus sabdariffa* calyces can be used as a dietary supplement for the prevention, adjuvantness and/or treatment of metabolic alterations associated with type 2 diabetes mellitus.

(Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L, type 2 diabetes mellitus, metabolic alterations, *in vivo* model, insulin resistance, by-product).

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es el término colectivo para los trastornos metabólicos heterogéneos cuya principal característica es la hiperglucemia crónica. La causa es una secreción de insulina alterada, una disminución de la actividad de insulina o por lo general, ambos (Petersmann *et al.*, 2019). Durante las últimas décadas, la prevalencia de DM ha aumentado significativamente, principalmente como resultado del aumento continuo en la incidencia de DM2. Según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud más de 422 millones de adultos en todo el mundo padecían DM en 2014 y se espera un aumento continuo en su prevalencia (Lovic *et al.*, 2020).

De acuerdo con cifras de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensanut) del 2021, en nuestro país existen 12 millones 400 mil personas con DM, donde DM2 es la más común, y afecta principalmente a personas mayores de 60 años, aunque su incidencia se muestra en diversos grupos de edad. La tasa de mortalidad al año es de 361 personas por cada 100 mil habitantes (Secretaria de Salud, 2022).

La hiperglucemia crónica de la DM se asocia con daño a largo plazo, disfunción e insuficiencia principalmente en ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Las complicaciones macro y microvasculares como la enfermedad cardiovascular y renal, la retinopatía y neuropatía son la principal causa de morbilidad y mortalidad en personas diabéticas (Cole & Florez, 2020).

La herbolaria en el mundo es una de las bases más importantes y uno de los primeros pasos para el descubrimiento de nuevos aportes a la farmacología; en México tenemos una gran diversidad de plantas medicinales; su uso es milenario y su conocimiento se remonta a aplicaciones empíricas que poco a poco se han ido convirtiendo en descubrimientos científicos de apoyo a la salud de la sociedad.

Hibiscus sabdariffa L. es una planta herbácea que tiene flores con colores pálidos en las hojas y un cáliz color rojo intenso y carnoso, considerado como la parte más destacable de la misma; es recolectada al cerrarse la flor y el cáliz al alcanzar un

tono rojo vinoso, el cual es secado para su uso principalmente para la preparación de una bebida de color rojo con un sabor ligeramente ácido y refrescante, que en México se conoce como “agua de jamaica” y que también es utilizado para la producción de colorantes alimentarios, algunos jarabes y en recetas de cocina (Riaz & Chopra, 2018).

Las bebidas se preparan hirviendo cálices secos para liberar compuestos solubles, los cálices usados se convierten en residuos o subproductos que son desechados y desaprovechados. Se han realizado evaluaciones del efecto del extracto acuoso de los cálices de jamaica sobre el tratamiento de las alteraciones causadas por la DM, observando una reducción en los niveles séricos de glucosa y colesterol LDL, así como una mejora en el funcionamiento renal (Bule *et al.*, 2020; H. J. Lee *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2020). Dichos efectos han sido atribuidos a los compuestos polifenólicos y ácidos orgánicos extraídos de los cálices de jamaica. Si bien los cálices de jamaica son una fuente importante de compuestos bioactivos como fibra dietética (36-38%) y compuestos fenólicos (3-4%), y una fracción de estos son lixiviadas durante el proceso de la bebida, una gran proporción de estos compuestos se retienen en los cálices tras su decocción. Se ha reportado que el residuo tiene un mayor contenido de fibra dietaria que el cáliz (67% vs 37%) y de un 71% a 74% más contenido de polifenoles no extraíbles y de 45% a 57% menor contenido de polifenoles extraíbles (Amaya-Cruz *et al.*, 2019; Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2014),

Amaya-Cruz *et al.* (2019) demostraron que el subproducto de jamaica (SJ) es un ingrediente potencial para desarrollar alimentos funcionales contra la obesidad y sus complicaciones, ya que observaron efectos benéficos comparables a los del cáliz. Si bien se ha demostrado que el subproducto de jamaica previene el desarrollo de resistencia a la insulina (RI) asociada a la obesidad, se desconoce si tiene un efecto sobre el desarrollo de las alteraciones metabólicas causadas a partir de la DM2. Es por ello, que el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del subproducto de la decocción de *Hibiscus sabdariffa* L. en las alteraciones metabólicas en un modelo *in vivo* de diabetes mellitus tipo 2 inducido por una dieta alta en grasa y alta en fructosa y una dosis única de estreptozotocina.

2. ANTECEDENTES

2.1. Diabetes mellitus

DM es una de las problemáticas mundiales más importantes en las últimas décadas, convirtiéndose en uno de los tópicos de investigación con amplia necesidad de investigación. De manera resumida, es una enfermedad que se determina de manera genética, donde el sujeto que la padece presenta alteraciones metabólicas de las macromoléculas como proteínas, grasas y carbohidratos; y a su vez, una secreción de insulina deficiente ya sea, relativa o absoluta, y/o resistencia a esta en el organismo.

La DM es un trastorno metabólico crónico caracterizado por niveles elevados de glucosa plasmática. En cuanto a la patogenia de la enfermedad, se han propuesto dos mecanismos principales: la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas con la consiguiente producción insuficiente de insulina, así como también, la resistencia endógena de las células del cuerpo a la acción de la insulina, generando así, una hiperglucemia crónica (Lovic *et al.*, 2020). Esto es la base de las anomalías en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas observadas en DM. El deterioro de la secreción de insulina y los defectos en la acción de ésta hormona coexisten con frecuencia en el mismo paciente y, a menudo, no está claro qué anomalía, si es que es la única, es la causa principal de la hiperglucemia.

En el occidente, la prevalencia de DM se estima entre el 2% al 6% a nivel mundial, pero se cree que hasta un 50% de los pacientes diabéticos se encuentran sin diagnosticar. En 2020, se reportó que en México murieron 151,019 personas a causa de la DM, lo que equivale al 14% de las prevalencias de muerte en México; donde el 48% fueron mujeres y el 52% fueron hombres. La tasa de mortalidad por DM para 2020 fue la cifra más alta en los últimos 10 años, con 11.95 personas por cada 10 mil habitantes (INEGI, 2021).

2.1.1. Diabetes mellitus tipo 2

DM2 se desarrolla como una consecuencia de la reducción en la acción de la insulina acompañado de una pérdida progresiva de la función de las células beta, inicialmente a menudo con una deficiencia relativa de insulina y típicamente una interrupción de la secreción de insulina dependiente de la glucosa. La RI con hiperinsulinismo se encuentra en el estadio normoglucémico prediabético, mientras que la alteración de su secreción es más tardía. Los factores genéticos de susceptibilidad son poligénicos, hay grupos raciales de riesgo y al mismo tiempo influyen factores medioambientales tales como una vida sedentaria y una ingesta alta en calorías y grasas saturadas (Barrio-Castellanos, 2004; Harreiter & Roden, 2019). Para diagnosticar la DM2 se tienen 3 consideraciones en los pacientes:

- Glucosa en sangre en ayuno de 8 horas mayor a 126 mg/dL en dos días diferentes.
- Glucosa en sangre a cualquier hora del día mayor 200 mg/dL con síntomas previos como aumento de consumo de agua, aumento en la producción de orina y una pérdida de peso inexplicable.
- Glucosa en sangre mayor a 200 mg/dL a las 2 horas de una carga oral de 75 gramos de glucosa, aún en ausencia de síntomas característicos de DM2.

Los principales signos y síntomas son la pérdida de peso, sed, poliuria, nicturia, prurito genital, letargia, balanitis y visión borrosa. El diagnóstico de DM2 se basa en la glucosa en ayunas, la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT por sus siglas en inglés) o la hemoglobina glicada (HbA1c). La hiperglucemia se desarrolla continuamente, y los trastornos de la glucemia en ayunas y postprandial tienen diferentes cursos de tiempo. Por lo tanto, los valores de corte no están completamente establecidos en la identificación de pacientes con DM2, y todas las pruebas están sujetas a variabilidad, por lo que siempre es necesario la repetición de una prueba o la confirmación del resultado de una prueba por otra prueba, a menos que los síntomas clínicos clásicos estén presentes (Harreiter & Roden, 2019).

2.1.2. Resistencia a la insulina

La RI se define fisiológicamente como un estado de respuesta reducida en los tejidos que se dirigen a la insulina a niveles fisiológicos elevados de insulina y se considera el factor patógeno de muchas enfermedades modernas como la DM2. Precede a niveles elevados de glucosa en plasma no fisiológicos, que es el síntoma clínico principal de DM2. En la condición prediabética, los niveles de insulina aumentan para cumplir con los requisitos normales de insulina, lo que lleva a hiperinsulinemia crónica, insuficiencia de las células beta inducida por hiperglucemia y, finalmente, a DM2. En particular, los efectos reguladores de la insulina, como la supresión de glucosa endógena hepática y la lipólisis, la captación celular de glucosa plasmática y la síntesis neta de glucógeno, no se observan en tejidos resistentes a la insulina a niveles plasmáticos normales. Dado que el músculo esquelético es un tejido cuantitativamente central para la eliminación de glucosa estimulada por insulina, y el hígado y el tejido adiposo son cualitativamente los sitios críticos para la señalización de insulina inducida por glucosa, estos tejidos se consideran fundamentales para comprender los mecanismos responsables de la RI (Lee *et al.*, 2022; Petersen & Shulman, 2018).

Muchos estudios moleculares han demostrado que la captación de glucosa muscular estimulada por insulina es altamente susceptible a la RI atribuida a la alteración de la traslocación de la proteína transportadora de glucosa 4 (GLUT4) que es regulada por la insulina. Sin embargo, la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática y el transporte de glucosa en la DM2 son estimulados por la hipoxia o el ejercicio a través de la regulación mediada por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), lo que sugiere que los defectos del transporte de glucosa en la RI son anomalías en la vía de señalización de la insulina más que defectos en el propio sistema de transporte. Además, se ha demostrado que existe una correlación inversa entre la concentración plasmática de ácidos grasos, la acumulación de lípidos en tejido adiposo y la sensibilidad a la insulina (Lee *et al.*, 2022; O'Neill *et al.*, 2011; Perseghin *et al.*, 1997; Wojtaszewski *et al.*, 1999).

2.1.3. Alteraciones metabólicas causadas por la diabetes mellitus

García-Torres *et al.* (2020) describe a la DM2 como un desorden metabólico con diversas causas etiológicas, con una hiperglucemia crónica característica, y trastornos metabólicos en el metabolismo de los azúcares, las grasas y las proteínas, esto causado por los defectos en la secreción de insulina, o bien, defectos en la acción de esta hormona en el organismo, o ambos. La disfunción de esta hormona puede causar, principalmente una desregulación en los niveles de glucosa en sangre, pero también, alteraciones metabólicas en carbohidratos, lípidos y proteína; causados principalmente por cambios en la composición química molecular, como la glicosilación no enzimática, la dislipidemia y el estrés oxidativo; generando así complicaciones microvasculares y macrovasculares provenientes de la enfermedad.

La RI se manifiesta temprano antes de la aparición de la hiperglucemia. Mientras las células beta pancreáticas secreten suficiente insulina para compensar la RI, los niveles de glucosa se mantienen en niveles relativamente normales. La DM ocurre cuando las células beta ya no secretan suficiente insulina para mantener la normoglucemia. La hiperglucemia en ayunas es impulsada por una mayor producción de glucosa hepática debido a niveles de insulina relativamente bajos combinados con RI hepática (Taylor *et al.*, 2021).

La dislipidemia diabética (DD) es multifactorial y está relacionada con un mal control glucémico, RI, inflamación y susceptibilidad genética. Esta alteración se caracteriza exclusivamente por niveles elevados de triglicéridos (TG), niveles reducidos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL). Los TG circulantes son una mezcla de lipoproteínas ricas en TG, es decir, quilomicrones, remanentes de quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-C) y colesterol de lipoproteínas de densidad intermedia (IDL-C), cada uno con concentraciones variables de colesterol y TG en un paciente diabético. Numerosos estudios han demostrado que, en todas las etapas de intolerancia a la glucosa, incluida la pre-diabetes, se pueden detectar anomalías en los niveles séricos de estas lipoproteínas (Cuevas M. & Alonso K, 2016).

Al principio de la DM2, la deficiencia relativa de insulina debido a la resistencia a ésta hormona, promueve la lipólisis y aumenta el flujo de ácidos grasos libres hacia la circulación portal. Esto se ve agravado por el consumo excesivo de carbohidratos y grasas, lo que desencadena una lipogénesis *de novo*. Los pacientes con DM2 generalmente suelen tener un exceso de grasa abdominal y visceral, así como un estado de RI, hiperinsulinemia y dislipidemia. La hipertrigliceridemia en la DM, se puede explicar a partir de la RI, en la cual se produce un aumento en la liberación de ácidos grasos libres desde los adipocitos, lo cual activa una síntesis hepática de TG y estimulan la producción de apolipoproteína B (ApoB); lo que, a su vez, promueve una sobreproducción de VLDL ricas en TG en el hígado (Taylor *et al.*, 2021).

En la DM2, especialmente en presencia de hipertrigliceridemia, se genera un aumento de TG con HDL, afectando directamente su catabolismo. Estas partículas son el sustrato de la lipoprotein lipasa endotelial y la lipasa hepática que hidrolizan sus TG, generando así una HDL pequeña con muy poco colesterol. Este proceso induce la disociación de la apolipoproteína AI (ApoAI), la cual es la proteína principal de las HDL, favoreciendo su filtrado y catabolismo renal. El flujo elevado de ácidos grasos libres de manera crónica en el hígado y el músculo incrementa el estado de RI, lo que en última instancia conduce a la destrucción acelerada de las células beta y la deficiencia de insulina, generando así, un ciclo de RI y de la DD (Cuevas & Alonso, 2016; Sunil & Ashraf, 2020).

El riesgo de complicaciones cardiovasculares diabéticas después de la exposición a niveles elevados de glucosa durante un cierto período de tiempo se denomina “memoria metabólica” o “efecto legado”. Los eventos metabólicos condicionantes de la definida “memoria metabólica” son caracterizados por la glicosilación no enzimática de proteínas y lípidos celulares, así como también el aumento de especies reactivas de Oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y de Nitrógeno (García-Torres *et al.*, 2020). Bornfeldt (2016) menciona que uno de los posibles mecanismos de este efecto es la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE por sus siglas en inglés), que se produce cuando el nivel de glucosa

en sangre es alto. Estos compuestos no se metabolizan fácilmente y se acumulan en pacientes con una larga historia de control inadecuado de la glucosa en sangre. Este aumento puede acelerar la progresión de la enfermedad vascular en pacientes diabéticos. Numerosos estudios han establecido el vínculo entre un nivel de glucosa en sangre controlado inadecuadamente y las complicaciones microvasculares de la DM2. Un nivel elevado de glucosa intracelular aumenta el flujo a través de las vías metabólicas celulares, como el sistema de transporte de electrones mitocondrial, lo que puede resultar en una sobreproducción de ROS. Además, los metabolitos de la glucosa pueden inducir respuestas proinflamatorias mediante la activación de la proteína quinasa C-beta y la aldosa reductasa. Katakami (2018) menciona que otra posibilidad es que la glucosa elevada actúe principalmente a través de mecanismos extracelulares, por ejemplo, al inducir la glicación y la glucoxidación de proteínas, lo que da como resultado la formación de AGE. Los AGE se acumulan en pacientes diabéticos cuando el nivel de glucosa en sangre está elevado y participan en la modificación de las moléculas de la matriz extracelular, esta interacción produce efectos proinflamatorios y una mayor generación de ROS intracelular.

2.1.4. Complicaciones de la diabetes mellitus

Debido a un diagnóstico tardío, un tratamiento inadecuado o un mal cuidado de parte del servicio de salud o del propio paciente, la DM puede generar una serie de complicaciones que pueden llevar a diversas patologías. Dentro de las tres más importantes se encuentran la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía diabética. Cada una de las complicaciones representa el mal cuidado y control de diversos factores, y la mayoría puede causar múltiples formas de fatalidad e incluso la muerte; por lo que su prevención juega un papel importante, principalmente en pacientes que ya tengan DM con complicaciones. (Demir *et al.*, 2021)

2.1.4.1. Retinopatía diabética

La retinopatía diabética (RD) es una complicación importante de la diabetes mellitus (DM), que sigue siendo una de las principales causas de pérdida visual en la población en edad laboral.

2.1.4.2. Neuropatía diabética

Entre las complicaciones de la DM, un grupo de síndromes clínicos causados por daños en los sistemas nerviosos periférico y autónomo son, con diferencia, los más frecuentes. Feldman *et al.* (2019) describe que, generalmente denominados diferentes formas de neuropatía, estos síndromes son causados por daño difuso y focal del sistema nervioso y ocurren en hasta la mitad de todas las personas con DM.

2.1.4.3. Nefropatía diabética

La ND se caracteriza por tener síntomas como microalbuminuria e hiperfiltración glomerular, lo que a nivel tisular refiere a una hipertrofia tubular, engrosamiento en membrana basal glomerular, y expansión de matriz mesangial; en el cuadro 1 se muestran las principales alteraciones que se presentan en el desarrollo de la enfermedad. La DM2 y la hipertensión arterial juegan un papel importante en el desarrollo de la ND al causar hiperfiltración glomerular, hipertrofia glomerular, seguida de expansión del mesangio y acumulación de matriz extracelular. Esta última puede conducir a una pérdida de podocitos, alteración del mesangio (mesangiolisis) y fibrosis glomerular. Por lo tanto, se crea otro círculo vicioso en el que la combinación de DM2 e hipertensión esencial conduce a la ND, que puede causar hipertensión secundaria y mayor deterioro de la función renal. Como ocurre con otras complicaciones microvasculares de la DM2, el control glucémico temprano y efectivo reduce la probabilidad de desarrollar ND. La hiperuricemia, que en algunos casos es secundaria a la disfunción renal, puede “alimentar” este círculo. El ácido úrico es proinflamatorio, induce el estrés oxidativo y activa el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Braunwald, 2019; Umanath & Lewis, 2018).

2.1.4. Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2

La DM2 es una enfermedad crónica compleja y su manejo requiere tratamientos conductuales y farmacológicos multifactoriales para prevenir o retrasar las complicaciones y mantener la calidad de vida. Esto incluye el manejo de los niveles de glucosa en sangre, el peso corporal, los factores de riesgo cardiovascular, las

comorbilidades y las complicaciones. Esto requiere que la atención se brinde de manera organizada y estructurada. Los aspectos fundamentales del cuidado de la DM2 pueden ser clasificados en tratamientos farmacológicos y no farmacológicos para la promoción de comportamientos saludables (Davies *et al.*, 2022).

2.1.4.1. Tratamiento farmacológico

Los medicamentos para bajar de peso son complementos efectivos de las intervenciones en el estilo de vida y los comportamientos saludables para controlar el peso y también se ha descubierto que mejoran el control de la glucosa en personas con DM2 (ADA, 2022^a).

El tratamiento individualizado en pacientes con IMC superior a 27 Kg/m² es preferible, un medicamento adecuado sería la liraglutida en dosis de 3 mg/día para disminuir el peso y control DE la glucemia (ALAD, 2019). La metformina es recomendada en pacientes con DM2 debido a su alta eficacia en la reducción de la HbA1c, el riesgo mínimo de hipoglucemia cuando se usa como monoterapia, la neutralidad del peso con el potencial de una pérdida de peso modesta, el buen perfil de seguridad y el bajo costo. Sin embargo, existe una aceptación continua de que un enfoque de tratamientos farmacológicos combinados puede ser apropiado (Aroda *et al.*, 2016; Crowley *et al.*, 2020; Lalau *et al.*, 2018; Masson *et al.*, 2021; Matthews *et al.*, 2020).

2.1.4.2. Tratamiento no farmacológico

La reducción de peso se ha visto principalmente como una estrategia para mejorar los niveles de hemoglobina glicosilada y reducir el riesgo de complicaciones relacionadas con el peso. Recientemente se sugirió que la pérdida de peso del 5% al 15% debería ser un objetivo principal del tratamiento para muchas personas que viven con DM2. La pérdida de peso puede ejercer beneficios que se extienden más allá del control glucémico para mejorar los factores de riesgo de enfermedad cardiometabólica y la calidad de vida (Lingvay *et al.*, 2022). Uno de los enfoques más utilizados para la prevención y el control de la DM es la terapia nutricional, con los objetivos de promover y apoyar patrones de alimentación saludables, abordar las necesidades nutricionales individuales, mantener el placer de comer y

proporcionar al paciente diabético las herramientas para desarrollar una alimentación saludable. No existe una proporción única de ingesta de carbohidratos, proteínas y grasas que sea óptima para todas las personas con DM2. Sin embargo, la distribución de las macromoléculas en la dieta de un paciente con DM2 sin ND debe ser de: 40-60% de carbohidratos, 30-45% de grasas y 15-30% de proteínas. La ingesta diaria de fructosa no debe superar los 60 gramos y el consumo de sal no debe superar los 4 gramos al día. Barrière *et al.*, (2018) demostraron que dietas que combinan niveles elevados de grasa y fructosa inducen etapas tempranas de la DM2, conocido como pre-diabetes y caracterizado por una RI.

Por otro lado, grandes estudios de cohortes prospectivos muestran consistentemente asociaciones entre una ingesta elevada de fibra dietética (>25 g/d en mujeres y >38 g/día en hombres) con una reducción del 20-30% en el riesgo de desarrollar DM2 (Weickert & Pfeiffer, 2018). Asimismo, se ha prestado mucha atención a la importancia de los antioxidantes para proteger contra el daño celular oxidativo generado por la hiperglucemia crónica de la DM2. Por lo que numerosos estudios han sugerido evidencia útil de compuestos bioactivos de alimentos de origen vegetal para mejorar la DM2 y sus complicaciones (Leh & Lee, 2022).

