

Actividad hipotriglicéridémica de un extracto de rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) al administrarse antes y durante las comidas

Rodrigo Castañeda¹, Sully M. Cruz*¹, Armando Cáceres²

¹Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala; y, ²Laboratorio de Productos Naturales Farmaya, S.A., Guatemala.

*Autor al que se dirige la correspondencia: sullycv@hotmail.com

Recibido: 18 de mayo 2015 / Revisión: 21 de agosto 2015 / Aceptado: 15 de septiembre 2015 / Disponible en línea: 16 de noviembre 2015

Resumen

La elevación de los lípidos sanguíneos se ha convertido en un riesgo común de enfermedades cardiovasculares, en especial, en el caso del colesterol y triglicéridos, también a problemas pancreáticos, de la córnea, bazo e hígado. *Hibiscus sabdariffa* L., es una especie medicinal de la Malvaceae, su efecto sobre la reducción de los lípidos séricos se ha mencionado en varios estudios. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar la actividad de un extracto acuoso de los cálices de *H. sabdariffa*, para reducir los lípidos séricos en dos grupos de individuos, con valores de triglicéridos mayores de 150 mg/dL, al recibir una dosis de 15 mg de antocianinas totales al día, dividida en tres veces, por un periodo de dos meses para establecer su influencia, dependiendo del momento de su administración, un grupo recibíendola antes de la comida y otro durante la misma. El extracto de *H. sabdariffa* mostró un efecto hipotriglicéridémico significativo ($p = 0.034$), al finalizar el tratamiento, únicamente al administrar el extracto antes de las comidas. Al mismo tiempo, no se observó alteración en los niveles de colesterol total, colesterol contenido en las lipoproteínas de baja densidad y colesterol contenido en las proteínas de alta densidad en ninguno de los dos grupos evaluados. Los resultados sugieren que los extractos acuosos de *H. sabdariffa* podrían ser utilizados para ejercer una acción en los triglicéridos plasmáticos, dependiente del consumo de alimentos, y del momento de administración.

Palabras claves: Dislipidemias, antocianinas, triglicéridos, extractos vegetales

Abstract

Elevated blood lipids, cholesterol and triglycerides, has become a common health risk worldwide, not only for cardiovascular diseases, especially in the case of cholesterol and triglycerides, but also in pancreatic, corneal, spleen and liver problems. *Hibiscus sabdariffa* L., is a medicinal plant of the Malvaceae, its effect on reducing serum lipids is mentioned in several studies. The purpose of this study was to evaluate the activity of an aqueous extract of *H. sabdariffa* at a dose of 15 mg of anthocyanins daily, divided in three times a day, either before or during meals, over a period of 2 months, to decrease plasma triglycerides in subjects with values above 150 mg/dL, in order to establish the influence of the time of administration in this effect. The extract showed a hypotriglyceridemic effect ($p = 0.034$) in the first and second month of treatment, only when administered before meals. At the same time, no significant changes were observed in levels of total cholesterol, cLDL, cHDL in any of the evaluated groups. These results suggest that the aqueous extracts of *H. sabdariffa* could be used to reduce action in plasma triglycerides levels only when administered prior to meals.

Keywords: Dyslipidemia, anthocyanins, triglycerides, plant extracts



Introducción

La hipercolesterolemia es considerado el principal factor de riesgo cardiovascular (Velasco et al., 2000). La exposición de factores de riesgo cardiovascular puede reducirse con una dieta adecuada, debido no solo a la ingesta adecuada de nutrientes primarios, sino también a la contribución diaria de metabolitos secundarios. Las antocianinas poseen una actividad potencial como antioxidantes, antiateroscleróticos, antihipertensivos, antiinflamatorios, antimutagénicos y antitumorales (Wang & Stoner, 2008). Los efectos fisiológicos positivos de estos pigmentos vegetales están relacionados con su actividad antioxidante potente, demostrada en varios estudios *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo se ha evidenciado en estudios farmacocinéticos en humanos que la baja absorción sistémica de estos compuestos limita su potencial farmacológico (Wallace, 2011).