2.2. *Hibiscus sabdariffa* L

Hibiscus sabdariffa L. es conocida también como roselle, rosa de Abisinia, rosa de jamaica o flor de jamaica, forma parte de la familia de las malváceas y su origen se remonta a de África tropical, aunque su cultivo se ha extendido por México, Centroamérica, Sudamérica y el sudeste asiático. Es una planta herbácea que tiene flores con colores pálidos en las hojas y un cáliz color rojo intenso y carnoso, que es recolectado al cerrarse la flor y el cáliz alcanzar un tono rojo vinoso, es secado para su uso principalmente para la preparación de una bebida de color rojo con un sabor ligeramente ácido y refrescante, que en México se conoce como “agua de jamaica”; pero también es utilizada para la producción de colorantes alimentarios, algunos jarabes y en recetas de cocina (Riaz & Chopra, 2018).

Según datos de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2021) la producción nacional de jamaica en 2019 fue de 7 mil 889 toneladas, donde los estados líderes

en producción fueron Guerrero (5 mil 810 toneladas), Michoacán (884 toneladas) y Oaxaca (507 toneladas).

2.2.1. Usos comunes

Tradicionalmente, la jamaica se cultiva por su tallo, hojas, cálices y semillas, ya que todas las partes tienen aplicaciones industriales, medicinales y de otro tipo, como en medicina tradicional. En la cocina, por ejemplo, las hojas y los tallos tiernos de la jamaica se comen crudos o cocidos en ensaladas o acompañando diversas proteínas; en la India, las mujeres usan las hojas tiernas y el tallo para hacer salsa picante durante la temporada de lluvias. Las semillas son ricas en proteínas y, después de la extracción del aceite, se hierven y se comen en sopas y también se usan como sustituto del café en África. Las semillas se fermentan para producir un condimento sustituto de la carne. Los chinos utilizan las semillas para la extracción de aceite (Riaz & Chopra, 2018).

Varias partes de la planta de jamaica se han utilizado en la medicina tradicional para tratar resfriados, dolores de muelas, infecciones del tracto urinario y resacas. En México se utilizan las infusiones de los cálices y hojas para aliviar el dolor al orinar, la indigestión, la hipertensión y otras enfermedades diversas. El polvo de cáliz seco o flores frescas se usa para curar flatulencias en vacas, cabras y ovejas. El extracto de los cálices adicionado con sal común es beneficioso para curar la diarrea y la disentería de animales y humanos. También se utiliza para curar el dolor de cintura y otros trastornos ginecológicos en casos posteriores al parto. Las bebidas también se utilizan para tratar enfermedades hepáticas, fiebre, hipercolesterolemia, hipertensión, agente antiespasmódico y antimicrobiano (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014).

2.2.2. Fitoquímica

El principal constituyente de la jamaica en contexto de importancia terapéutica son los polisacáridos, ácidos orgánicos y flavonoides, principalmente antocianinas. Se sabe que los extractos de cálices secos contienen compuestos como son ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y otros antioxidantes hidrosolubles. El efecto beneficioso para la salud se atribuye principalmente a estas

moléculas bioactivas con actividades antioxidantes, hipocolesterolémicas, antihipertensivas, antimicrobianas, antiinflamatorias, antidiabéticas y anticancerígenas. En el Cuadro 1 se muestran los diversos compuestos fitoquímicos reportados en *Hibiscus sabdariffa* L.

Cuadro 1. Compuestos fitoquímicos reportados en *Hibiscus sabdariffa* L (Riaz & Chopra, 2018).

| Familia | Compuesto |
|------------------|---|
| Antocianinas | Delfinidina 3-O-sambubiósido Cianidina 3-O-sambubiósido |
| Ácidos fenólicos | Ácido 5-cafeoilshiquímico Ácido 3-cafeoilquínico Ácido 4-cafeoilquínico Ácido 5-cafeoilquínico Ácido cafeico Ácido protocatecuico |
| Flavonoides | (+)-Catequina (-)-Epigalocatequina galato Quercetina Quercetina 3-O-sambubiósido Quercetina 3-O-rutinósido Quercitina 3-O-glucósido Kaempferol 3-O-rutinósido |
| Ácidos orgánicos | Ácido hidroxicítrico Ácido hibiscus |

Cabe destacar que la mayoría de los estudios se han realizado con extractos acuosos de cálices de jamaica, obtenidos por procesos de maceración, infusión o decocción, observando un efecto hipoglucémico, hipolipidémico y renoprotector, demostrando su efecto antidiabético en diversos modelos *in vitro*, *in vivo* e incluso con seres humanos. Estos efectos han sido ampliamente asociados a compuestos

antioxidantes hidrosolubles que se encuentran presentes en los extractos acuosos obtenidos de cálices de jamaica. Amaya-Cruz *et al.* (2019) describe que los subproductos de jamaica representan los cálices usados y cocidos que se obtienen después de colocar la jamaica en decocción, que comúnmente son desechados y desaprovechados. Sin embargo, éstos son ricos en fibra dietaria y compuestos fenólicos, observando un efecto benéfico en la sensibilización a la insulina asociada a una dieta rica en grasa y fructosa en un modelo *in vivo* de obesidad. Lo anterior sugiere que este residuo podría tener un efecto antidiabético, ya que presenta componentes similares a los observados en los extractos acuosos previamente descritos.

JUSTIFICACIÓN

La DM2 es un conjunto de enfermedades caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en sangre que puede generar múltiples alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas y causar diversas complicaciones, que, sin atención adecuada y oportuna, pueden generar la muerte. Su elevada prevalencia representa una problemática de salud a nivel mundial, se estima que aumentará a 55 millones de personas para el año 2025, siendo DM2 para el 99% de los casos. Diversas plantas pertenecientes a la herbolaria mexicana son utilizadas en el tratamiento y prevención de las alteraciones metabólicas causadas por la DM2, una de ellas es *Hibiscus sabdariffa* L.; sin embargo, sus estudios se han enfocado en el uso del cáliz o del extracto de la planta y no en el subproducto, es decir, los cálices usados generados durante el proceso de decocción, el cual es comúnmente desechado y desaprovechado, lo que representa una pérdida de una fuente de compuestos bioactivos como fibra dietaria y compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles que aportan una importante capacidad antioxidante que puede ser de gran utilidad como agente nutricio y nutracéutico. Se ha demostrado que el subproducto de la decocción de cálices de jamaica previene el desarrollo de resistencia a la insulina asociada a la obesidad inducida por una dieta hipercalórica; sin embargo, se desconoce si tiene potencial como agente terapéutico o coadyuvante para la prevención y el tratamiento de la DM2.

3. HIPÓTESIS

El subproducto de la decocción de cálices de jamaica, debido a su alto contenido de fibra dietaria y polifenoles no extraíbles, puede ser utilizado como un suplemento dietario para la prevención y tratamiento coadyuvante de las alteraciones metabólicas asociadas con la DM2 en un modelo *in vivo*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del subproducto de la decocción de cálices de jamaica sobre la prevención y el tratamiento de las alteraciones metabólicas en un modelo *in vivo* de DM2 inducido con una dieta alta en grasa y fructosa y una dosis única de estreptozotocina.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Determinar el efecto del subproducto de la decocción de cálices de jamaica sobre la prevención y el tratamiento de resistencia a la insulina en un modelo *in vivo* de DM2.

4.2.2. Evaluar, en un modelo *in vivo* de DM2, la capacidad del subproducto de la decocción de cálices de jamaica sobre la prevención y el tratamiento de la dislipidemia y disfunción renal.

4.2.3. Determinar el estado antioxidante inducido por el subproducto de la decocción de cálices de jamaica en un modelo *in vivo* de DM2.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Material vegetal

Se trabajó con cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) de Guerrero, México. Los cálices de jamaica fueron desinfectados por medio de su inmersión en una solución desinfectante (Nobac citrus 373) al 1% (v/v) durante 10 min, posteriormente la solución fue drenada y los cálices se secaron en un horno de circulación forzada (BF 400, Binder) a 45 °C por 24 h (Amaya-Cruz *et al.*, 2019).

5.2. Métodos

5.2.1. Obtención del subproducto de decocción de cálices de jamaica

Los cálices secos y desinfectados fueron utilizados para preparar una decocción de jamaica siguiendo la metodología de Amaya-Cruz *et al.* (2019). A 100 g de cálices se le añadieron 1 L de agua hirviendo y se calentaron por 15 min, posteriormente se coló la bebida y se recuperaron los cálices cocidos. El subproducto fue secado bajo las condiciones anteriormente descritas, molido y tamizado a <420 µm y fue almacenado a -20 °C en oscuridad hasta su uso.

5.2.2. Caracterización del subproducto de decocción de cálices de jamaica

5.2.2.1. Composición nutrimental

Se realizó el análisis nutrimental siguiendo los métodos oficiales de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC): humedad (934.06), fibra dietaria total (991.42), proteína (960.52), grasa (920.85) y cenizas (940.26), estimando el contenido de carbohidratos por diferencia. Se determinó el contenido de fibra dietaria total, soluble e insoluble utilizando un kit enzimático siguiendo el método de la AOAC (AOAC International, 2012).

5.2.2.2. Análisis de polifenoles extraíbles

La fracción de polifenoles extraíbles fue obtenida siguiendo la metodología de Hassan y col. (2011). Se realizó la extracción con 0.5 g de muestra y 5 mL de metanol:agua (50:50 v/v) ajustada a pH 2 con ácido clorhídrico por 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 g por 10 min y se colectó el sobrenadante. Posteriormente, el residuo fue lavado con 5

mL de acetona:agua (70:30 v/v) siguiendo el procedimiento anterior. Los dos sobrenadantes fueron mezclados (fracción de polifenoles extraíbles) y utilizados para la determinación de polifenoles totales (Singleton *et al.*, 1999), flavonoides totales (Oomah *et al.*, 2005), antocianinas totales (Giusti & Wrolstad, 2001) y proantocianidinas extraíbles (Zielinski *et al.*, 2019)

a) Compuestos fenólicos totales

Se diluyeron 200 µL de extracto y 800 µL de agua destilada. Una alícuota de 20 µL de esta solución se mezcló con 30 µL de agua destilada, 25 µL del reactivo de Folin Cicalteu 1 N y 125 µL de Na₂CO₃ (20%). Se dejó reposar la mezcla en obscuridad a temperatura ambiente durante 30 min y se midieron las absorbancias a 765 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific). La cuantificación de polifenoles totales se realizó de acuerdo con una curva estándar de ácido gálico y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por mL de decocción (Singleton *et al.*, 1999).

b) Flavonoides totales

Se determinaron de acuerdo con la metodología reportada por Oomah *et al.* (2005). A una alícuota de 50 µL de extracto se le agregaron 180 µL de agua destilada y 20 µL de una solución de 2-aminoetil difenil borato (10 g/L) en solución metanólica. Posteriormente se leyó a una absorbancia de 404 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific). Se realizó una curva de calibración de rutina (1 mg/mL) disuelta en etanol y los resultados se expresaron como mg equivalentes de rutina/mL de decocción.

c) Antocianinas totales

Se diluyeron 50 µL de extracto con 175 µL de cada una de las soluciones amortiguadoras (cloruro de potasio 0.025 M, pH 1 y acetato de sodio 0.4 M, pH 4.5). Posteriormente se midieron sus absorbancias a 510 nm y 700 nm considerando ambos pH en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific) (Giusti &

Wrolstad, 2001). Los resultados se expresaron como miligramos de cianidina-3-O-glucósido/mL de decocción a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Absorbancia total} = (\text{Abs}_{510 \text{ nm}} - \text{Abs}_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1.0} - (\text{Abs}_{510 \text{ nm}} - \text{Abs}_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4.5}$$

$$\text{Antocianinas totales} = \text{Absorbancia total} * 1000 * \text{PM} * \text{FD} / \epsilon * d$$

Donde:

Abs: Absorbancia

PM: Peso molecular de cianidina-3-O-glucósido (448.8 g/mol)

FD: Factor de dilución

ϵ : Coeficiente de extinción molar de cianidina-3-O-glucósido (26900 L/mol·cm)

d: distancia (1 cm)

d) Proantocianidinas totales

El contenido de proantocianidinas en el extracto se determinó a partir de la metodología de vanillina-HCl descrita por Zielinski y Haminiuk (2018). A una alícuota de 200 μL de muestra se le adicionaron 1.2 mL de vanillina (4%, p/v vanillina en metanol). Después de agitarse, se le adicionaron 600 μL de HCl concentrado y se agitaron. Finalmente, la solución se guardó en oscuridad por 15 min y se midió su absorbancia a 500 nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific). Se utilizó una curva estándar de catequina. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de catequina/mL de decocción.

5.2.2.3. Análisis de polifenoles no extraíbles

El residuo obtenido durante la extracción de los polifenoles extraíbles fue secado a 45 °C por 25 h (fracción no extraíble). Se realizó la obtención de los polifenoles hidrolizables siguiendo el método de Quatrin *et al.* (2019). El residuo fue incubado con 12 mL de agua y 5 mL de hidróxido de sodio 10 M a temperatura ambiente por 16 h con agitación constante. Posteriormente, se ajustó el pH a 2-3 con ácido clorhídrico 6 M, se centrifugó a 2000 g por 10 min y se colectó el sobrenadante. El

residuo se lavó con 5 mL de agua siguiendo el procedimiento anterior y se mezclaron los sobrenadantes. Se determinó el contenido de polifenoles totales (Singleton et al., 1999), los cuales corresponden a la fracción de polifenoles hidrolizables con álcali. El residuo de la hidrólisis alcalina fue incubado con 2.5 mL de ácido clorhídrico a 85 °C por 30 min. Posteriormente se ajustó el pH a 2-3 con hidróxido de sodio 10 M, se centrifugaron las muestras a 2000 g por 10 min y se colectó el sobrenadante. El residuo se lavó con 5 mL de agua siguiendo el procedimiento anterior y se mezclaron los sobrenadantes. Se determinó el contenido de polifenoles totales, los cuales corresponden a la fracción de polifenoles hidrolizables con ácido. Adicionalmente, se realizó la determinación de proantocianidinas no extraíbles en el residuo obtenido durante la extracción de los polifenoles extraíbles.

5.2.2.4. Perfil de polifenoles y ácidos orgánicos extraíbles y no extraíbles

Las fracciones extraíbles e hidrolizables con ácido y álcali fueron concentrados a vacío y resuspendidos en 200 µL de la fase móvil para ser analizados en un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Resolución acoplado a un Detector de Arreglo de Diodos y un Espectrómetro de Masas de Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo con una interfase de Ionización por Electrospray (UPLC-DAD-ESI-QToF MS^E, Vion, Waters Co.). Las muestras (1 µL) fueron inyectadas en una columna BEH Acquity C18 (2.1x100 mm, 1.7 µm) a 35 °C. Se utilizó agua con 0.1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (B) como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min bajo condiciones de gradiente: 0% B a 0 min, 15% B a 2.5 min, 21%B a 10 min, 90%B a 12 min, 95% B a 13 min, 0% B a 15 min y 0% B a 17 min. Se realizó la adquisición de espectros UV/Vis a 210-600 nm. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: ionización en modo negativo y positivo, rango de masas de 100-1200 Da, temperatura de fuente de ionización a 120 °C, gas de desolvatación (N₂) a 450 °C y 800 L/h, flujo de gas de cono (N₂) a 50 L/h, voltaje del capilar a 2.0 kV (ESI-) y 3.5 kV (ESI+), voltaje del cono a 40 V, energía baja de colisión a 6 V, energía alta de colisión a 15-45 V. Se realizó la corrección de masas con leucina encefalina (50 pg/mL) a 10 uL/min cada 3 min. La identificación de los compuestos se realizó por medio de análisis de su masa exacta y fórmula molecular

(error de masas <5 ppm), distribución isotópica, patrón de fragmentación y espectro UV/Vis (Reynoso-Camacho et al., 2021). Se realizó la cuantificación de los compuestos por medio de curvas de calibración utilizando estándares comerciales. El procesamiento de datos se realizó en el software UNIFI (Waters Co.)

5.2.2.5. Capacidad antioxidante

Se realizó la estimación de la capacidad antioxidante por medio de tres métodos: atrapamiento del radical ABTS, reducción del radical DPPH y poder reductor del Hierro (FRAP) en las fracciones extraíbles e hidrolizables.

5.2.2.5.1. DPPH.

La actividad antirradicala se determinó utilizando el radical estable DPPH, según Fukumoto & Mazza (2000). Todas las reacciones se realizaron en microplacas de 96 pocillos. Una alícuota de 20 µL de una solución metanólica de los extractos a varias concentraciones (10, 100, 500, 1000, 2500, 5000 µg/mL) se mezcló con 200 µL de 150 µM de DPPH en metanol al 80%. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, la absorbancia se registró a 520 nm en un lector de microplacas sintonizable Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, California, EE. UU.). El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó con la siguiente ecuación mostrada y los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de trolox por gramo de muestra (Fukumoto & Mazza, 2000; Loarca-Piña et al., 2010).

$$\% \text{ inhibición} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control}}\right)$$

5.2.2.5.2. ABTS

La estimación de la Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC) se realizó utilizando el ensayo del ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) descrito por Nenadis et al. (2004). El método fue modificado para ser realizado en microplacas de 96 pozos (Nalge Nunc Intl., N.Y., EE.UU.). Se mezcló una alícuota de 20 µL de los extractos con 230 µL de solución ABTS+ preparada previamente. Los controles contenían todos los reactivos de reacción excepto el extracto o trolox. La absorbancia se registró a 730 nm a los 6 min en un lector de microplacas

sintonizable Spectra Max (Molecular Devices Co., PAIS). El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó según la ecuación utilizada también en DPPH. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de trolox por gramo de muestra (Loarca-Piña *et al.*, 2010; Nenadis *et al.*, 2004).

5.2.2.5.3. FRAP

Los valores de FRAP se obtuvieron de acuerdo con el método informado por Firuzi *et al.*, (2005). Brevemente, 25 μ L de extracto se disolvieron en 1 mL de MeOH, se colocaron por cuadruplicado en una microplaca de 96 pozos (Nalge Nunc International, NY, EE. UU.). Luego se agregaron 175 μ L de solución FRAP recién preparada y tibia (37 °C) a tres de los pocillos y el mismo volumen de tampón de acetato al cuarto. Las absorbancias a 595 nm se controlaron mediante un lector de microplacas sintonizable Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EE. UU.) a los 0, 4, 10, 30 y 60 min. Se prepararon blancos y se obtuvo una curva estándar de FeSO₄. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de trolox por gramo de muestra (Firuzi *et al.*, 2005; Loarca-Piña *et al.*, 2019).

5.2.2.5. Análisis microbiológicos

Para garantizar la inocuidad del tratamiento previo a su administración en el modelo animal, se realizó un análisis microbiológico (NOM-218-SSA1-2011) del subproducto de decocción de cálices de jamaica en la Unidad de Servicios Clínicos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro siguiendo la norma NOM-218-SSA1-2011, previo al estudio en el modelo *in vivo*.

5.2.3. Modelo animal

Se utilizaron 70 ratas macho *Wistar* de 180 a 200 g de peso corporal del Bioterio del Instituto de Neurobiología (UNAM-Juriquilla). Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de humedad (50 \pm 10%), temperatura (23 \pm 2 °C), ciclos luz/oscuridad (12/12 h) y ventilación constante. Alojados de manera individual en jaulas de acero inoxidable que permitía la entrada de luz y aire (18.7 x 18.0 cm) en el Bioterio del Posgrado de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los experimentos siguieron los lineamientos éticos del cuidado y uso de animales de la Universidad Autónoma de Querétaro, y la Ley

Federal de Salud Animal (Título tercero, Capítulo I del bienestar de los animales) y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El proyecto fue aprobado (45FCN2022) por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (Anexo 1). Previo al inicio del estudio experimental, los animales fueron sometidos a un periodo de aclimatación (7 días) donde se alimentaron con dieta estándar (Purina Rodent Chow 5001; 6% grasa, 22% proteína, 70% carbohidratos) y agua *ad libitum*. Tras la aclimatación, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en siete grupos de 10 ratas cada uno, de los cuales seis grupos fueron inducidos a DM2, mientras que un grupo fue catalogado como control sano, el cual fue alimentado con dieta estándar *ad libitum* durante todo el experimento.

5.2.3.1. Inducción de diabetes mellitus tipo 2

En la Figura 1 se muestra el diagrama de inducción de obesidad y resistencia a la insulina por medio de la administración *ad libitum* de una dieta alta en grasa y fructosa (DAGF, dieta estándar adicionada con 20% de manteca de cerdo y 20% de fructosa) durante 12 semanas. Posteriormente, a 60 ratas se les realizó la inducción de DM2 por medio de una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) disuelta en una solución amortiguadora de citratos (0.1 M, pH 4.5) a una dosis de 30 mg/kg de peso corporal y a 10 ratas se les inyectó solo el amortiguador de citrato. Se continuó con la administración *ad libitum* de la DAGF durante una semana, y se realizó la medición de los niveles de glucosa en ayuno de 8 h con un glucómetro digital tomando una muestra de sangre de la vena caudal. Las ratas que presentaron niveles de glucosa >160 mg/dL fueron consideradas con DM2. Se continuó con la administración *ad libitum* de dieta alta en grasa y fructosa durante 4 semanas más (Figuroa-Pérez *et al.*, 2018). Lo anterior permitió establecer las alteraciones metabólicas en el modelo animal, el cual simula el desarrollo y la progresión de DM2 asociada a la obesidad en seres humanos.

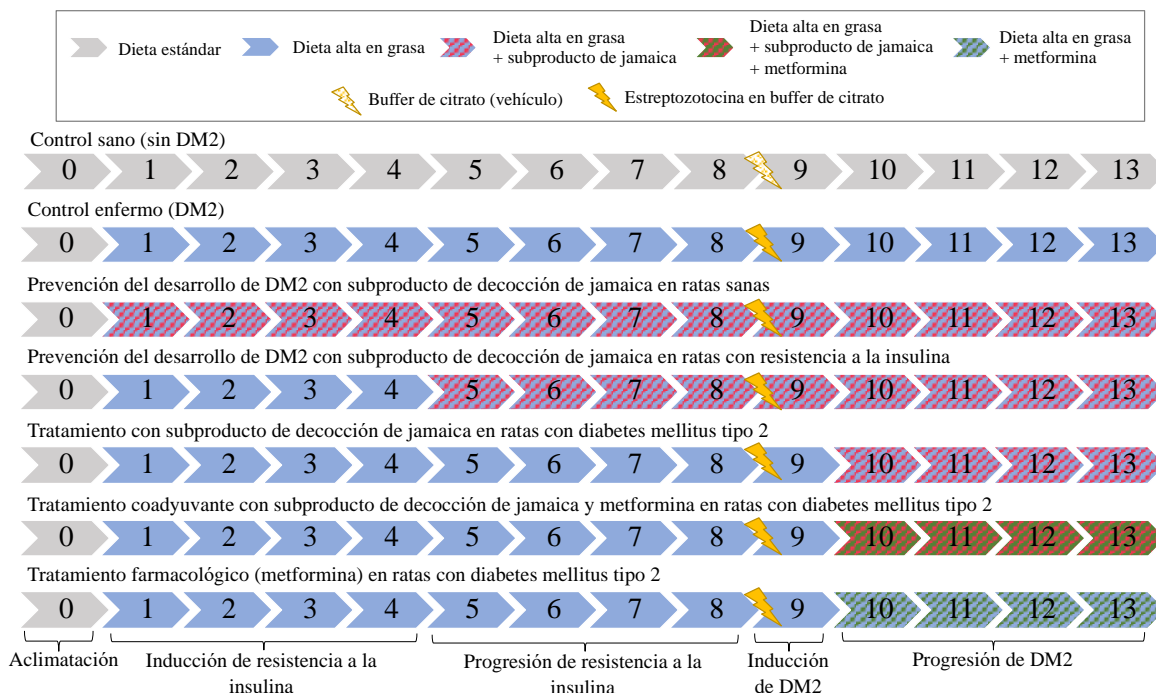


Figura 1. Estrategia experimental para la inducción de RI y DM2 en ratas *Wistar* macho.

5.2.3.2. Grupos controles

Se incluyó un grupo control sano, al cual se le administró dieta estándar *ad libitum* durante todo el estudio, y se realizó una inyección intraperitoneal con el vehículo (solución amortiguadora de citratos, 0.1 M, pH 4.5) al inicio de la semana 13. Se consideró un grupo control enfermo (con DM2), al cual se le administró DAGF *ad libitum* durante todo el estudio, realizando la inyección intraperitoneal con STZ al inicio de la semana 13 como se describe en la sección anterior. Se incluyó un grupo control enfermo (con DM2) con tratamiento farmacológico, al cual se le administró DAGF *ad libitum* durante todo el estudio, realizando la inyección intraperitoneal con STZ al inicio de la semana 13 descrita anteriormente, tras lo cual se inició con la administración oral diaria de una dosis de 200 mg/kg/día de metformina (vía intragástrica) durante 4 semanas.

5.2.3.3. Grupos de tratamientos

Se evaluó el efecto de la suplementación del subproducto de decocción de jamaica (SJ) como una estrategia de prevención y tratamiento de la DM2:

(i) Prevención del desarrollo de DM2. Se administró el subproducto de decocción de jamaica (SJ, 5 g/kg de peso corporal/día) junto con la (DAGF+SJ) desde el inicio del estudio experimental, realizando la inyección intraperitoneal con STZ para la inducción de DM2 al inicio de la semana 13.

(ii) Prevención del desarrollo de DM2 en ratas inducidas con resistencia a la insulina. Se administró únicamente DAGF hasta la semana 8, posteriormente se realizó la administración de DAGF+SJ desde la semana 9 (5 g/kg de peso corporal/día) hasta finalizar el estudio experimental, realizando la inyección intraperitoneal con STZ para la inducción de DM2 al inicio de la semana 13.

(iii) Tratamiento único de la DM2. Se administró la DAGF hasta la semana 12, tras lo cual se realizó la inyección intraperitoneal con STZ para la inducción de DM2. Una semana después de la inducción a DM2, se inició con la administración DAGF+SJ (5 g/kg de peso corporal/día) durante 4 semanas.

(iv) Tratamiento coadyuvante de la DM2. Se administró la DAGF hasta la semana 12, tras lo cual se realizó la inyección intraperitoneal con STZ para la inducción de DM2. Una semana después de la inducción a DM2, se inició con la administración de DAGF+SJ (5 g/kg de peso corporal/día) junto con metformina (200 mg/kg de peso corporal/día, vía intragástrica) durante 4 semanas.

Las composiciones nutrimentales de las dietas administradas a los modelos biológicos durante el proceso de tratamiento se encuentran especificadas en el Cuadro 2.

5.2.3.4. Monitoreo de los animales

Se llevó a cabo el registro diario del consumo de alimento y agua, mientras que el peso corporal fue registrado de manera semanal durante todo el experimento. Tras ocho semanas de la inducción con la dieta alta en grasa y fructosa, se realizó una toma de muestra sanguínea de la vena de la cola para la determinación del estado de resistencia a la insulina. Se realizó el monitoreo de glucosa en ayuno (8 h) cada semana tras la inducción de DM2 con STZ.

Cuadro 2. Contenido nutrimental de las dietas aplicadas a los modelos biológicos. (Elaboración propia).

| Nutriente (%) | Dieta estándar | Dieta alta en grasa y fructosa | Dieta alta en grasa y fructosa suplementada con un 6.2% de subproducto de jamaica |
|----------------------|-----------------------|---------------------------------------|--|
| Humedad | 6.00 | 3.68 | 3.62 |
| Cenizas | 7.56 | 5.01 | 5.11 |
| Proteínas | 23.33 | 13.23 | 12.37 |
| Lípidos | 6.07 | 26.08 | 23.58 |
| Saturados | 0.00 | 20.00 | 20.00 |
| Fibra cruda | 4.30 | 1.10 | 0.80 |
| Carbohidratos | 52.64 | 51.66 | 55.07 |
| Fructosa | 0.00 | 20.00 | 20.00 |

Los valores representan la media (n=2) reportados en porcentaje (%) de materia seca.

5.2.3.5. Eutanasia y obtención de muestras biológicas

Después de las 4 semanas de tratamiento, los animales fueron colocados en jaulas metabólicas para la recolección de orina. Luego, los animales en ayuno de 12 h fueron anestesiados con una sobredosis individualizada de pentobarbital sódico y decapitados con guillotina. Se recolectaron muestras de sangre, las cuales se centrifugaron a 3000 g a 4 °C durante 10 min, para obtener suero y plasma, los cuales se almacenaron a -70 °C hasta su análisis. Se realizó una incisión con bisturí desde el tórax hasta el ano; se recolectaron páncreas y riñones, los cuáles se lavaron con solución fisiológica al 0.9% y fueron almacenados en solución amortiguadora de formalina al 10% (pH 7.6) a temperatura ambiente para su posterior análisis.

5.2.4. Determinación del estado de resistencia a la insulina

Los análisis bioquímicos fueron realizados en la Unidad de Análisis Clínicos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en equipos automatizados utilizando los controles de calidad correspondientes. La determinación de glucosa en suero se realizó utilizando un kit enzimático colorimétrico (Spinreact) y la determinación de insulina en suero se realizó utilizando

un kit de ELISA tipo sandwich para rata (ALPCO), en ambas siguiendo las instrucciones del fabricante. La estimación del estado de resistencia a la insulina se llevó a cabo mediante la determinación del modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR) y beta (HOMA-beta), el índice de verificación de sensibilidad cuantitativa a la insulina (QUICKI) y la relación glucosa-insulina en ayunas (FGIR) con las siguientes ecuaciones:

$$HOMA - IR = \frac{Glucosa \left(\frac{mg}{dL}\right) * Insulina \left(\frac{\mu M}{mL}\right)}{2430}$$

$$HOMA - Beta = \frac{Insulina \left(\frac{ng}{mL}\right) * 360}{Glucosa \left(\frac{mg}{dL}\right) - 63}$$

$$QUICKI = \frac{1}{\text{Log} \left[Insulina \left(\frac{\mu M}{mL}\right) \right] + \text{Log} \left[Glucosa \left(\frac{mg}{dL}\right) \right]}$$

$$FGIR = \frac{Glucosa \left(\frac{mg}{dL}\right)}{Insulina \left(\frac{\mu M}{mL}\right)}$$

5.2.5. Determinación del perfil lipídico

La determinación de colesterol total, triglicéridos y colesterol HDL en suero se realizó utilizando kits enzimáticos colorimétricos (Spinreact) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2.6. Determinación de la función renal

La determinación de urea, creatinina y ácido úrico en suero y orina se realizó utilizando kits enzimáticos colorimétricos (Spinreact) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se estimó la tasa de filtración glomerular (TFG) a través de las ecuaciones descritas por Besseling *et al.* (2021):

Si la concentración de creatinina en plasma fue <52 µmol/L:

$$TFG = 880 \times W^{0.695} \times C^{-0.660} \times U^{-0.391}$$

Si la concentración de creatinina en plasma fue $>52 \mu\text{mol/L}$:

$$TFG = 5862 \times W^{0.695} \times C^{-1.150} \times U^{-0.391}$$

Donde:

W: Peso (g).

C: Concentración de creatinina ($\mu\text{mol/L}$).

U: Concentración de urea (mmol/L).

5.2.7. Evaluación del estado antioxidante

Se realizó la estimación de la capacidad antioxidante en plasma por medio de ABTS y FRAP en el plasma. Las muestras fueron desproteinizadas, mezclándolas con 500 μl de acetonitrilo frío (1:1) por 2 min a 25°C . Luego, las muestras se centrifugaron a 9500 g durante 10 min a 4°C y se recuperó la fase superior. Las determinaciones de capacidad antioxidante se realizaron de acuerdo con las metodologías mencionadas anteriormente (secciones 5.2.2.5.2 y 5.2.2.5.3). Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox/mL de plasma.

5.2.8. Análisis estadísticos

Para los datos de la caracterización de la muestra de estudios, los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm desviación estándar. Para los datos obtenidos del modelo animal, los datos se expresaron como la media \pm error estándar. Para determinar si los datos del modelo animal debían analizarse con pruebas paramétricas o no paramétricas, la distribución de datos se evaluó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad con la prueba de Levene. Las variables paramétricas fueron analizadas con la prueba de Tukey, mientras que las variables no paramétricas fueron analizadas con la prueba de U de Mann-Whitney. Los resultados fueron analizados con el paquete estadístico de JMP 11 portable.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización del subproducto de la decocción de cálices de jamaica

6.1.1. Caracterización nutrimental y nutracéutica

Los cálices de jamaica son una fuente importante de compuestos bioactivos como fibra dietética (36-38%) y compuestos fenólicos (3-4%) (Amaya-Cruz *et al.*, 2019; Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2014). Estos últimos se clasifican en polifenoles extraíbles (PE) y polifenoles no extraíbles (PNE). Los compuestos fenólicos de la dieta tienen efectos fisiológicos sobre la reducción del riesgo de enfermedades crónicas tales como DM2, hipertensión arterial y enfermedades coronarias, el aumento de años de vida saludable y la promoción de un envejecimiento activo y saludable, además el consumo de estos puede disminuir la incidencia de enfermedades coronarias (Lutz *et al.*, 2019).

Se han realizado trabajos previos con esta materia prima en el grupo de investigación (Amaya-Cruz *et al.*, 2019), donde se evidenció que el residuo de la decocción de cálices de jamaica tiene un alto contenido de fibra dietaria, de la cual la fibra dietaria insoluble es 3.5 veces más que la soluble, lo cual es asociado a la lixiviación de la fibra soluble a la decocción. En el presente trabajo, se muestran los resultados del análisis químico proximal y la cuantificación de fibra total, soluble e insoluble (Cuadro 3) del material de estudio, donde se encontraron valores ligeramente superiores a los informados en el trabajo precedente por Amaya-Cruz *et al.* (2019) en la fibra dietaria, tanto soluble como insoluble.

Se presentan los resultados del contenido de compuestos fenólicos del subproducto de la decocción de cálices de jamaica en el Cuadro 4. En el análisis se observó que el contenido de polifenoles no extraíbles, sumando los contenidos en las hidrólisis ácida y alcalina fue 1.6 veces mayor al contenido de los polifenoles extraíbles y las proantocianidinas esta diferencia fue 3 veces mayor; lo anterior podría ser por dos efectos, por un lado, la lixiviación de compuestos polifenólicos extraíbles a la decocción, disminuyendo su proporción en el residuo y, por otro lado, al concentrarse la fibra dietaria insoluble, como consecuencia se concentran los

polifenoles que están interactuando con ella, es decir, aquellos analizados en la fracción no extraíble.

Cuadro 3. Análisis químico proximal del subproducto de la decocción de cálices de jamaica

| Nutriente | Contenido (%) |
|--------------------------|----------------------|
| Humedad | 5.51 ± 0.07 |
| Cenizas | 7.43 ± 0.14 |
| Extracto Etéreo | 0.37 ± 0.02 |
| Proteína cruda | 5.52 ± 0.01 |
| Hidratos de Carbono | 2.25 ± 0.12 |
| Fibra dietaria | |
| Fibra total dietaria | 78.94 ± 0.07 |
| Fibra dietaria soluble | 17.71 ± 0.07 |
| Fibra dietaria insoluble | 62.08 ± 1.81 |

Media ± desviación estándar (n=2)

Cuadro 4. Contenido de compuestos polifenólicos simples y poliméricos del subproducto de la decocción de cálices de jamaica

| Compuesto | Contenido (mg/g) |
|------------------------------------|-------------------------|
| Polifenoles totales | 38.70 ± 1.99 |
| Polifenoles extraíbles | 14.95 ± 0.07 |
| Polifenoles de hidrolisis acida | 13.14 ± 1.10 |
| Polifenoles de hidrolisis alcalina | 10.61 ± 0.95 |
| Proantocinidinas totales | 3.47 ± 0.06 |
| Proantocianidinas extraíbles | 0.87 ± 0.03 |
| Proantocianidinas no extraíbles | 2.60 ± 0.02 |
| Flavonoides | 7.91 ± 0.10 |
| Antocianinas | 1.29 ± 0.10 |

Media ± desviación estándar (n=2).

6.1.2. Perfil de polifenoles y ácidos orgánicos extraíbles y no extraíbles

Se muestra la composición de la fracción extraíble y no extraíble del subproducto de la decocción de los cálices de jamaica en el Cuadro 5. Se realizó la identificación y cuantificación de un total de 29 polifenoles y tres ácidos orgánicos en la fracción extraíble, y de siete polifenoles y tres ácidos orgánicos en la fracción no extraíble, que es compuesta por los extractos obtenidos en la hidrólisis acida y alcalina. Es importante mencionar que este es el primer estudio que reporta la presencia de ácidos orgánicos en la fracción no extraíble del subproducto de la decocción de cálices de jamaica, ya que existen pocos estudios que se han propuesto identificar componentes no fenólicos unidos a la matriz vegetal.

Las antocianinas representan el 0.6% de los compuestos identificados en la fracción extraíble, ésta baja proporción es consecuencia de su lixiviación a la decocción, así como a su degradación térmica durante el proceso de decocción. La delfinidina sambubiosida es la antocianina que se encuentra en mayor proporción, este compuesto bioactivo fue identificado en los extractos acuoso y etanólicos de la planta en proporciones 2 veces mayores y 12 veces mayores respectivamente (Izquierdo-Vega *et al.*, 2020).

En general, las antocianinas, particularmente la delfinidina 3-sambubiosido, son pigmentos solubles en agua responsables del color rojo azulado de diferentes vegetales y son parcialmente asociados a los efectos antihipertensivos e hipocolesterolémicos de la jamaica (Escobar-Ortiz *et al.*, 2021).

Respecto a los flavonoides no pigmentados, Izquierdo-Vega *et al.* (2020) identificaron hibiscitrina (hibiscetina-3-glucósido), sabdaritrina, gosipitrina, gositrina y otros glucósidos de gosipetina, quercetina y luteolina en cálices de jamaica. En nuestro estudio, los flavonoides identificados en la fracción extraíble del subproducto de la decocción de cálices de jamaica representaron solamente el 2% de todos los compuestos presentes en esta fracción, siendo La quercetina el compuesto mayoritario.

Cuadro 5. Perfil de polifenoles y ácidos orgánicos extraíbles y no extraíbles del subproducto de la decocción de cálices de jamaica

| Identificación putativa / confirmada | Fórmula molecular | Tiempo de retención (min) | Masa esperada (Da) | Masa observada (Da) | m/z observada | Error de masa (ppm) | Aducto | Fragmentos | Concentración (mg/g) | | | | | | | | |
|--|-------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|---------------|---------------------|--------------------|--|------------------------|---|------|-------------------------------------|---|----------------------------------|------|------|------|
| | | | | | | | | | Polifenoles extraíbles | | | Polifenoles hidrolizables alcalinos | | Polifenoles hidrolizables ácidos | | | |
| <i>Antocianinas</i> | | | | | | | | | 0.53 | ± | 0.28 | ND | | ND | | | |
| Delfinidina sambubiósida | C26H29O16 | 3.59 | 597.1456 | 597.1436 | 597.1431 | -3.2458 | [M] ⁺ | 303.05903 | 0.35 | ± | 0.03 | ND | | ND | | | |
| Delfinidina hexósida | C21H21O12 | 3.68 | 465.1033 | 465.1071 | 465.1065 | 8.1315 | [M] ⁺ | 303.08267 | 0.18 | ± | 0.24 | ND | | ND | | | |
| <i>Flavonoles</i> | | | | | | | | | 1.76 | ± | 0.19 | ND | | ND | | | |
| Kaempferol aldo pentosil-hexósida | C26H28O15 | 4.20 | 580.1428 | 580.1432 | 579.1360 | 0.7137 | [M-H] ⁻ | 284.03284 | 0.23 | ± | 0.04 | ND | | ND | | | |
| Miricetina rutinosido | C27H30O17 | 6.78 | 626.1483 | 626.1482 | 625.1409 | -0.1203 | [M-H] ⁻ | 316.02251, 178.99842, 151.00369 | 0.02 | ± | 0.00 | ND | | ND | | | |
| Quercetina aldo pentosil-rutinoside | C32H38O20 | 6.81 | 742.1956 | 742.1957 | 741.1884 | 0.0777 | [M-H] ⁻ | 300.02781, 178.99754, 151.00338 | 0.01 | ± | 0.00 | ND | | ND | | | |
| Miricetina hexósida | C21H20O13 | 7.00 | 480.0904 | 480.0912 | 479.0839 | 1.7001 | [M-H] ⁻ | 316.02261, 178.99803, 151.00300 | 0.08 | ± | 0.00 | ND | | ND | | | |
| Kaempferol rhamnósil-hexósida-rhamnósida | C33H40O19 | 8.07 | 740.2164 | 740.2165 | 739.2092 | 0.1643 | [M-H] ⁻ | 284.03273 | ND | | | ND | | ND | | | |
| Quercetina rutinosida | C27H30O16 | 8.70 | 610.1534 | 610.1532 | 609.1459 | -0.2614 | [M-H] ⁻ | 300.02711, 178.99815, 151.00322, 107.01334 | 0.33 | ± | 0.07 | ND | | ND | | | |
| Quercetina hexósida | C21H20O12 | 9.14 | 464.0955 | 464.0959 | 463.0886 | 0.9470 | [M-H] ⁻ | 300.02711, 178.99800, 151.00321, 107.01259 | 0.20 | ± | 0.05 | ND | | ND | | | |
| Kaempferol hexósida-rhamnoside | C27H30O15 | 10.74 | 594.1585 | 594.1581 | 593.1508 | -0.6093 | [M-H] ⁻ | 285.0397 | 0.06 | ± | 0.01 | ND | | ND | | | |
| Miricetina | C15H10O8 | 11.07 | 318.0376 | 318.0378 | 317.0305 | 0.7452 | [M-H] ⁻ | 179.03454, 151.00331, 137.02392 | 0.14 | ± | 0.02 | ND | | ND | | | |
| Quercetina* | C15H10O7 | 11.40 | 302.0427 | 302.0427 | 301.0354 | 0.1508 | [M-H] ⁻ | 178.99784, 151.00334, 107.01267 | 0.69 | ± | 0.08 | ND | | ND | | | |
| <i>Ácidos hidroxibenzoicos</i> | | | | | | | | | 7.56 | ± | 0.31 | 4.61 | ± | 0.62 | 3.25 | ± | 0.11 |
| Ácido gálico* | C7H6O5 | 3.01 | 170.0215 | 170.0213 | 169.0140 | -1.3736 | [M-H] ⁻ | 125.02403 | 0.34 | ± | 0.02 | ND | | ND | | | |
| Ácido dihidroxibenzoico hexósido | C13H16O9 | 3.20 | 316.0794 | 316.0795 | 315.0722 | 0.1541 | [M-H] ⁻ | 153.01887, 136.99077, 109.02902 | 4.83 | ± | 0.27 | 4.61 | ± | 0.62 | ND | | |
| Ácido vanílico | C8H8O4 | 3.24 | 168.0423 | 168.0420 | 167.0347 | -1.8337 | [M-H] ⁻ | 136.99077, 109.02902 | 0.10 | ± | 0.00 | ND | | ND | | | |
| Ácido galoilquinico isómero I | C14H16O10 | 3.28 | 344.0743 | 344.0748 | 343.0675 | 1.1862 | [M-H] ⁻ | 191.05583, 169.05030 | ND | | | ND | | ND | | | |
| Ácido dihidroxibenzoico isómero I (3,4-ácido dihidroxibenzoico)* | C7H6O4 | 3.37 | 154.0266 | 154.0266 | 153.0193 | 0.0096 | [M-H] ⁻ | 137.02418, 109.02925 | 0.32 | ± | 0.00 | ND | | 0.62 | ± | 0.04 | |
| Ácido hidroxibenzoico isómero I | C7H6O3 | 3.96 | 138.0317 | 138.0317 | 137.0244 | 0.1860 | [M-H] ⁻ | Sin fragmentos | 1.78 | ± | 0.00 | ND | | 2.63 | ± | 0.15 | |
| Ácido dihidroxibenzoico isómero II | C7H6O4 | 4.10 | 154.0266 | 154.0266 | 153.0193 | -0.1822 | [M-H] ⁻ | 136.86270, 109.02951 | 0.11 | ± | 0.01 | ND | | ND | | | |
| Ácido metilgálico | C8H8O5 | 4.47 | 184.0372 | 184.0372 | 183.0299 | 0.1824 | [M-H] ⁻ | 169.01423, 139.04017, 125.02445 | 0.09 | ± | 0.00 | ND | | ND | | | |
| Ácido galoilquinico isómero II | C14H16O10 | 7.67 | 344.0743 | 344.0746 | 343.0673 | 0.6374 | [M-H] ⁻ | 191.05583, 169.05030 | ND | | | ND | | ND | | | |
| Ácido galoilquinico isómero III | C14H16O10 | 7.96 | 344.0743 | 344.0747 | 343.0674 | 0.8987 | [M-H] ⁻ | 190.99818, 169.98481 | ND | | | ND | | ND | | | |
| Ácido hidroxibenzoico isómero II | C7H6O3 | 8.91 | 138.0317 | 138.0316 | 137.0244 | -0.3855 | [M-H] ⁻ | Sin fragmentos | ND | | | ND | | ND | | | |

*Identificación confirmada en comparación con estándares comerciales. Identificación putativa por comparación de la fórmula molecular del ion pseudomolecular (con error de masas <5 ppm), análisis de fragmentos característicos y análisis de distribución isotópica. ND: no detectado.