Estudios realizados en *Hibiscus sabdariffa* L. (rosa de Jamaica, hibiscus, roselle, carcadé) de la familia Malvaceae han demostrado las propiedades antioxidantes (Fernández-Arroyo et al., 2012), lo cual ha sido complementado con evaluación en modelos en animales, donde se le ha atribuido la actividad hipocolesterolemia, hipotriglicéridémica (Carvajal-Zarrabal et al., 2005, 2009; Chang, Huang, Huang, Ho, & Wang, 2006), uricosúrica (Kuo et al., 2012) y antihipertensiva, principalmente debido a sus antocianinas (Ali, Al Wabel, & Blunden, 2005; Kao, Tseng, Lee, Chan, & Wang, 2009; Kim et al., 2007).

En este sentido, son necesarios estudios clínicos con plantas cultivadas en el país para garantizar la seguridad y eficacia que tienen los metabolitos secundarios en promover la salud y prevenir enfermedades en la población guatemalteca (Castañeda & Cáceres, 2014). Sin embargo, para la realización de los mismos, son necesarios estudios preliminares que garanticen el efecto del extracto y el esquema de administración.

La importancia de este estudio radica en demostrar la actividad hipotriglicéridémica de un extracto de *H. sabdariffa* en sujetos mayores de 25 años, con diagnóstico de triglicéridos plasmáticos superiores a 150 mg/dL, sin tratamiento farmacológico, evaluando el efecto mediante la administración vía oral 30 min antes de las comidas o durante las comidas.

Materiales y Métodos

Diseño del estudio

Se tomó la muestra del personal docente y administrativo de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (Usac) de Guatemala, que habían participado previamente en un estudio de hiperlipidemia. Los sujetos fueron divididos de acuerdo al esquema de administración en dos grupos de 14 individuos, agrupados aleatoriamente de acuerdo a su edad e índice de masa corporal inicial, con el fin de evaluar la influencia de los alimentos en la administración del extracto vía oral, ya que las antocianinas son más estables a valores ácidos de pH y una parte del proceso de absorción se realiza en el estómago. A un grupo se le administró el extracto vía oral, tres veces al día, 30 min antes de cada comida; y el otro grupo se le administró el extracto vía oral, tres veces al día, durante cada comida. Por ser un estudio preliminar para un futuro ensayo clínico, con el diseño de un producto de uso alimenticio, en una forma de preparación tradicional, no existieron controles externos, ni doble ciego.

Los sujetos experimentales estuvieron en un esquema de administración del extracto acuoso durante 60 días, con tres evaluaciones de lípidos plasmáticos (triglicéridos, colesterol total -CT-, colesterol contenido en las lipoproteínas de baja densidad -cLDL- y colesterol contenido en las proteínas de alta densidad -cHDL-), una inicial y a los 30 y 60 días de administración. Las evaluaciones de lípidos plasmáticos se realizaron en el suero de una muestra obtenida después de un ayuno de 14 h por espectrofotometría según el método de Chabrol-Charonnat (Frings & Dunn, 1970), utilizando kits y estándares comerciales (Corp. Analíticos) y la infraestructura de la Unidad de Salud de la Usac. Los sujetos fueron utilizados como controles internos en su evaluación inicial.

Criterios de inclusión

Sujetos con triglicéridos plasmáticos superiores a 150 mg/dL, mayores de 25 años, sin tratamiento farmacológico que ejerciera acción en los triglicéridos plasmáticos o que pudiera haber interferido en el ensayo (fármacos hipolipemiantes, diuréticos tiazídicos, colestiramina, corticosteroides, amiodarona) por lo menos 30 días antes de ingresar al ensayo, carta de consentimiento informado para participar en el estudio, de género masculino o femenino.