Cuadro 5 (continuación). Perfil de polifenoles y ácidos orgánicos extraíbles y no extraíbles del subproducto de la decocción de cálices de jamaica.

| Identificación putativa / confirmada | Fórmula molecular | Tiempo de retención (min) | Masa esperada (Da) | Masa observada (Da) | m/z observada | Error de masa (ppm) | Aducto | Fragmentos | Concentración (mg/g) | | | | | | | | |
|---|-------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|---------------|---------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------|---|------|-------------------------------------|---|----------------------------------|------|---|------|
| | | | | | | | | | Polifenoles extraíbles | | | Polifenoles hidrolizables alcalinos | | Polifenoles hidrolizables ácidos | | | |
| <i>Ácidos hidroxicinnámicos</i> | | | | | | | | | 29.06 | ± | 0.30 | 1.47 | ± | 0.05 | 0.14 | ± | 0.01 |
| Ácido cafeoilquinico isómero I | C16H18O9 | 3.46 | 354.0951 | 354.0953 | 353.0880 | 0.6817 | [M-H] ⁻ | 191.05586, 178.03485, 135.04501 | 13.74 | ± | 0.10 | ND | | | ND | | |
| Ácido cumaroilquinico isómero I | C16H18O8 | 3.98 | 338.1002 | 338.1007 | 337.0934 | 1.4770 | [M-H] ⁻ | 191.05603, 163.04009, 119.05021 | 1.52 | ± | 0.01 | ND | | | ND | | |
| Ácido cafeico hexósido | C15H18O9 | 4.01 | 342.0951 | 342.0956 | 341.0884 | 1.6240 | [M-H] ⁻ | 178.99889, 135.01643 | 0.10 | ± | 0.00 | 0.20 | ± | 0.01 | | | ND |
| Ácido cafeoilquinico isómero II | C16H18O9 | 4.11 | 354.0951 | 354.0956 | 353.0883 | 1.5046 | [M-H] ⁻ | 191.05586, 179.05521, 135.04492 | ND | | | ND | | | | | ND |
| Ácido cafeoilquinico isómero III (ácido clorogénico)* | C16H18O9 | 4.28 | 354.0951 | 354.0958 | 353.0885 | 1.9330 | [M-H] ⁻ | 191.03346, 179.03518, 135.04523 | 8.69 | ± | 0.19 | ND | | | | | ND |
| Ácido ferúlico hexósido | C16H20O9 | 4.71 | 356.1107 | 356.1112 | 355.1040 | 1.4254 | [M-H] ⁻ | 193.05060, 178.02642, 135.04506 | ND | | | ND | | | | | ND |
| Ácido cafeico* | C9H8O4 | 4.72 | 180.0423 | 180.0424 | 179.0351 | 0.8791 | [M-H] ⁻ | 135.04525 | 0.29 | ± | 0.00 | ND | | | | | ND |
| Ácido ferulilquinico isómero I | C17H20O9 | 4.89 | 368.1107 | 368.1116 | 367.1043 | 2.3544 | [M-H] ⁻ | 192.99567, 134.03622 | 1.00 | ± | 0.02 | ND | | | | | ND |
| Ácido cumaroilquinico isómero II | C16H18O8 | 5.31 | 338.1002 | 338.1008 | 337.0935 | 1.9346 | [M-H] ⁻ | 191.03403, 163.04014, 119.05039 | 2.06 | ± | 0.01 | ND | | | | | ND |
| Ácido ferulilquinico isómero II | C17H20O9 | 6.28 | 368.1107 | 368.1114 | 367.1041 | 1.8727 | [M-H] ⁻ | 192.97484, 179.10743, 134.03476 | 0.73 | ± | 0.02 | ND | | | | | ND |
| Ácido p-cumárico* | C9H8O3 | 6.37 | 164.0473 | 164.0474 | 163.0401 | 0.2458 | [M-H] ⁻ | 119.05004 | 0.06 | ± | 0.00 | 1.27 | ± | 0.04 | | | ND |
| Ácido ferulilquinico isómero III | C17H20O9 | 7.23 | 368.1107 | 368.1112 | 367.1040 | 1.3841 | [M-H] ⁻ | 191.05562, 179.03476, 135.04494 | 0.86 | ± | 0.01 | ND | | | | | ND |
| Ácido ferúlico* | C10H10O4 | 10.74 | 194.0579 | 194.0572 | 193.0499 | -3.8475 | [M-H] ⁻ | 178.02718, 134.86543 | 0.02 | ± | 0.00 | ND | | | 0.20 | ± | 0.01 |
| Ácido sinápico* | C11H12O5 | 11.17 | 224.0685 | 224.0674 | 223.0601 | -4.9933 | [M-H] ⁻ | 208.03765 | ND | | | ND | | 0.68 | ± | | 0.13 |
| <i>Ácidos orgánicos</i> | | | | | | | | | 46.03 | ± | 3.50 | 15.95 | ± | 2.27 | 0.72 | ± | 0.40 |
| Ácido cítrico* | C6H8O7 | 1.38 | 192.0270 | 192.0265 | 191.0192 | -2.7462 | [M-H] ⁻ | 111.00859 | 11.64 | ± | 0.88 | 0.37 | ± | 0.01 | | | ND |
| Ácido hibiscus | C6H8O8 | 0.61 | 208.0219 | 208.0215 | 207.0142 | -1.9499 | [M-H] ⁻ | 189.00344, 127.00330 | 33.38 | ± | 2.27 | 3.36 | ± | 0.56 | | | ND |
| Ácido hidroxicítrico | C6H8O8 | 1.28 | 208.0219 | 208.0216 | 207.0144 | -1.3813 | [M-H] ⁻ | 189.00371, 127.00347 | ND | | | ND | | | | | ND |
| Ácido quinico | C7H12O6 | 0.59 | 192.0634 | 192.0630 | 191.0557 | -1.9364 | [M-H] ⁻ | 127.00344 | 1.00 | ± | 0.35 | 12.22 | ± | 1.70 | 0.72 | ± | 0.40 |

*Identificación confirmada en comparación con estándares comerciales. Identificación putativa por comparación de la fórmula molecular del ion pseudomolecular (con error de masas <5 ppm), análisis de fragmentos característicos y análisis de distribución isotópica. ND: no detectado.

De acuerdo con Lee & Kim (2018) y Herranz-López (2020), la isorhamnetina, un derivado metilado de la quercetina, proveniente del extracto de *H. sabdariffa* promovió la biogénesis mitocondrial en los adipocitos 3T3-L1 a través de la expresión de genes mitocondriales, la replicación del ADN mitocondrial y la activación de AMPK, lo que sugiere que este flavonoide son los compuestos responsables de la capacidad de la planta para revertir el estrés metabólico inducido por la glucolipototoxicidad a través de la disminución del almacenamiento de grasa y el aumento de la oxidación de ácidos grasos mediada por AMPK. Por otro lado, es importante destacar la ausencia de flavonoides, incluyendo antocianinas, en la fracción no extraíble, ya que estos componentes no se encuentran ligados a la fibra dietaria de esta matriz vegetal. Por el contrario, otras matrices vegetales, como el subproducto obtenido durante el proceso de vinificación, sí presentan flavonoides en la fracción hidrolizables (Mazza *et al.*, 2019).

Los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos representan el 8.9% y el 34.2% respectivamente de los compuestos identificados en la fracción extraíble del subproducto de la decocción de cálices de jamaica. El ácido hidroxibenzoico mayoritario presente es el ácido dihidroxibenzoico hexósido que representa el 63.9% de toda la subfamilia. En el caso de los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos cafeoilquínico isómero I e isómero III, este último también conocido como ácido clorogénico, son los compuestos mayoritarios de este grupo, representando el 77.2% de toda la subfamilia. En la fracción obtenida a partir de la hidrolisis ácida y alcalina se identificaron tres ácidos hidroxibenzoicos, como mayoritario el ácido dihidroxibenzoico hexósido y cuatro ácidos hidroxicinámicos, donde el ácido p-cumárico representó el 78.9%.

Se ha demostrado el efecto antiobesogénico y cardioprotector de los ácidos fenólicos como el ácido p-cumárico, por la reducción del colesterol total, triglicéridos y ácidos grasos libres. También, se evidenció que los ácidos clorogénicos poseen actividad antidiabética (Rashmi & Negi, 2020; Zhu *et al.*, 2012).

Se encontraron cantidades elevadas de ácidos orgánicos en el subproducto de la decocción de cálices de jamaica, con el 54.2% de los compuestos identificados en

conjunto en las fracciones extraíble como no extraíble, en específico el ácido hibiscus, cítrico y quínico son los compuestos mayoritarios, detectándose en mayor concentración el ácido hibiscus en la porción extraíble (72.5%) y el ácido quínico en la no extraíble (76.6%). Cabe mencionar que la presencia de una alta concentración de ácido quínico en la fracción hidrolizable alcalina podría estar asociado a la hidrólisis de los ácidos fenólicos esterificados en este ácido orgánico, como los ácidos cafeoilquínicos, cumaroilquínicos y feruloilquínicos, ya que esta hidrólisis está dirigida en la ruptura de enlaces éter y éster. Los demás ácidos orgánicos identificados en este estudio no se conjugan con ácidos polifenólicos en la ruta de síntesis de estos componentes, por lo que su presencia en la fracción no extraíble sugiere que se encontraban ligados a la fibra dietaria mediante enlaces glucosídicos (hidrólisis ácida) y enlaces éter/éster (hidrólisis alcalina). Con relación a las propiedades terapéuticas y/o farmacológicas del ácido hibiscus, algunos estudios como el de Hansawasdi *et al.* (2000) e Izquierdo-Vega *et al.* (2020) sugieren que éste tiene un efecto inhibitorio contra la α -amilasa y la α -glucosidasa, enzimas que llevan a cabo la digestión de los carbohidratos para su posterior absorción, lo que sugiere un potencial efecto antihiper glucémico. Dicho mecanismo lo lleva a cabo la acarbosa, un fármaco comúnmente recomendado para regular los niveles de glucosa postprandial en sujetos con resistencia a la insulina y DM2.

Los estudios farmacológicos *in vitro* e *in vivo* demostraron que el ácido quínico presenta diversas actividades biológicas, como actividad antioxidante y antidiabética. La actividad antidiabética de este ácido se logra mediante la estimulación de la secreción de insulina mediante la movilización de Ca^{2+} de las reservas intracelulares y el aumento de la relación NAD(P)H/NAD(P)^+ (Benali *et al.*, 2022). Con base en lo anterior, los compuestos identificados en la fracción extraíble y no extraíble del residuo de la decocción de cálices de jamaica tienen diversos efectos biológicos, por lo que esta matriz podría mostrar un efecto benéfico en la prevención y/o el control de las alteraciones metabólicas asociadas a la DM2.

6.1.3. Capacidad antioxidante

El concepto de capacidad antioxidante describe la capacidad de las moléculas redox en los alimentos y los sistemas biológicos para eliminar los radicales libres. Este concepto proporciona descripción detallada de los antioxidantes presentes en una muestra biológica, ya que considera los efectos aditivos y sinérgicos de todos los antioxidantes en lugar del efecto de compuestos individuales, y, por lo tanto, es útil para estudiar los beneficios potenciales para la salud. La mayoría de los ensayos emplean el mismo principio: se genera un radical o un compuesto activo redox y se determina la capacidad de una muestra biológica para eliminar el radical o para reducir el compuesto redox activo, aplicando un estándar apropiado para cuantificar la capacidad antioxidante (Floegel *et al.*, 2011).

Recientemente los antioxidantes naturales presentes en la dieta han sido tema de interés debido a su capacidad para contrarrestar los daños producidos por el exceso de radicales libres, lo que está asociado al desarrollo de diversas alteraciones metabólicas, incluyendo la resistencia a la insulina y la dislipidemia que caracterizan a la DM2, siendo que el estrés oxidativo también se encuentra implicado en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la DM2. Los mecanismos de acción asociados con la actividad antioxidante incluyen el secuestro de radicales libres y cambios en la transcripción de genes a través de la inducción o inhibición de factores de transcripción (Pérez-Torres *et al.*, 2021).

Los ensayos de capacidad antioxidante como ABTS, DPPH y FRAP se basan en una transferencia de electrones e implica la reducción de un oxidante que se observa con coloración al final de la reacción. ABTS y DPPH son los ensayos usualmente utilizados pero son limitados ya que se utilizan radicales no fisiológicos; mientras que para la técnica de FRAP no hay radicales libres involucrados pero se monitorea la reducción de hierro férrico (Fe^{3+}) a hierro ferroso (Fe^{2+}) (Floegel *et al.*, 2011).

En nuestro estudio se observó que los componentes de la fracción extraíble del subproducto de la decocción de cálices de jamaica mostraron una capacidad similar para el atrapamiento de los radicales ABTS y DPPH (Cuadro 6), mientras que en el

ensayo FRAP se obtuvo una concentración menor (59.8 veces), lo que podría estar relacionado con los diferentes mecanismos de acción antioxidante de cada componente individual. Se ha reportado que la sustitución del anillo fenólico con grupos electrodonadores aumenta el poder reductor, mientras que la presencia de conjugados alifáticos con doble ligaduras disminuye el poder reductor, por lo que la composición específica de compuestos bioactivos impacta en el poder antioxidante total, el cual puede ser estimado mediante el uso conjunto de diferentes ensayos.

Se puede observar a su vez, que en el ensayo DPPH presenta valores mayores en los extractos de la fracción de hidrolisis acida y alcalina (27.3 y 94.7 veces más respectivamente) al compararlo con la fracción extraíble de la planta, esto explicado por el hecho de que después del proceso de decocción los polifenoles no extraíbles se encuentran más concentrados en el SJ (Cuadro 6).

Cuadro 6. Capacidad antioxidante del subproducto de la decocción de cálices de jamaica.

| Ensayo de capacidad antioxidante | Fracción extraíble | Fracción hidrolizable ácida | Fracción hidrolizable alcalina |
|---|---------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| ABTS | 387.03 ± 7.00 | 46.80 ± 0.21 | 186.26 ± 1.08 |
| DPPH | 385.90 ± 6.42 | 10525.38 ± 2.33 | 36549.47 ± 9.76 |
| FRAP | 6.53 ± 0.46 | 1.20 ± 0.10 | 1.32 ± 0.03 |

Los valores representan la media ± la desviación estándar (n=2) reportado en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra (µM ET/g). FRAP (Poder antioxidante reductor del Hierro), DPPH (depleción del óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y ABTS (depleción del 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico).

Saura-Calixto (1998) define la fibra dietaria antioxidante como una materia vegetal con un elevado porcentaje de fibra dietaria y cantidades apreciables o adecuadas de antioxidantes naturales asociados a la matriz de los compuestos no digeribles. Por lo que el subproducto de la decocción de cálices de jamaica podía ser considerado como tal, ya que cumple con los requerimientos como presentar más del 50% de contenido de fibra, tener la capacidad de inhibir la oxidación lipídica equivalente a 200 mg de vitamina E y que esta capacidad antioxidante debe ser

intrínseca a partir de los constituyentes naturales presentes en ella y no adicionados; como comparativa Sayago-Ayerdi (2010) menciona que el orujo de uva blanca es considerado una fuente de fibra dietaria antioxidante mostrando una concentración de $124.4 \pm 0.3 \mu\text{M ET/g}$ de muestra en el ensayo de ABTS, 3.1 veces menor cantidad que la encontrada en nuestra investigación en la fracción extraíble del SJ.

6.2. Evaluación del efecto de la suplementación con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica sobre un modelo *in vivo* de diabetes mellitus tipo 2

6.2.1. Peso corporal

Las dietas altas en grasa y fructosa y con dosis bajas de estreptozotocina se utilizan en modelos biológicos murinos para simular las complicaciones a largo plazo de la DM2. Estudios refieren que los animales sometidos a esa inducción presentan disfunciones metabólicas asociadas con las diferentes etapas de la progresión de la enfermedad de DM2 en humanos: una fase prediabética temprana caracterizada por un período hiperinsulinémico con disglucemia moderada, seguida de una etapa tardía de DM2 con evidente hiperglucemia, normalización de la insulinemia, marcada dislipidemia, fibrosis hepática, insuficiencia de las células β pancreáticas y disfunción renal (Barrière *et al.*, 2018).

En la Figura 2 se muestra el registro del peso corporal durante las 18 semanas del periodo experimental. Se observó que de la semana 0 a la semana 12 se presentó un aumento gradual en el peso de todos los modelos animales, lo cual se relaciona con el aumento de tamaño y número de adipocitos generada por el mayor almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo; esto como consecuencia del consumo de cantidades elevadas de grasa administrada por la DAGF (Morales-Luna *et al.*, 2019). Se observó también que, desde la semana 8 hasta la 13, aumento el peso con diferencia estadísticamente significativa en los grupos que consumieron una DAGF al compararlo con el grupo estándar; mostrando la mayor separación observable en la decimotercera semana de estudio, donde todos los grupos con una DAGF tuvieron en promedio 1.1 veces más peso al compararlo con el grupo sano.

A partir de la semana 13, todos los grupos que fueron inducidos mostraron una pérdida de peso hasta el término del estudio, llevando incluso a que en la semana 14 todos los grupos fueran estadísticamente similares entre ellos al compararlo con el control sano; esto debido a que, de acuerdo con Barrière *et al.* (2018) la transición entre prediabetes y/o resistencia a la insulina a DM2 se caracteriza por una reducción de la leptina circulante, lo que se refleja con una alteración del equilibrio del tejido adiposo; esta lipólisis que se presenta se acompaña de una disminución en el aumento del peso corporal, aunado a una pérdida de masa muscular (Guillén-González, 2002). Con respecto a la suplementación con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica, se observó un menor peso corporal en comparación con los grupos control tanto sano como enfermo (3.3-8.7%; $p < 0.05$) al finalizar el estudio, lo cual podría ser atribuido a un efecto de saciedad o al catabolismo de los triglicéridos almacenados en tejido adiposo.

6.2.2. Consumo de alimento y agua

La polidipsia y la polifagia forman parte de las asociadas a la hiperglicemia crónica de la DM2. La pérdida de agua que se presenta en la DM2 estimula mecanismos cerebrales que conducen a que un paciente aumente la cantidad de agua y frecuencia su de consumo; por otro lado, la deficiencia en la utilización de la glucosa por parte de algunas regiones del cerebro como el hipotálamo activa vías que promueven el apetito, que lleva a incrementar la cantidad y frecuencia de consumo de alimento (Guillén-González, 2002; Vieira *et al.*, 2019). En la Figura 3 se muestran los datos del monitoreo de consumo de alimento durante el estudio. En promedio, las ratas consumieron entre 35 a 45 g por día, observándose una alta variabilidad en el consumo de alimento a lo largo del experimento. Sin embargo, se observa que el grupo alimentado con la dieta estándar mostró un consumo similar al inicio y al final del estudio, mientras que todos los animales inducidos a tendieron a disminuir el consumo de alimento, esto podría estar asociado a las diferencias en la palatabilidad y textura de las dietas. Con respecto a la suplementación con el subproducto de jamaica, no se observó una tendencia clara en su impacto en la alimentación de las ratas, lo que indica que no se observa un efecto de saciedad a la dosis administrada.

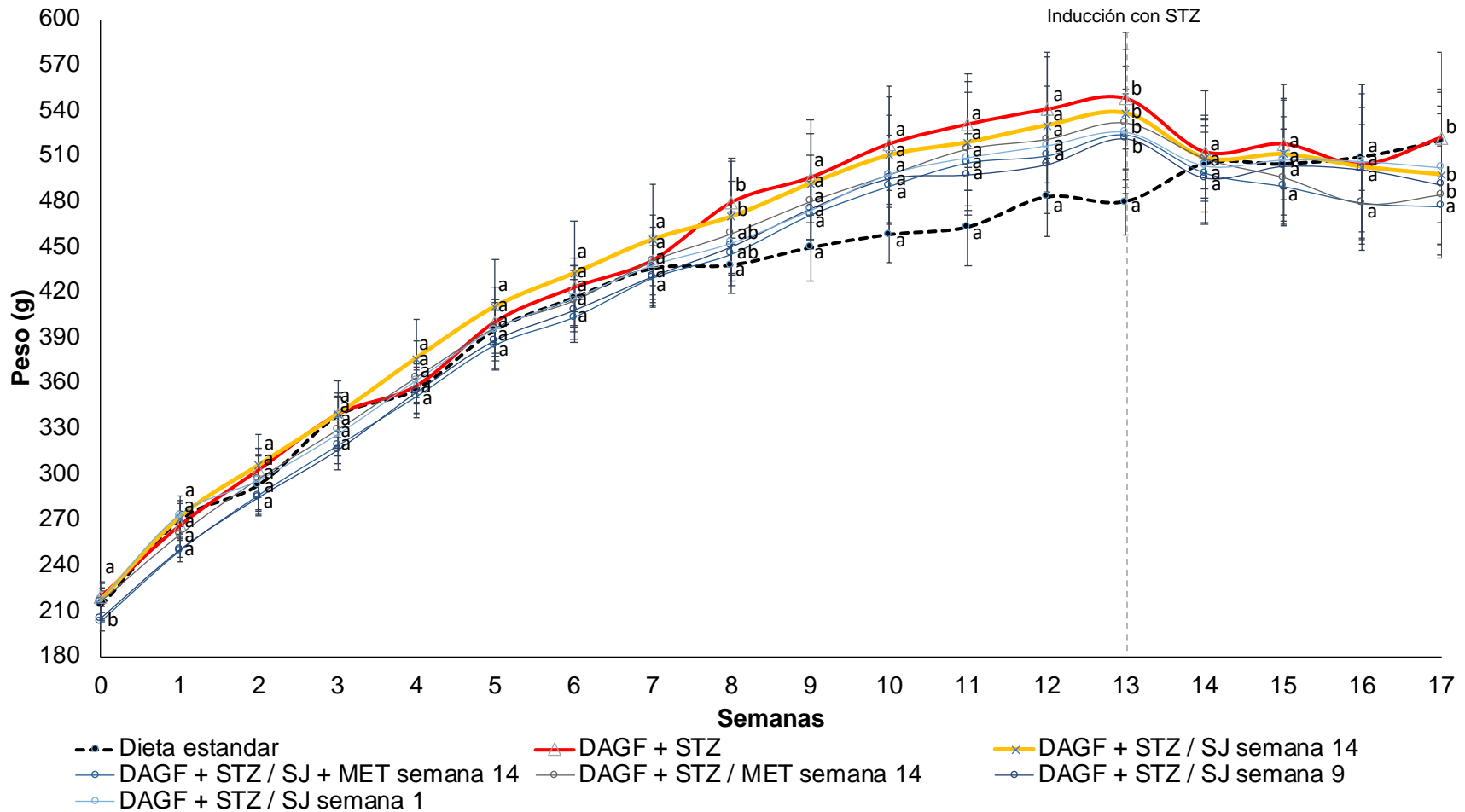


Figura 2. Monitoreo del peso corporal durante el desarrollo del modelo experimental. Los valores representan la media \pm desviación estándar. Acotaciones marcadas con diferente superíndice indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) utilizando la prueba de ANOVA o U de Mann-Whitney. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de Estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de Metformina.

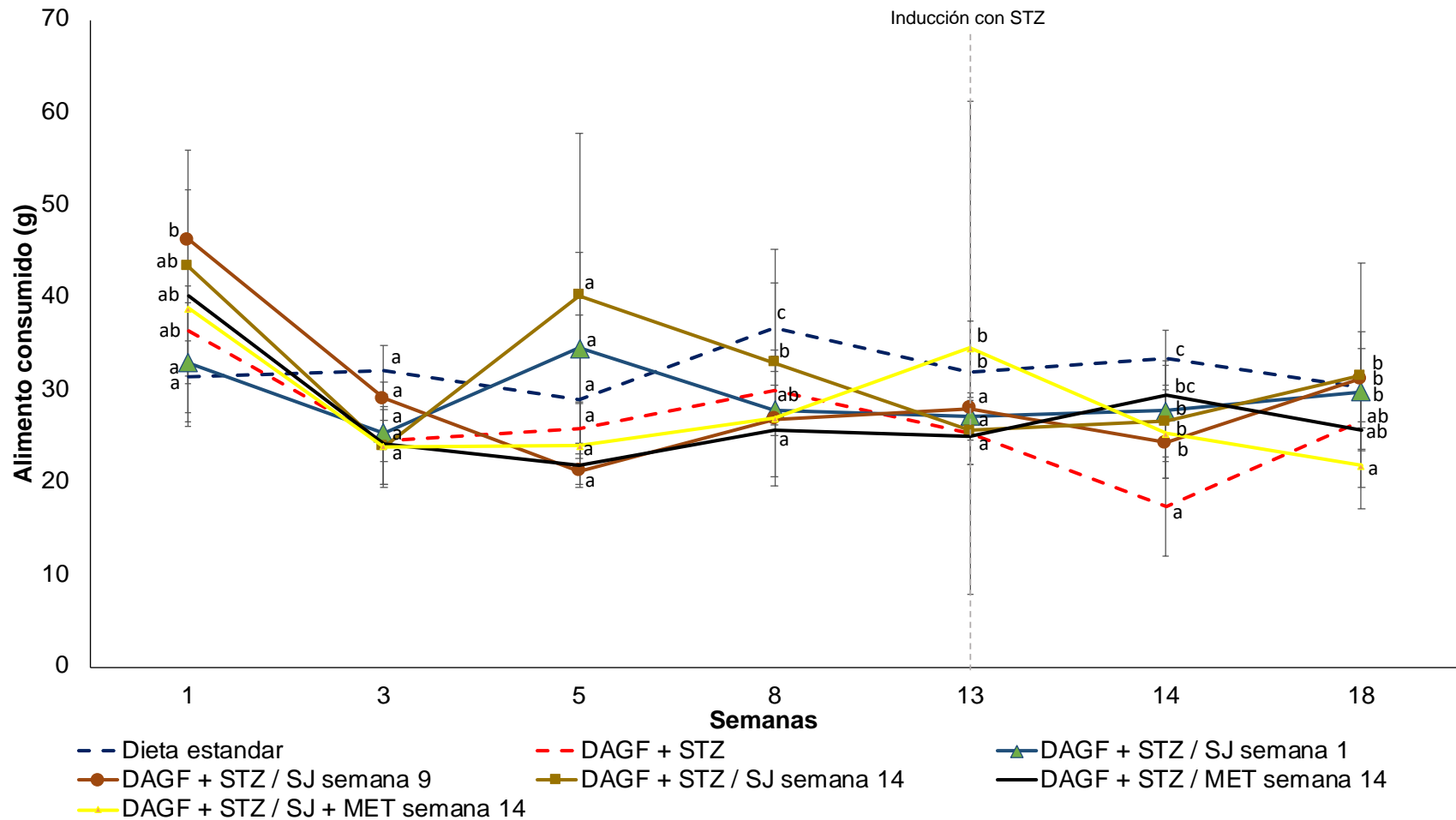


Figura 3. Monitoreo del consumo de alimento durante el desarrollo del modelo experimental. Los valores representan la media \pm desviación estándar. Acotaciones marcadas con diferente superíndice indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) utilizando la prueba de ANOVA o U de Mann-Whitney. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de metformina.

En el caso del consumo de agua, cuya ingesta no aporta energía, su regulación se da por necesidades fisiológicas. En la Figura 4 se observa que el grupo control con DM2 aumentó 1.8 veces el consumo de agua tras la inducción de la enfermedad, reflejando el síntoma de polidipsia como un mecanismo de autoregulación para eliminar los niveles excesivos de glucosa circulante a través de la orina. Con respecto a la suplementación con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica, no se observó una mejora en este síntoma, lo cual podría estar asociado con una DM2 avanzada y muy establecida, ya que el tratamiento farmacológico utilizado como control positivo, metformina, tampoco mostró un efecto.

6.2.3. Monitoreo de glucosa serica postinducción de DM2

Existen diversos modelos murinos para inducir DM2, uno de ellos consiste en la combinación de una DAGF para mimetizar la etapa temprana de la prediabetes, es decir, un estado de resistencia a la insulina, junto con una dosis única de STZ, la cual causa la destrucción de las células de los islotes pancreáticos. Mediante el uso de una dosis baja de este fármaco, los animales experimentan deficiencia de insulina, hiperglucemia, polidipsia y poliuria, síntomas característicos de la DM humana (Barrière *et al.*, 2018; Furman, 2021).

La administración de la DAGF durante ocho semanas produjo un aumento en los niveles séricos de insulina (60.12%) en comparación con el grupo control alimentado con una dieta estándar. Como consecuencia, se observó el establecimiento de un estado de resistencia a la insulina con un aumento en el índice HOMA-IR del 59.24% sin observarse alteraciones en el funcionamiento de las células beta-pancreáticas de acuerdo con el índice HOMA-Beta. La extensión de la administración de la DAGF hasta las doce semanas permitió alcanzar un ligero estado de hiperglucemia (117.67 vs 99.90 mg/dL) acompañado de una hiperinsulinemia bien establecida (7.71 vs 4.31 ng/mL) y un aumento del índice HOMA-IR del 108.31% al comparar el control positivo a la enfermedad con el control negativo a la misma.

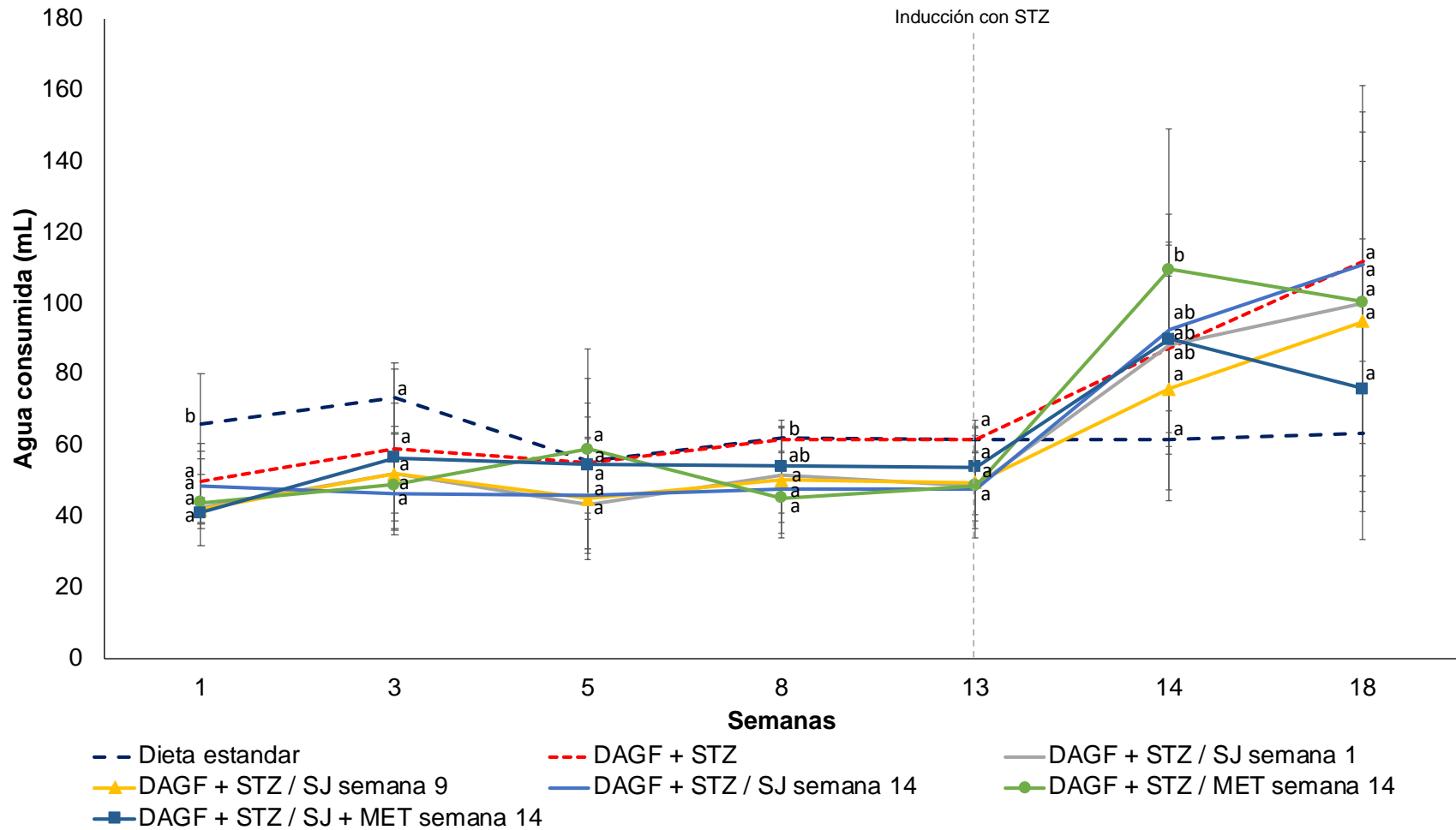


Figura 4. Monitoreo del consumo de agua durante el desarrollo del modelo experimental. Los valores representan la media \pm desviación estándar. Acotaciones marcadas con diferente superíndice indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) utilizando la prueba de ANOVA o U de Mann-Whitney. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de Estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de Metformina.

Para confirmar el desarrollo de DM2, es necesario llevar a cabo el monitoreo de glucosa en sangre a partir de la inducción con STZ, resultados que son mostrados en la Figura 5. A partir de la primera semana postinducción, se observó un aumento en los niveles sanguíneos de glucosa de 3.9 veces en el grupo control con DM2 en comparación con el grupo control sano, observando una diferencia significativa y marcada durante las 4 semanas posteriores a la inducción.

Con respecto a los grupos suplementados con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica, se observó un efecto hipoglucémico en los animales suplementados en la estrategia preventiva tanto desde la semana 1 (cuando los animales aún eran sanos) como desde la semana 9 (cuando los animales presentaban un estado de resistencia a la insulina inducida por la DAGF); sin embargo, este efecto se fue perdiendo conforme avanzaron las semanas postinducción, pasando de una reducción del 66.9% y 59.3% en la semana 1 postinducción a una reducción del 36.5% y 26.3% en la semana 4 postinducción en comparación con el grupo control con DM2, respectivamente.

Con respecto a la estrategia de tratamientos, se establecieron dos esquemas de suplementación, en una se realizó como tratamiento único y en la otra como tratamiento coadyuvante al fármaco metformina. En ambas se observó un efecto hipoglucémico similar desde la primera semana postinducción (39-58%), que se mantuvo hasta la cuarta semana postinducción (21-54%). Si bien al finalizar el estudio no se observaron diferencias significativas entre ambas estrategias de tratamiento, se observa que la suplementación como tratamiento coadyuvante logró un mejor control de los niveles sanguíneos de glucosa a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos sugieren que el subproducto de la decocción de los cálices de jamaica previene el daño oxidativo causado por la estreptozotocina y mejora la resistencia a la insulina, disminuyendo así los niveles de glucosa circulante. Cabe destacar que el efecto hipoglucémico observado con el tratamiento coadyuvante fue mejor que la administración del fármaco por sí solo. Lo anterior podría ser debido a que el mecanismo de acción de la metformina incluye una mejora en la resistencia a la insulina; pero si el modelo animal está presentando un estado de

hipoinsulinemia como consecuencia de la destrucción de las células beta-pancreáticas, su efecto se ve limitado. En humanos, este estado complicado de la DM2, comúnmente consecuencia de un pobre control glucémico requiere la combinación de tratamientos farmacológicos orales, como la metformina, con la terapia insulínica para lograr una normoglucemia.

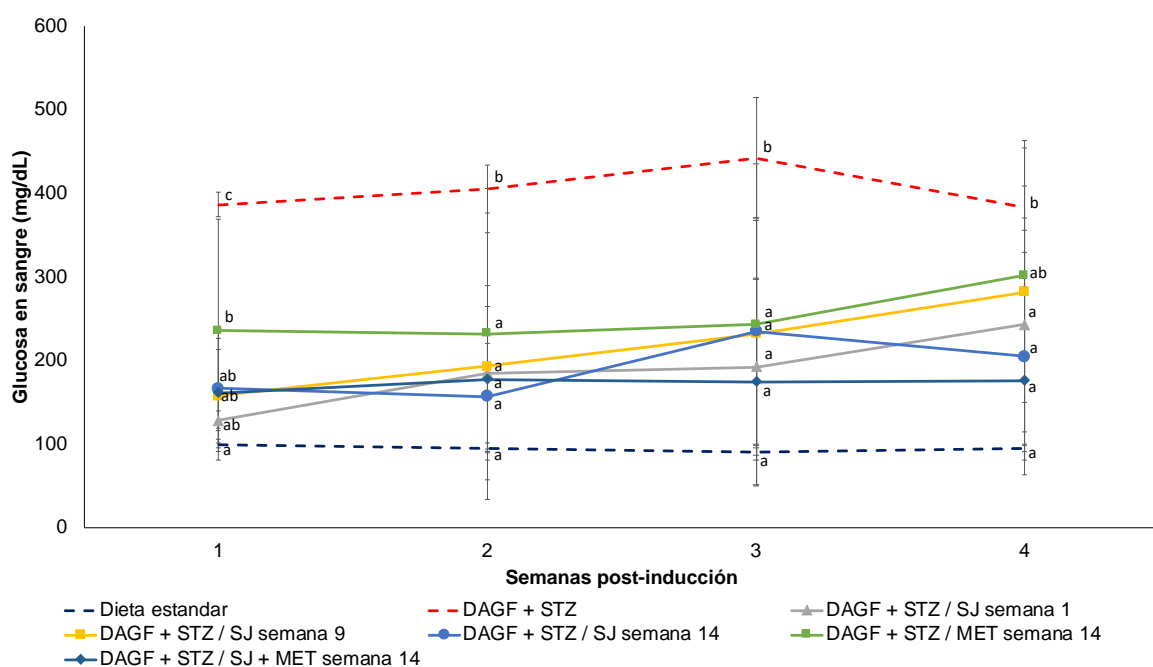


Figura 5. Monitoreo de los niveles de glucosa en suero posterior a la inducción con una dosis única de estreptozotocina. Los marcadores representan la media y las barras de error representan la desviación estándar. Acotaciones marcadas con diferente superíndice indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) utilizando la prueba de ANOVA o U de Mann-Whitney. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de Estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de Metformina.

La eficiencia de inducción de DM2 con una dosis única de estreptozotocina fue del 75%, la cual es determinada una semana después de la inducción para permitir el establecimiento de la enfermedad (Cuadro 7). Es importante destacar que la suplementación preventiva con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica disminuyó de manera importante la tasa de eficiencia de la inducción de DM2 (37.5-40%), evidenciando el efecto protector pancreático previamente propuesto, mientras que el grupo tratado con metformina no tuvo un efecto beneficioso en el control de los niveles de glucosa durante las cuatro semanas posteriores a la inducción con STZ.

Cuadro 7. Porcentaje de animales inducidos en las semanas posteriores a la inyección con estreptozotocina.

| Grupos de tratamiento | Semanas post-inducción | | | |
|---------------------------------|------------------------|--------|--------|--------|
| | Semana | Semana | Semana | Semana |
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Dieta estándar | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DAGF + STZ | 75 | 62.5 | 62.5 | 50 |
| DAGF + STZ / SJ semana 1 | 37.5 | 62.5 | 50 | 62.5 |
| DAGF + STZ / SJ semana 9 | 40 | 50 | 60 | 60 |
| DAGF + STZ / SJ semana 14 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| DAGF + STZ / MET semana 14 | 80 | 80 | 70 | 80 |
| DAGF + STZ / SJ + MET semana 14 | 60 | 60 | 60 | 50 |

Los valores representan el porcentaje (%) de cada grupo por el número total de modelos biológicos sobrevivientes en el grupo. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de Estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de Metformina.

6.2.4. Estado glicémico

La DM2 es un trastorno metabólico a largo plazo que representa un desafío de salud pública mundial, que afecta no solo a los países industrializados, sino que también aumenta drásticamente en los países en desarrollo. A lo largo de los años, se ha vuelto cada vez más evidente que el desarrollo de la DM2 se debe a dietas inadecuadas y estilos de vida poco saludables. Como ya se ha mencionado anteriormente, el uso de la DAGF en conjunto con la dosis de STZ provoca una progresión de la enfermedad empezando con un estado de resistencia a la insulina con normoglucemia que pasa a un estado de resistencia a la insulina bien establecida con hiperglucemia crónica dando lugar al desarrollo de DM2 el cual, de no ser controlado, se agrava por la reducción severa de la funcionalidad de las células beta-pancreáticas con una marcada hipoinsulinemia. Por lo que este modelo animal imita la patología de la DM2, aunque en una escala de tiempo más corta que la que se encuentra en la condición humana (Barrière *et al.*, 2018; Skovsø, 2014).

Después de las 18 semanas de experimentación, se llevó a cabo la matanza, recolectando muestras biológicas para poder determinar el impacto del subproducto

de la decocción de cálices de jamaica en la prevención y el tratamiento de las alteraciones metabólicas asociadas a la DM2. En las Figuras 6 y 7 se muestran los niveles séricos de glucosa e insulina en el tiempo final (con las muestras obtenidas en la matanza), respectivamente, los cuales fueron utilizados para estimar parámetros relacionados con el desarrollo de DM mediante el índice HOMA-IR, índice QUICKI, índice FGIR e índice HOMA-Beta (Cuadro 8).

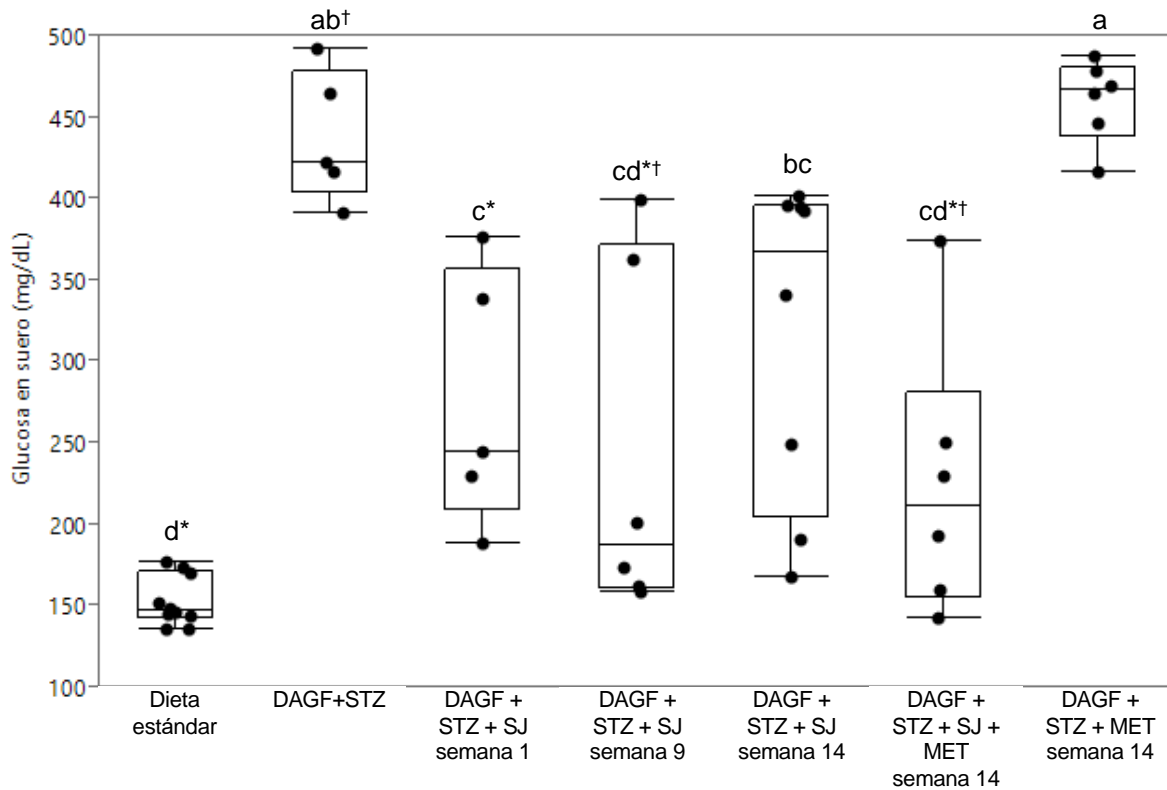


Figura 6. Niveles de glucosa en suero de ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2 y suplementadas con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica. †Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control sano por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. *Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control enfermo por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de metformina.

La suplementación con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica disminuyó desde un 33% hasta un 57% los niveles de glucosa sérica en comparación con el grupo control con DM2 al finalizar el estudio, no observando una relación entre el momento en el que se inició con la suplementación y el efecto

antidiabético. Cabe destacar que el efecto antidiabético fue mayor en las primeras semanas post-inducción, observándose un menor efecto al finalizar el estudio, así como una mayor variabilidad. Lo anterior podría estar relacionado con la rápida progresión de la enfermedad, disminuyendo la eficiencia del tratamiento. Sin embargo, es importante mencionar que el efecto antidiabético fue observado manteniendo el consumo de la DAGF, simulando a un individuo con DM2 que consume una dieta hipercalórica acompañado del consumo de suplementos dietarios.

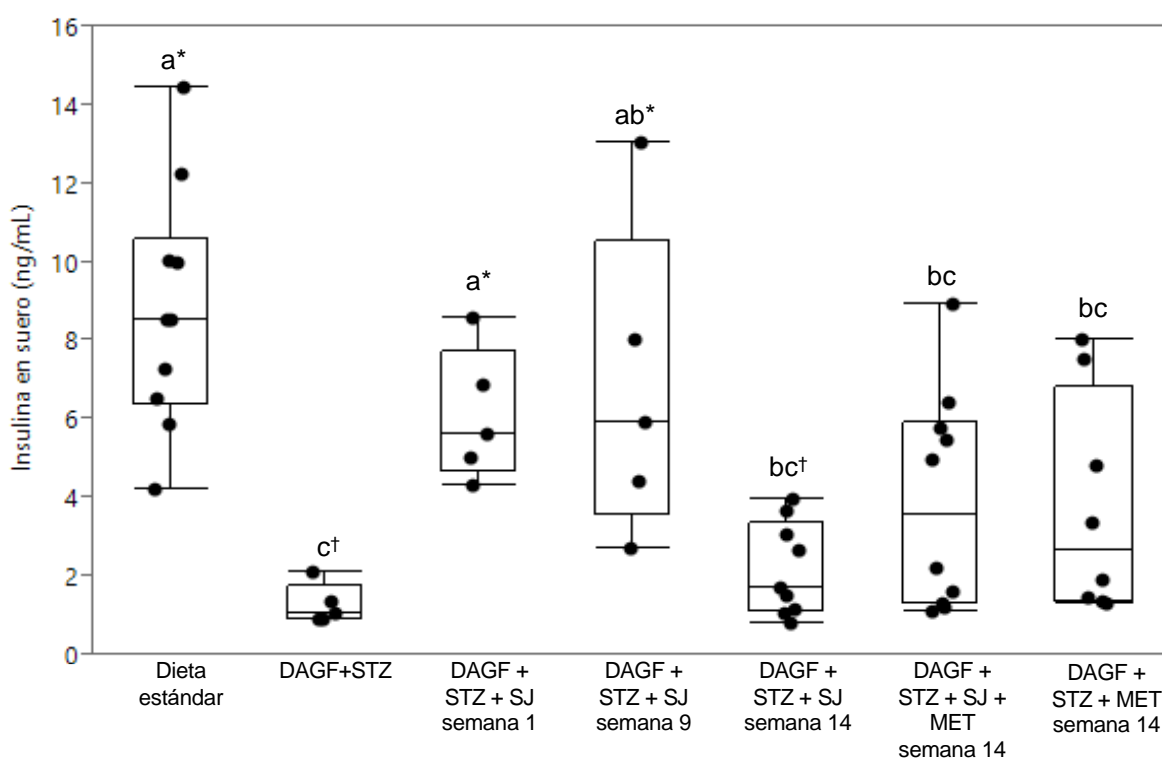


Figura 7. Niveles de insulina en suero de ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2 y suplementadas con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica. †Indica diferencia significativa ($P<0.05$) en comparación con el grupo control sano por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. *Indica diferencia significativa ($P<0.05$) en comparación con el grupo control enfermo por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de metformina.

Si bien, todos los grupos suplementados mostraron un efecto similar en el control de la glucosa, se observó una tendencia distinta en los niveles séricos de insulina. Los animales suplementados con el subproducto de la decocción de cálices de

jamaica bajo la estrategia preventiva, mostraron niveles de insulina similares al grupo control alimentado con una dieta estándar, lo que demuestra su efecto protector al daño oxidativo generado por la STZ, lo que contribuye a su efecto antihiper glucémico. Con respecto a la estrategia de tratamiento, no se observaron diferencias significativas entre estos animales y aquellos del grupo control con DM2, por lo que su efecto hipoglucémico podría estar principalmente relacionado a una mejora en el metabolismo de la glucosa. Es importante destacar que todos los animales suplementados con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica, independientemente del momento en el que se inició su administración o si fue acompañado con metformina, mostraron valores del índice FGIR similares a los animales del grupo control alimentado con una dieta estándar, lo que sugiere que un estado de DM2 con buen control glucémico.

Al finalizar el estudio, el grupo control con DM2 mostró una marcada hiperglucemia con valores 3 veces mayores a los observados en el grupo control alimentado con una dieta estándar, mientras que los niveles de insulina se encontraron 2.2 veces más bajos. Con base en los índices calculados, se observa en el Cuadro 8 que el grupo control con DM2 presentó un daño importante en las células betas pancreáticas con una disminución del índice HOMA-Beta de 30.6 veces, mientras que no se observó un estado de resistencia a la insulina. Con base a estos resultados, se puede concluir que el modelo inducido presentó características de una DM2 grave.

El aumento de 21.2 veces en el índice FGIR indica características similares a las de un sujeto con pobre control glucémico, lo que aumenta el riesgo de morbilidad y mortalidad. Múltiples estudios previos han identificado propiedades farmacológicas potenciales de la jamaica. Adeyemi & Adewole (2019) demostraron en su estudio que el tratamiento con el extracto de *H. sabdariffa* L. disminuyó significativamente los niveles de glucosa e insulina y la morfología del páncreas de ratas diabéticas tratadas en el islote de Langerhans mostro una notable mejora; hubo un aumento en la densidad celular de los islotes y una reducción en los cambios degenerativos y necróticos y la vacularización se redujo o estuvo ausente en muchos islotes.

Cuadro 8. Índices relacionados con la resistencia a la insulina en ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2 y suplementadas con el subproducto de la decocción de cálices de Jamaica NO SE ENTIENDEN LOS VALORES, ARREGLAR LOS RENGLONES

| Parámetro | Dieta estándar | DAGF + STZ | DAGF + STZ / SJ semana 1 | DAGF + STZ / SJ semana 9 | DAGF + STZ / SJ semana 14 | DAGF + STZ / MET semana 14 | DAGF + STZ / SJ + MET semana 14 |
|------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Índice HOMA-IR | 14.11 ± 1.90 ^a | 6.11 ± 2.00 ^a | 12.82 ± 3.20 ^a | 10.26 ± 2.27 ^a | 9.48 ± 1.94 ^a | 10.08 ± 2.31 ^a | 11.89 ± 1.44 ^a |
| Índice HOMA-Beta | 37.35 ± 3.92 ^{a†} | 1.22 ± 0.35 ^{c+} | 10.04 ± 3.26 ^{bc+} | 6.92 ± 3.30 ^{bc+} | 4.19 ± 1.31 ^{bc+} | 2.04 ± 0.54 ^{c+} | 19.16 ± 3.96 ^{b†} |
| Índice Quicky | 0.22 ± 0.01 ^{b*} | 0.24 ± 0.01 ^{a+} | 0.22 ± 0.01 ^{b*} | 0.22 ± 0.01 ^{ab} | 0.23 ± 0.01 ^{ab} | 0.23 ± 0.01 ^{ab} | 0.22 ± 0.01 ^{ab} |
| Índice FGIR | 0.75 ± 0.10 ^{b*} | 15.9 ± 3.82 ^{a+} | 1.92 ± 0.44 ^{b*} | 3.33 ± 2.28 ^{b*} | 3.13 ± 0.87 ^{b*} | 12.08 ± 1.56 ^{a+} | 1.29 ± 0.17 ^{b*} |

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales por la prueba de Tukey o Kruskal-Wallis. [†]Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control sano por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. *Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control enfermo por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. HOMA-IR: modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina. HOMA-beta; modelo homeostático para evaluar la actividad de las células beta. QUICKI: índice de verificación de la sensibilidad cuantitativa a la insulina. FGIR: cociente glucosa-insulina en ayunas. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de metformina.

Rodríguez-Fierros *et al.* (2021) mencionó en su estudio que el tratamiento con la infusión al 2% de *H. sabdariffa* L. en ratas con síndrome metabólico (SM) disminuyó significativamente la ganancia de peso, los niveles de TG, la insulina, el marcador de resistencia a la insulina (índice HOMA) en comparación con las ratas con SM sin tratamiento. También, Amaya-Cruz *et al.* (2019) en el estudio comparativo con el subproducto y el cáliz, demostró que el SJ mostró un efecto similar en comparación con los cálices de jamaica para mejorar la resistencia a la insulina. El efecto antidiabético observado en este estudio podría atribuirse a su alta diversidad y contenido de componentes bioactivos, tales como el ácido hibiscus que posee una actividad inhibidora de la enzima digestiva alfa-amilasa y el ácido clorogénico que mejora la captación de glucosa, lo que ayuda a disminuir sus niveles sanguíneos (Hansawasdi *et al.*, 2000; Pitschmann *et al.*, 2014).

6.2.5. Dislipidemia diabética

La DM2 está asociada a alteraciones en el metabolismo de triglicéridos y colesterol. La DM2 se asocia con un patrón característico de dislipidemia con niveles bajos de HDL y niveles elevados de colesterol, partículas LDL y triglicéridos (Bahiru *et al.*, 2021). En las Figuras 8, 9 y 10 se muestran los niveles séricos de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL, respectivamente, los cuales fueron utilizados para estimar parámetros relacionados con el riesgo cardiovascular mediante el índice Tg/HDL y el índice de riesgo de Castelli (Cuadro 9).

El grupo control con DM2 mostró un aumento significativo en los niveles séricos de triglicéridos (12 veces), colesterol total (2 veces) y colesterol HDL (1.6 veces) en comparación con el grupo control alimentado con una dieta estándar. Lo anterior se vio reflejado en un aumento en el índice Tg/HDL (53%) y en el índice de riesgo Castelli (6%), lo que indica un estado de dislipidemia diabética, aumentando el riesgo cardiovascular. Es importante mencionar que si bien se ha propuesto ampliamente al colesterol HDL como un biomarcador cardioprotector debido a que lleva a cabo el transporte reverso del colesterol, se han reportado niveles altos de HDL como consecuencia directa de niveles altos de colesterol total, lo que ha sido

asociado con un aumento en el 50% la probabilidad de muerte por enfermedad cardiovascular (Ali et al., 2012).

La suplementación con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica, así como el tratamiento farmacológico con metformina, disminuyeron los niveles séricos de triglicéridos de un 75% a un 82% en comparación con el grupo control con DM2, sin observar diferencias significativas entre ellos. Una tendencia similar fue observada con el colesterol total (37-48%), demostrando una efectiva actividad antihiperlipidémica. Con respecto a los niveles del colesterol HDL, los grupos tratados presentaron valores estadísticamente similares a ambos grupos control.

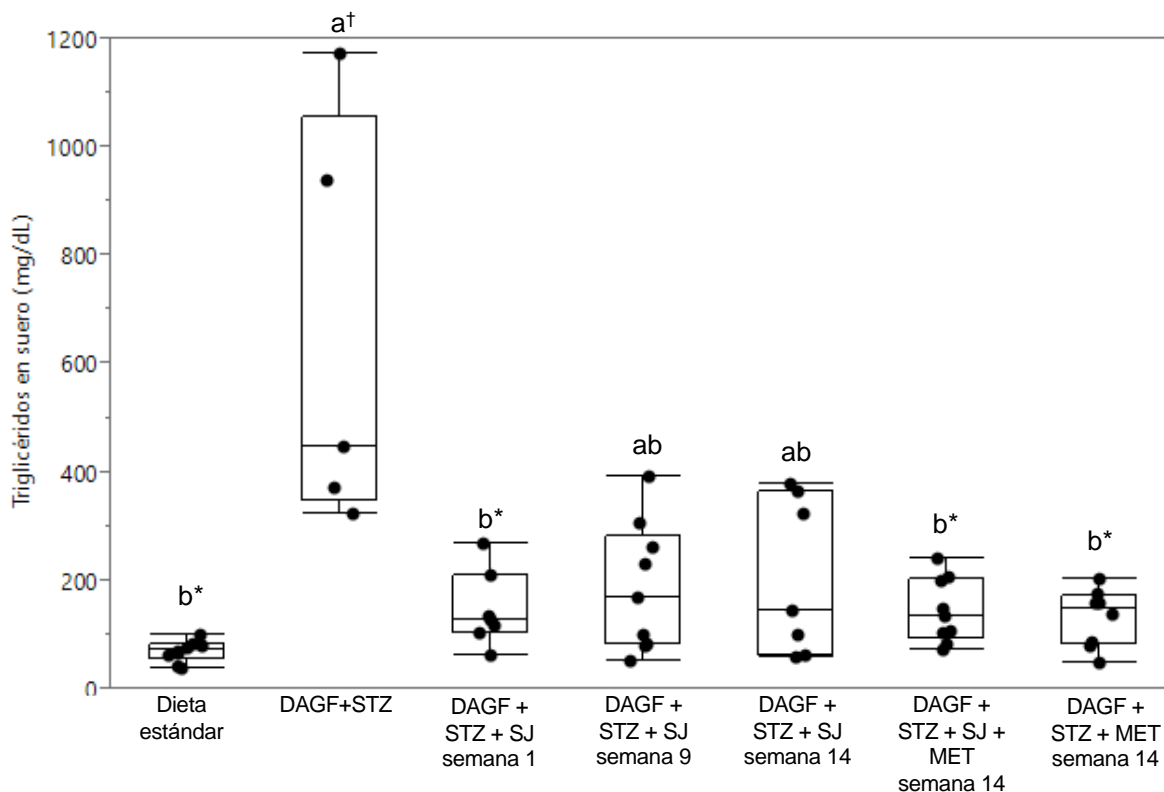


Figura 8. Niveles de triglicéridos en suero de ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2 y suplementadas con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica. Las líneas centrales representan la mediana de los datos; las líneas superiores e inferiores representan los cuartiles 25 y 75%, respectivamente; la caja representa el rango intercuartil; los bigotes representan 1.5 veces el rango intercuartil; cada punto representa un dato experimental. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos experimentales por la prueba de Tukey o Kruskal-Wallis. †Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control sano por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. *Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control enfermo por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de metformina.

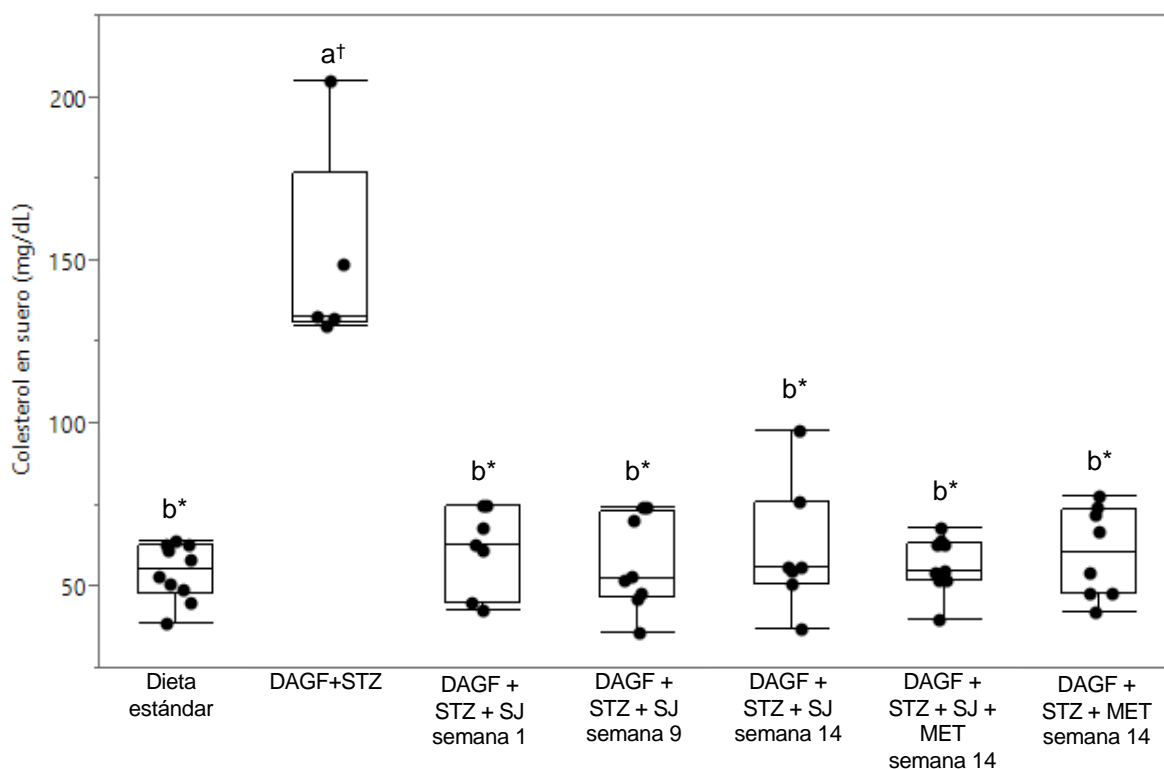


Figura 9. Niveles de colesterol total en suero de ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2 y suplementadas con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica. Las líneas centrales representan la mediana de los datos; las líneas superiores e inferiores representan los cuartiles 25 y 75%, respectivamente; la caja representa el rango intercuartil; los bigotes representan 1.5 veces el rango intercuartil; cada punto representa un dato experimental. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos experimentales por la prueba de Tukey o Kruskal-Wallis. †Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control sano por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. *Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control enfermo por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de metformina.

6.2.6. Función renal

La patogénesis del desarrollo y progresión de la enfermedad renal causada a partir de alteraciones en personas diabéticas es compleja y multifactorial con la participación de diversas vías y mediadores metabólicos (Kopel *et al.*, 2019; Pérez-Morales *et al.*, 2019; Samsu, 2021). El grupo control con DM2 mostró un aumento en la tasa de filtración glomerular (1.3 veces), una disminución de la excreción urinaria de urea y ácido úrico (2.3 y 3.1 veces, respectivamente) y un aumento en la acumulación de ácido úrico en suero (2.4 veces) en comparación con el grupo

control alimentado con una dieta estándar (Cuadro 10). Esto podría ser parcialmente consecuencia del menor consumo de proteína en los animales alimentados con la DAGF, ya que esta dieta comúnmente llamada ‘de cafetería’ se caracteriza por ser rica en grasa saturada y fructosa, pero baja en proteínas. Sin embargo, los resultados de los parámetros bioquímicos obtenidos no permiten identificar una disfunción renal asociada a la DM2.

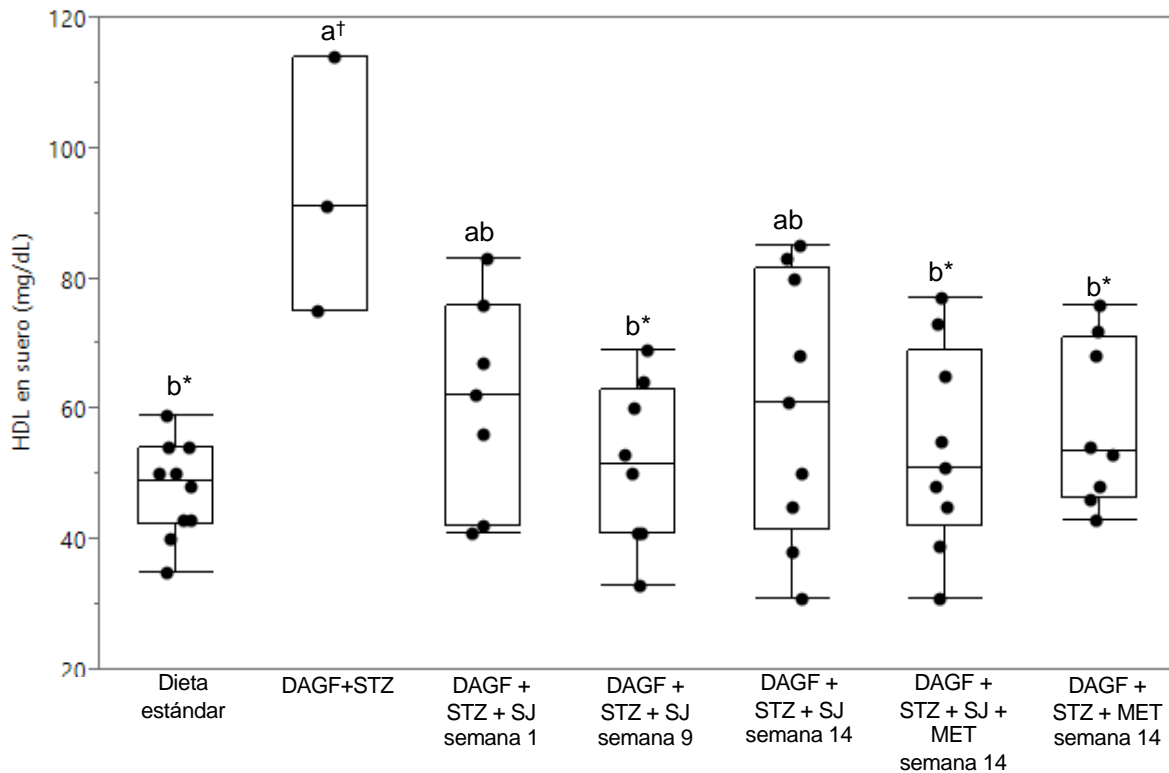


Figura 10. Niveles de colesterol HDL en suero de ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2 y suplementadas con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica. Las líneas centrales representan la mediana de los datos; las líneas superiores e inferiores representan los cuartiles 25 y 75%, respectivamente; la caja representa el rango intercuartil; los bigotes representan 1.5 veces el rango intercuartil; cada punto representa un dato experimental. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos experimentales por la prueba de Tukey o Kruskal-Wallis. †Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control sano por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. *Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control enfermo por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. HDL: Lipoproteínas de baja densidad. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de metformina.

Cuadro 9. Índices relacionados con la dislipidemia en ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2 y suplementadas con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica

| Parámetro | Dieta estándar | DAGF + STZ | DAGF + STZ / SJ semana 1 | DAGF + STZ / SJ semana 9 | DAGF + STZ / SJ semana 14 | DAGF + STZ / MET semana 14 | DAGF + STZ / SJ + MET semana 14 |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Índice Tg/HDL | 1.47 ±0.16 ^{b*} | 3.13 ±0.13 ^{a†} | 2.06 ±0.23 ^{b*} | 3.02 ±0.47 ^{ab} | 2.45 ±0.62 ^{ab} | 2.25 ±0.31 ^{b*} | 2.51 ±0.32 ^{ab} |
| Índice de Riesgo de Castelli | 1.10 ±0.02 ^{bc} | 1.17 ±0.20 ^{ab} | 1.02 ±0.03 ^{c*†} | 1.14 ±0.04 ^{bc*} | 1.19 ±0.04 ^b | 1.03 ±0.03 ^{c*†} | 1.03 ±0.04 ^{bc*} |

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales por la prueba de Tukey o Kruskal-Wallis. [†]Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control sano por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. *Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control enfermo por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. HOMA-IR: modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de streptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de metformina.

Cuadro 10. Parámetros de función renal en suero y orina de ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2 y suplementadas con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica.

| Parámetro | Dieta estándar | DAGF + STZ | DAGF + STZ / SJ semana 1 | DAGF + STZ / SJ semana 9 | DAGF + STZ / SJ semana 14 | DAGF + STZ / MET semana 14 | DAGF + STZ / SJ + MET semana 14 |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Urea en suero (mg/dL) | 43.00 ± 1.42 ^a | 33.67 ± 3.65 ^{ab} | 34.50 ± 2.03 ^{ab} | 36.38 ± 3.50 ^{ab} | 34.11 ± 3.10 ^{ab} | 34.33 ± 2.88 ^{ab} | 28.33 ± 3.76 ^{b†} |
| Creatinina en suero (mg/dL) | 0.36 ± 0.02 ^a | 0.30 ± 0.03 ^a | 0.31 ± 0.01 ^a | 0.35 ± 0.02 ^a | 0.31 ± 0.01 ^a | 0.31 ± 0.01 ^a | 0.33 ± 0.02 ^a |
| Ácido úrico en suero (mg/dL) | 0.52 ± 0.07 ^{b†} | 1.23 ± 0.25 ^{a*} | 0.79 ± 0.09 ^{ab} | 0.56 ± 0.09 ^{b†} | 0.70 ± 0.10 ^{ab} | 0.83 ± 0.14 ^{ab} | 0.69 ± 0.09 ^{b†} |
| TFG (uL/min) | 3866.25±99.40 ^{b†} | 5041.63±376.93 ^{a*} | 4158.92±210.69 ^{ab} | 4098.17±99.40 ^{ab†} | 4626.88±323.35 ^{ab} | 4327.50±156.49 ^{ab} | 4626.88±323.35 ^{ab} |
| Urea en orina (mg/dL) | 6490.00±218.58 ^{a±} | 2837.50±899.00 ^{b*} | 840.00±50.99 ^{b*} | 1033.33±218.58 ^{b*} | 885.71±70.47 ^{b*} | 950.00±50.00 ^{b*} | 2880.00±663.12 ^{b*} |
| Creatinina en orina (mg/dL) | 101.20 ± 11.99 ^a | 82.63 ± 30.16 ^{ab} | 20.40 ± 1.44 ^{b*} | 20.80 ± 1.53 ^{b*} | 24.14 ± 2.56 ^{b*} | 27.38 ± 3.42 ^{b*} | 85.67 ± 20.45 ^{ab} |
| Ácido úrico en orina (mg/dL) | 9.22 ± 1.27 ^{a±} | 2.98 ± 0.74 ^{b*} | 2.55 ± 0.66 ^{b†} | 3.08 ± 0.63 ^{b†} | 3.00 ± 0.42 ^{b†} | 1.88 ± 0.25 ^{b*} | 3.31 ± 1.09 ^{b†} |

Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos experimentales por la prueba de Tukey o Kruskal-Wallis. †Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control sano por la prueba de Dunnett o Wilcoxon. *Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control enfermo por la prueba de Dunnett o Wilcoxon. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de metformina.

Con respecto a la suplementación con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica, no se observó un efecto benéfico ni detrimental en la función renal, observándose únicamente una disminución del 33% al 55% en la acumulación de ácido úrico en suero, el cual está asociado al metabolismo de la fructosa. Sin embargo, el análisis integral de todos los resultados de los parámetros bioquímicos no es incluyente. Cabe destacar que se ha demostrado previamente que la suplementación con extractos acuosos y etanólicos de cálices de jamaica muestran un efecto reno protector, asociado con su actividad antioxidante y antiapoptótica en tejido renal, favoreciendo la respuesta vascular renal y la filtración glomerular (Rodríguez-Fierros *et al.*, 2021).

6.2.7. Capacidad antioxidante plasmática

El estrés oxidativo es una condición que ocasiona daño a los tejidos debido a un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, y es consecuencia de diferentes vías involucradas en la patogénesis de la DM2, incluida la hiperglucemia crónica. El estrés oxidativo inducido aumenta los niveles de proteínas proinflamatorias que causan inflamación local y sistémica, las cuales promueven un estado de resistencia a la insulina, contribuyendo al estado hiperglucémico crónico (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014; Kopel *et al.*, 2019).

Debido a la implicación metabólica del estrés oxidativo en el desarrollo y la progresión de la DM2, se evaluó la actividad antioxidante en el plasma mediante los ensayos de ABTS (Figura 11) y FRAP (Figura 12) como una estrategia para estimar el estado antioxidante global. Los resultados obtenidos indican que el estado antioxidante del grupo control con DM2 fue similar al observado en el grupo control alimentado con una dieta estándar, lo cual es un resultado no esperado debido al estado avanzado de DM2 establecido en el modelo animal.

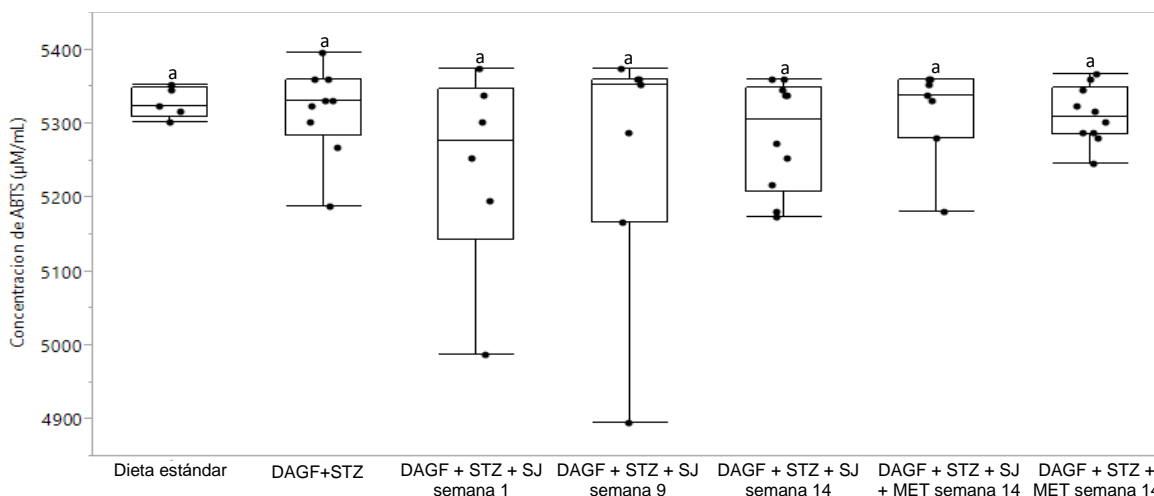


Figura 11. Capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS en plasma en ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2 y suplementadas con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica. †Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control sano por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. *Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el grupo control enfermo por la prueba de Dunnet o Wilcoxon. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de metformina.

La suplementación con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica aumentó en un 64% la capacidad antioxidante plasmática, evaluada mediante el ensayo de FRAP (Figura 12), cuando fue administrado bajo la estrategia preventiva cuando las ratas estaban sanas o con resistencia a la insulina inducida por una DAGF. Con respecto al enfoque terapéutico, no se observaron diferencias significativas cuando se realizó la administración del subproducto en las ratas con DM2, pero se observó un aumento del 47.0% cuando fue suplementado como un tratamiento coadyuvante a la metformina, siendo que la administración de este fármaco mejoró en un 56.7% la capacidad antioxidante. Dichos resultados podrían estar relacionado con los grupos preventivos que recibieron la suplementación con esta fuente de compuestos antioxidantes durante un periodo más prolongado y previo a la inducción de la STZ, componente citotóxico que causa estrés oxidativo. Con respecto al ensayo de ABTS (Figura 11) no se observaron cambios en el estado antioxidante con ambas estrategias de suplementación.

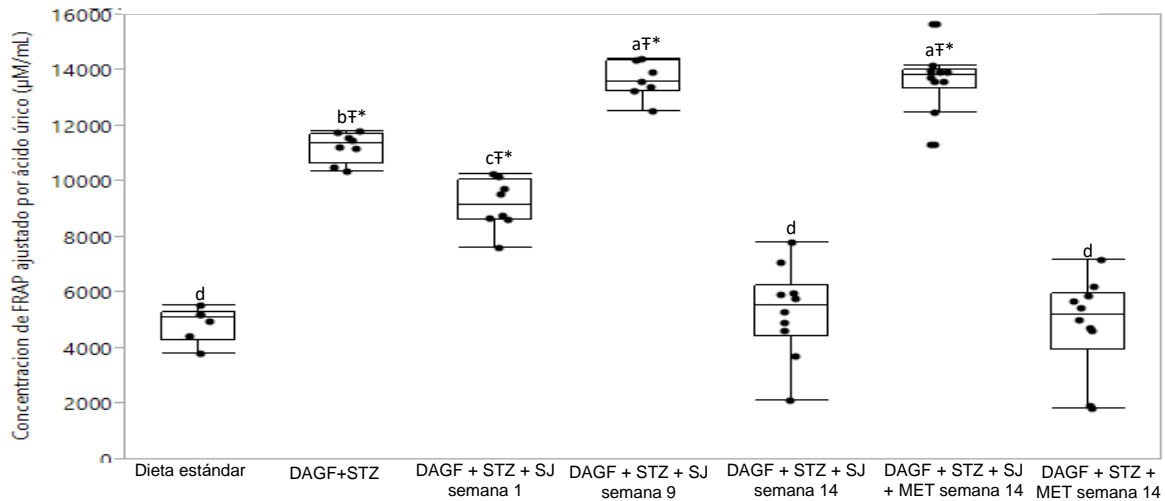


Figura 12. Capacidad antioxidante mediante el ensayo FRAP en plasma en ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2 y suplementadas con el subproducto de la decocción de cálices de jamaica. †Indica diferencia significativa ($P<0.05$) en comparación con el grupo control sano por la prueba de Dunnett o Wilcoxon. *Indica diferencia significativa ($P<0.05$) en comparación con el grupo control enfermo por la prueba de Dunnett o Wilcoxon. DAGF: Dieta alta en grasa y fructosa. STZ: Dosis de estreptozotocina. SJ: Subproducto de jamaica. MET: Dosis de metformina.

Diversos autores han demostrado que los extractos de los cálices de jamaica reducen la generación de ROS. Lo anterior ha sido asociado a su diversa composición de componentes antioxidantes, destacando antocianinas derivadas de delphinidina, ácidos orgánicos como el hidroxicítrico y el hibiscus, ácidos fenólicos y otros flavonoides (Herranz-López *et al.*, 2020), componentes identificados en el subproducto obtenido tras la decocción de cálices de jamaica en este estudio.

7. CONCLUSIONES

El subproducto generado durante el proceso de decocción de cálices de jamaica es una fuente importante de fibra dietaria con abundante cantidad de fibra dietaria insoluble, así como también, ácidos orgánicos y polifenoles libres y ligados a la matriz de la misma. Debido a esta riqueza de componentes bioactivos, el subproducto de jamaica ayuda en la modulación de las alteraciones en las concentraciones de glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos y colesterol HDL en suero de ratas *Wistar* macho asociadas al desarrollo y la progresión de la diabetes mellitus tipo 2. Si bien, no se observó efectos modulantes en los marcadores metabólicos del daño renal y en la capacidad antioxidante en plasma, se abre la puerta a futuras investigaciones que generen más hallazgos en la aplicación del subproducto de jamaica como tratamiento o prevención de más alteraciones. El aprovechamiento de este residuo, generado en altas cantidades en casas e industrias mexicanas, representa una alternativa sostenible para el desarrollo de suplementos alimentarios con actividad terapéutica y de prevención de la diabetes mellitus tipo 2.

8. REFERENCIAS

- (AOAC), International, A. of O. A. C. (2012). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International. *Recovery Studies*, 17th Edn. Byrd Richmond, VA, 3000.
- ADA. (2022a). Standards of Medical Care in Diabetes. In *Diabetes Care* (Vol. 45, Issue SUPPL.1, p. S67). American Diabetes Association. <https://doi.org/10.2337/dc13-S067>
- ADA. (2022b). Facilitating Behavior Change and Well-being to Improve Health Outcomes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement_1), S60–S82. <https://doi.org/10.2337/dc22-S005>
- Ahmad, E., Sargeant, J. A., Yates, T., Webb, D. R., & Davies, M. J. (2022). Type 2 Diabetes and Impaired Physical Function: A Growing Problem. *Diabetology*, 3(1), 30–45. <https://doi.org/10.3390/diabetology3010003>
- ALAD. (2019). Tratamiento no farmacológico/Tratamiento farmacológico. In *Guías ALAD sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en Evidencia Edición 2019* (2019th ed., pp. 36-45 / 50-64).
- Ali, K. M., Wonnerth, A., Huber, K., & Wojta, J. (2012). Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL cholesterol - current therapies and future opportunities. *British Journal of Pharmacology*, 167(6), 1177–1194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02081.x>
- Amaya-Cruz, D., Pérez-Ramírez, I. F., Pérez-Jiménez, J., Nava, G. M., & Reynoso-Camacho, R. (2019). Comparison of the bioactive potential of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyx and its by-product: Phenolic characterization by UPLC-QTOF MSE and their anti-obesity effect in vivo. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 126. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.108589>
- Aroda, V. R., Arulandu, J. R., & Cannon, A. J. (2018). Insulin/Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist Combination Therapy for the Treatment of Type 2 Diabetes: Are Two Agents Better Than One? *Clinical Diabetes*, 36(2), 138–147. <https://doi.org/10.2337/cd17-0065>
- Aroda, V. R., Edelstein, S. L., Goldberg, R. B., Knowler, W. C., Marcovina, S. M., Orchard, T. J., Bray, G. A., Schade, D. S., Temprosa, M. G., White, N. H., & Crandall, J. P. (2016). Long-term Metformin Use and Vitamin B12 Deficiency in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(4), 1754–1761. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3754>
- Bahiru, E., Hsiao, R., Phillipson, D., & Watson, K. E. (2021). Mechanisms and Treatment of Dyslipidemia in Diabetes. *Current Cardiology Reports*, 23(4), 26. <https://doi.org/10.1007/s11886-021-01455-w>

- Barrière, D. A., Noll, C., Roussy, G., Lizotte, F., Kessai, A., Kirby, K., Belleville, K., Beaudet, N., Longpré, J. M., Carpentier, A. C., Geraldès, P., & Sarret, P. (2018). Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-18896-5>
- Barrio-Castellanos, R. (2004). Diabetes mellitus. *AEPap. Ed. Curso de Actualización Pediatría, Exlibris E*, 79–88.
- Benali, T., Bakrim, S., Ghchime, R., Benkhaira, N., El Omari, N., Balahbib, A., Taha, D., Zengin, G., Hasan, M. M., Bibi, S., & Bouyahya, A. (2022). Pharmacological insights into the multifaceted biological properties of quinic acid. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1–30. <https://doi.org/10.1080/02648725.2022.2122303>
- Bornfeldt, K. E. (2016). Does Elevated Glucose Promote Atherosclerosis? Pros and Cons. *Circulation Research*, 119(2), 190–193. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308873>
- Braunwald, E. (2019). Diabetes, heart failure, and renal dysfunction: The vicious circles. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 62(4), 298–302. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2019.07.003>
- Bule, M., Albelbeisi, A. H., Nikfar, S., Amini, M., & Abdollahi, M. (2020). The antidiabetic and antilipidemic effects of Hibiscus sabdariffa: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Food Research International*, 130, 108980. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108980>
- Buse, J. B., Wexler, D. J., Tsapas, A., Rossing, P., Mingrone, G., Mathieu, C., D'Alessio, D. A., & Davies, M. J. (2020). 2019 update to: Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia*, 63(2), 221–228. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-05039-w>
- Cole, J. B., & Florez, J. C. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature Reviews Nephrology*, 16(7), 377–390. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>
- Crowley, M. J., McGuire, D. K., Alexopoulos, A.-S., Jensen, T. J., Rasmussen, S., Saevereid, H. A., Verma, S., & Buse, J. B. (2020). Effects of Liraglutide on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes Patients With and Without Baseline Metformin Use: Post Hoc Analyses of the LEADER Trial. *Diabetes Care*, 43(9), e108–e110. <https://doi.org/10.2337/dc20-0437>
- Cuevas M., A., & Alonso K, R. (2016). DISLIPIDEMIA DIABÉTICA. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(2), 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2016.04.004>

- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L. - a phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, *165*, 424–443. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.05.002>
- Davies, M. J., Aroda, V. R., Collins, B. S., Gabbay, R. A., Green, J., Maruthur, N. M., Rosas, S. E., Del Prato, S., Mathieu, C., Mingrone, G., Rossing, P., Tankova, T., Tsapas, A., & Buse, J. B. (2022). Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2022. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia*, *65*(12), 1925–1966. <https://doi.org/10.1007/s00125-022-05787-2>
- Davies, M. J., D'Alessio, D. A., Fradkin, J., Kernan, W. N., Mathieu, C., Mingrone, G., Rossing, P., Tsapas, A., Wexler, D. J., & Buse, J. B. (2018). Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia*, *61*(12), 2461–2498. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4729-5>
- Demir, S., Nawroth, P. P., Herzig, S., & Ekim Üstünel, B. (2021). Emerging Targets in Type 2 Diabetes and Diabetic Complications. *Advanced Science*, *8*(18). <https://doi.org/10.1002/advs.202100275>
- Escobar-Ortiz, A., Castaño-Tostado, E., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., & Reynoso-Camacho, R. (2021). Anthocyanins extraction from *Hibiscus sabdariffa* and identification of phenolic compounds associated with their stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101*(1), 110–119. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10620>
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1721*(1–3), 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.11.001>
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(7), 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2011.01.008>
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3597–3604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- Furman, B. L. (2021). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols*, *1*(4). <https://doi.org/10.1002/cpz1.78>
- García-Torres, D., Sanchez-Bouza, M. de J., Sanchez-Sanchez, P., Sanchez-Frenes, P., & Naranjo-Hernandez, L. (2020). Molecular Bases of Diabetes Mellitus and its Relationship with non-enzymatic Glycosylation and Oxidative Stress. *Finlay*, *10*(3), 3–10.

<https://revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/764/1877>

- Gerstein, H., & Bosch, J. (2012). Basal Insulin and Cardiovascular and Other Outcomes in Dysglycemia. *New England Journal of Medicine*, 367(4), 319–328. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203858>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F1.2.1-F1.2.13. https://www.academia.edu/6873755/Characterization_and_Measurement_of_Anthocyanins_by_UV_Visible_Spectroscopy
- Guillén-González, M. (2002). Diabetes mellitus: como se manifiesta, como evoluciona y como se complica. *Ciencia*, 54–62. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.amc.edu.mx/revista-ciencia/images/revista/53_3/diabetes_mellitus.pdf
- Hansawasdi, C., Kawabata, J., & Kasai, T. (2000). α -Amylase Inhibitors from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) Tea. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(5), 1041–1043. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1041>
- Harreiter, J., & Roden, M. (2019). Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2019). *Wiener Klinische Wochenschrift*, 131(S1), 6–15. <https://doi.org/10.1007/s00508-019-1450-4>
- Hassan, F. A., Ismail, A., Hamid, A. A., Azlan, A., & Al-Sheraji, S. H. (2011). Characterisation of fibre-rich powder and antioxidant capacity of *Mangifera pajang* K. fruit peels. *Food Chemistry*, 126(1), 283–288. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.11.019>
- Herranz-López, M., Olivares-Vicente, M., Rodríguez Gallego, E., Encinar, J. A., Pérez-Sánchez, A., Ruiz-Torres, V., Joven, J., Roche, E., & Micol, V. (2020). Quercetin metabolites from *Hibiscus sabdariffa* contribute to alleviate glucolipotoxicity-induced metabolic stress in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 144, 111606. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111606>
- INEGI. (2021). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA DIABETES (14 DE NOVIEMBRE) DATOS NACIONALES*. <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-diabetes-2020>
- Izquierdo-Vega, J., Arteaga-Badillo, D., Sánchez-Gutiérrez, M., Morales-González, J., Vargas-Mendoza, N., Gómez-Aldapa, C., Castro-Rosas, J., Delgado-Olivares, L., Madrigal-Bujaidar, E., & Madrigal-Santillán, E. (2020). Organic Acids from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)—A Brief Review of Its Pharmacological Effects. *Biomedicines*, 8(5), 100. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050100>
- Kanaley, J. A., Colberg, S. R., Corcoran, M. H., Malin, S. K., Rodriguez, N. R., Crespo, C. J., Kirwan, J. P., & Zierath, J. R. (2022). Exercise/Physical Activity

in Individuals with Type 2 Diabetes: A Consensus Statement from the American College of Sports Medicine. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 54(2), 353–368. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002800>

Katakami, N. (2018). Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 25(1), 27–39. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17014>

Kopel, J., Pena-Hernandez, C., & Nugent, K. (2019). Evolving spectrum of diabetic nephropathy. *World Journal of Diabetes*, 10(5), 269–279. <https://doi.org/10.4239/wjd.v10.i5.269>

Kurata, R., Adachi, M., Yamakawa, O., & Yoshimoto, M. (2007). Growth Suppression of Human Cancer Cells by Polyphenolics from Sweetpotato (Ipomoea batatas L.) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1), 185–190. <https://doi.org/10.1021/jf0620259>

Lalau, J.-D., Kajbaf, F., Bennis, Y., Hurtel-Lemaire, A.-S., Belpaire, F., & De Broe, M. E. (2018). Metformin Treatment in Patients With Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease Stages 3A, 3B, or 4. *Diabetes Care*, 41(3), 547–553. <https://doi.org/10.2337/dc17-2231>

Lee, H. J., Wang, S. C., Lee, S. F., Wang, C. J., Lee, C. H., & Lee, W. C. (2011). Aqueous Extract from Hibiscus sabdariffa Linnaeus Ameliorate Diabetic Nephropathy via Regulating Oxidative Status and Akt/Bad/14-3-3 γ in an Experimental Animal Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2011. <https://doi.org/10.1093/ECAM/NEP181>

Lee, S.-H., Park, S.-Y., & Choi, C. S. (2022). Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes & Metabolism Journal*, 46(1), 15–37. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280>

Leh, H. E., & Lee, L. K. (2022). Lycopene: A Potent Antioxidant for the Amelioration of Type II Diabetes Mellitus. *Molecules*, 27(7), 2335. <https://doi.org/10.3390/molecules27072335>

Li, Y. J., Chen, X., Kwan, T. K., Loh, Y. W., Singer, J., Liu, Y., Ma, J., Tan, J., Macia, L., Mackay, C. R., Chadban, S. J., & Wu, H. (2020). Dietary Fiber Protects against Diabetic Nephropathy through Short-Chain Fatty Acid-Mediated Activation of G Protein-Coupled Receptors GPR43 and GPR109A. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 31(6), 1267–1281. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019101029>

Lingvay, I., Sumithran, P., Cohen, R. V., & le Roux, C. W. (2022). Obesity management as a primary treatment goal for type 2 diabetes: time to reframe the conversation. *The Lancet*, 399(10322), 394–405. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01919-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01919-X)

Loarca-Piña, G., Mendoza, S., Ramos-Gómez, M., & Reynoso, R. (2010).

- Antioxidant, Antimutagenic, and Antidiabetic Activities of Edible Leaves from *Cnidioscolus chayamansa* Mc. Vaugh. *Journal of Food Science*, 75(2), H68–H72. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01505.x>
- Loarca-Piña, G., Neri, M., Figueroa, J. de D., Castaño-Tostado, E., Ramos-Gómez, M., Reynoso, R., & Mendoza, S. (2019). Chemical characterization, antioxidant and antimutagenic evaluations of pigmented corn. *Journal of Food Science and Technology*, 56(7), 3177–3184. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03671-3>
- Lovic, D., Piperidou, A., Zografou, I., Grassos, H., Pittaras, A., & Manolis, A. (2020). The Growing Epidemic of Diabetes Mellitus. *Current Vascular Pharmacology*, 18(2), 104–109. <https://doi.org/10.2174/1570161117666190405165911>
- Lutz, M., Fuentes, E., Ávila, F., Alarcón, M., & Palomo, I. (2019). Roles of Phenolic Compounds in the Reduction of Risk Factors of Cardiovascular Diseases. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(2). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24020366>
- Maiorino, M. I., Chiodini, P., Bellastella, G., Scappaticcio, L., Longo, M., Esposito, K., & Giugliano, D. (2018). Free and fixed-ratio combinations of basal insulin and GLP-1 receptor agonists versus basal insulin intensification in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20(9), 2309–2313. <https://doi.org/10.1111/dom.13343>
- Marso, S. P., McGuire, D. K., Zinman, B., Poulter, N. R., Emerson, S. S., Pieber, T. R., Pratley, R. E., Haahr, P.-M., Lange, M., Brown-Frandsen, K., Moses, A., Skibsted, S., Kvist, K., & Buse, J. B. (2017). Efficacy and Safety of Degludec versus Glargine in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 377(8), 723–732. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615692>
- Masson, W., Lavallo-Cobo, A., Lobo, M., Masson, G., & Molinero, G. (2021). Novel antidiabetic drugs and risk of cardiovascular events in patients without baseline metformin use: a meta-analysis. *European Journal of Preventive Cardiology*, 28(1), 69–75. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwaa074>
- Matthews, D., Del Prato, S., Mohan, V., Mathieu, C., Vencio, S., Chan, J. C. N., Stumvoll, M., & Paldanius, P. M. (2020). Insights from VERIFY: Early Combination Therapy Provides Better Glycaemic Durability Than a Stepwise Approach in Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Diabetes Therapy*, 11(11), 2465–2476. <https://doi.org/10.1007/s13300-020-00926-7>
- Mazza, K. E. L., Santiago, M. C. P. A., do Nascimento, L. S. M., Godoy, R. L. O., Souza, E. F., Brígida, A. I. S., Borguini, R. G., & Tonon, R. V. (2019). Syrah grape skin valorisation using ultrasound-assisted extraction: Phenolic compounds recovery, antioxidant capacity and phenolic profile. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(3), 641–650. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13883>

- Morales-Luna, E., Pérez-Ramírez, I. F., Salgado, L. M., Castaño-Tostado, E., Gómez-Aldapa, C. A., & Reynoso-Camacho, R. (2019). The main beneficial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) on obesity is not only related to its anthocyanin content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(2), 596–605. <https://doi.org/10.1002/JSFA.9220>
- Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS •+ Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(15), 4669–4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>
- O'Neill, H. M., Maarbjerg, S. J., Crane, J. D., Jeppesen, J., Jørgensen, S. B., Schertzer, J. D., Shyroka, O., Kiens, B., van Denderen, B. J., Tarnopolsky, M. A., Kemp, B. E., Richter, E. A., & Steinberg, G. R. (2011). AMP-activated protein kinase (AMPK) β 1 β 2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(38), 16092–16097. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105062108>
- Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., & Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*(6), 935–942. <https://doi.org/10.1002/JSFA.2019>
- Pan, B., Ge, L., Xun, Y., Chen, Y., Gao, C., Han, X., Zuo, L., Shan, H., Yang, K., Ding, G., & Tian, J. (2018). Exercise training modalities in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and network meta-analysis. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, *15*(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s12966-018-0703-3>
- Pérez-Morales, R. E., del Pino, M. D., Valdivielso, J. M., Ortiz, A., Mora-Fernández, C., & Navarro-González, J. F. (2019). Inflammation in Diabetic Kidney Disease. *Nephron*, *143*(1), 12–16. <https://doi.org/10.1159/000493278>
- Pérez-Torres, I., Castrejón-Téllez, V., Soto, M. E., Rubio-Ruiz, M. E., Manzano-Pech, L., & Guarner-Lans, V. (2021). Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1–26. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041786>
- Perseghin, G., Ghosh, S., Gerow, K., & Shulman, G. I. (1997). Metabolic Defects in Lean Nondiabetic Offspring of NIDDM Parents: A Cross-Sectional Study. *Diabetes*, *46*(6), 1001–1009. <https://doi.org/10.2337/diab.46.6.1001>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, *98*(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00063.2017>
- Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U. A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., & Schleicher, E. (2019). Definition,

Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 127(S 01), S1–S7. <https://doi.org/10.1055/a-1018-9078>

Pitschmann, A., Zehl, M., Atanasov, A. G., Dirsch, V. M., Heiss, E., & Glasl, S. (2014). Walnut leaf extract inhibits PTP1B and enhances glucose-uptake in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(3), 599–602. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.02.017>

Quatrin, A., Pauletto, R., Maurer, L. H., Minuzzi, N., Nichelle, S. M., Carvalho, J. F. C., Maróstica, M. R., Rodrigues, E., Bochi, V. C., & Emanuelli, T. (2019). Characterization and quantification of tannins, flavonols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: A comparison between *Myrciaria trunciflora* and *M. jaboticaba*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 78, 59–74. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2019.01.018>

Rashmi, H. B., & Negi, P. S. (2020). Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*, 136, 109298. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109298>

Reynoso-Camacho, R., Sotelo-González, A. M., Patiño-Ortiz, P., Rocha-Guzmán, N. E., & Pérez-Ramírez, I. F. (2021). Berry by-products obtained from a decoction process are a rich source of low- and high-molecular weight extractable and non-extractable polyphenols. *Food and Bioprocess Processing*, 127, 371–387. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2021.03.014>

Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 575–586. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.03.023>

Samsu, N. (2021). Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *BioMed Research International*, 2021, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2021/1497449>

Sáyago-Ayerdi, S. G., Velázquez-López, C., Montalvo-González, E., & Goñi, I. (2014). By-product from decoction process of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces as a source of polyphenols and dietary fiber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 898–904. <https://doi.org/10.1002/JSFA.6333>

Secretaria de Salud. (2022). *Diabetes mellitus*. En México, 12.4 Millones de Personas Viven Con Diabetes. <https://www.gob.mx/salud/prensa/547-en-mexico-12-4-millones-de-personas-viven-con-diabetes?idiom=es>

Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., Haddad, M. A., & Al-Hiary, M. (2019). Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1397–1400. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0133>

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Skovsø, S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation*, 5(4), 349–358. <https://doi.org/10.1111/jdi.12235>
- Smyth, A., Jenkins, M., Dunham, M., Kutzer, Y., Taheri, S., & Whitehead, L. (2020). Systematic review of clinical practice guidelines to identify recommendations for sleep in type 2 diabetes mellitus management. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 170, 108532. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108532>
- Sunil, B., & Ashraf, A. P. (2020). Dyslipidemia in Pediatric Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reports*, 20(10), 53. <https://doi.org/10.1007/s11892-020-01336-6>
- Taylor, S. I., Yazdi, Z. S., & Beitelshees, A. L. (2021). Pharmacological treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 131(2). <https://doi.org/10.1172/JCI142243>
- Umanath, K., & Lewis, J. B. (2018). Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 71(6), 884–895. <https://doi.org/10.1053/J.AJKD.2017.10.026>
- Vieira, R., Souto, S. B., Sánchez-López, E., Machado, A. L., Severino, P., Jose, S., Santini, A., Silva, A. M., Fortuna, A., García, M. L., & Souto, E. B. (2019). Sugar-Lowering Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome-Strategies for In Vivo Administration: Part-II. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/JCM8091332>
- Wang, W., & Lo, A. (2018). Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1816. <https://doi.org/10.3390/ijms19061816>
- Weickert, M. O., & Pfeiffer, A. F. (2018). Impact of Dietary Fiber Consumption on Insulin Resistance and the Prevention of Type 2 Diabetes. *The Journal of Nutrition*, 148(1), 7–12. <https://doi.org/10.1093/jn/nxx008>
- Wojtaszewski, J. F. P., Higaki, Y., Hirshman, M. F., Michael, M. D., Dufresne, S. D., Kahn, C. R., & Goodyear, L. J. (1999). Exercise modulates postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice. *Journal of Clinical Investigation*, 104(9), 1257–1264. <https://doi.org/10.1172/JCI7961>
- Zhu, Z., Jiang, W., & Thompson, H. J. (2012). Edible dry bean consumption (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates cardiovascular risk factors and diet-induced

obesity in rats and mice. *British Journal of Nutrition*, 108(S1), S66–S73.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512000839>

Zielinski, A. A. F., Haminiuk, C. W. I., & Beta, T. (2019). Evaluation of the Phenolics and in vitro Antioxidant Activity of Different Botanical Herbals Used for Tea Infusions in Brazil. *Current Nutrition & Food Science*, 15(4), 345–352.
<https://doi.org/10.2174/1573401313666171020114727>

Zuraikat, F. M., Makarem, N., Redline, S., Aggarwal, B., Jelic, S., & St-Onge, M.-P. (2020). Sleep Regularity and Cardiometabolic Health: Is Variability in Sleep Patterns a Risk Factor for Excess Adiposity and Glycemic Dysregulation? *Current Diabetes Reports*, 20(8), 38. <https://doi.org/10.1007/s11892-020-01324-w>

9. ANEXOS

9.1. Dictamen de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Querétaro, Qro, noviembre 23, 2022.



DRA. MIRIAM ARACELY ANAYA LOYOLA
DRA. IZA FERNANDA RAMÍREZ PÉREZ
PROFESOR INVESTIGADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Colaboradores:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Dra. Olga Patricia García Obregón
Dra. Iris del Carmen Nieves Anaya
Dra. Vianney Cervantes Curiel
Dr. David Gustavo García Gutiérrez

Tesista:

Jesús Eduardo Serna Tenorio

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto del cual usted es responsable:

| Título | Resolución |
|---|-----------------|
| "Efecto del subproducto de la decocción de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) sobre la prevención y el tratamiento de la disfunción renal en un modelo <i>in vivo</i> de diabetes mellitus tipo 2." 45FCN2022 Derivado del macroproyecto: "Evaluación de la suplementación con subproductos agroindustriales de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. y <i>Beta vulgaris</i> L. sobre parámetros metabólicos, renales, oxidativos y de inflamación de ratas Wistar con diabetes mellitus tipo 2 inducida" (53FCN2022) | APROBADO |

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

Atentamente,

MSIA. Elba Orozco Estrada
Presidenta del Comité de Bioética
Facultad de Ciencias Naturales



SOMOS UAQ
SERVE CONSERVA TRANSFORMA

Dirección: Av. de las Ciencias s/n, Jalisco, Delegación Santa Rosa Jáuregui, C.P. 76230, Querétaro, Qro.
Telo: 442 192-1200; Directo: 5301; Investigación y posgrado: 5371; Coordinaciones: Biología, Horticultura Ambiental,
Medicina Veterinaria y Zootecnia y Nutrición: 5310, 5311; Coordinaciones: Geografía Ambiental y Microbiología, 65214

9.2. Análisis microbiológico de la decocción y el subproducto de jamaica



SERVICIOS CLÍNICOS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
Unidad de Servicios Clínicos y Diagnóstico Molecular
Centro Universitario, Cerro de las Campanas S/N,
Edificio 9, Tel. 442 192 1200 ext. 5317. usc@uaq.mx



SOMOS UAQ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Santiago de Querétaro, Qro, 12 de mayo del 2023.

CLIENTE: Iza Fernanda Pérez Ramírez
RECEPCIÓN DE MUESTRA: 05/05/2023
RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA: Cliente
TIPO DE ANÁLISIS: Microbiológico

INFORME DE RESULTADOS

| No. muestra | Descripción | Bacterias Mesófilas Aerobias (ufc/g) | Coliformes totales (NMP/g) | Coliformes fecales (NMP/g) | Hongos (ufc/g) | Levaduras (ufc/g) |
|-------------|-----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|-------------------|
| 1 | Decocción de jamaica | < 1 | < 3 | < 3 | 1 | < 1 |
| 2 | Subproducto jamaica (pulverizada) | 22,000,000 | < 3 | < 3 | 10 | < 10 |

Metodología empleada:
 NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
 NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias Coliformes. Técnica del número más probable.
 NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de Mohos y levaduras en alimentos.

Atentamente
Somos profesionales, Somos Facultad de Química



Responsable
M. en C. Erika Beatriz Álvarez Hidalgo
Cédula Profesional No. 13339870

Clinica Santa Bárbara
Erika Fortes Gil S/N, M4D 117;
Santa Bárbara, Corregidora, Qro.
Tel. 442 225 0171 y 442 225 2027

Centro Universitario
Cerro de las Campanas S/N,
Edificio 9, Tel. 442 192 1200 ext. 5317
usc@uaq.mx

Clinica Santa Rosa Jáuregui
20 de noviembre S/N, Carr. Pie de Gallo
Santa Rosa Jáuregui, Qro.
Tel. 442 291 1163