Criterios de exclusión

Sujetos renuentes a recibir el tratamiento experimental, que implementen un cambio considerable en sus hábitos alimenticios (dieta) o de gasto energético (ejercicio) o que implementen el consumo de vitaminas y/o suplementos dietéticos.

Análisis y preparación del material vegetal

Se realizó el examen de identidad de la droga vegetal (*H. sabdariffa*) en forma macroscópica a partir de análisis botánico (No. de voucher 62963, Herbario Bigu), complementado con análisis micromorfológico y control de calidad, según especificaciones farmacopéicas (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003). El secado de la droga vegetal se realizó a 40°C en horno de convección (Serproma Lab) hasta una humedad relativa promedio de 10.5%. Se realizó una evaluación de los parámetros óptimos de extracción en un diseño factorial (datos no mostrados), evaluando proporción de etanol, temperatura y tiempo de extracción, a partir de la evaluación de sólidos totales y antocianinas, expresadas en delfinidina 3-sambubiósido, por el método de pH diferencial y la diferencia que se presenta dependiendo del momento de administración (Giusti & Wrolstad, 2003). Se realizaron los extractos a escala piloto en un reactor CSTR (Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales -LIEEXVE-, Usac) hasta una proporción 1:1 por medio de concentración en marmita de extracción con torre empacada. El proceso de filtrado se realizó a partir de sedimentación, y después de 1 h a partir de filtración con manta. Los ensayos de calidad fueron realizados a los extractos vegetales según los métodos de control de calidad para plantas medicinales (World Health Organization, 1998, 2007). Los extractos fueron valorados en concentración de antocianinas totales por día de administración.

Análisis estadístico

El número de muestra se calculó con base a una curva característica de operación con una $\alpha = 0.05$, poder = 0.90, una diferencia mínima esperada dentro de cada grupo de 50 mg/dL, y una desviación estándar estimada de 56 mg/dL (Dupont & Plummer, 1998). Los datos fueron analizados usando el programa Prism 5 Statistical Software package (GraphPad, San Diego, CA). Todos los valores fueron expresados como promedio \pm error estándar de la media, denotando intervalos

de confianza (IC) al 95%. Para determinar diferencias significativas intragrupal se utilizó t de Student pareada para cada grupo (a una cola), con un valor de α de 0.05, con el fin de evaluar cambios al inicio y al final del estudio, mientras que se utilizó t de Student a una cola para grupos independientes con un α de 0.05, para la comparación entre grupos entre las medias iniciales y finales de valores de triglicéridos (previo a realizarla se comprobó homocedasticidad entre varianzas de los grupos antes y durante las comidas, determinándose mediante estadístico de Levene). Se estableció como mínima reducción de triglicéridos 50 mg/dL, para considerarse como un tratamiento efectivo tomando en cuenta que el valor normal límite de triglicéridos es entre 150 y 200 mg/dL.

Resultados

Se reclutaron 14 trabajadores universitarios, para cada grupo, con triglicéridos superiores a 150 mg/dL, que no estaban bajo ningún tratamiento farmacológico y no padecían ninguna otra enfermedad crónica. Después de 60 días de administración del extracto de *H. sabdariffa*, los triglicéridos plasmáticos redujeron significativamente de 284.24 ± 154.53 a 229.31 ± 74.96 mg/dL para el grupo administrado antes de las comidas, con una diferencia de 54.93 mg/dL ($p = 0.034$, IC: 9.30-100.56 mg/dL), lo que equivale a una reducción del 85.8%, por lo que se considera que el tratamiento administrado antes de las comidas es efectivo en la disminución de triglicéridos como se muestra en la Figura 1.

En el grupo con administración del extracto de *H. sabdariffa* durante las comidas se observó una reducción de los triglicéridos plasmáticos de 229.73 ± 74.22 mg/dL a 193.16 ± 39.44 mg/dL, con una diferencia entre grupos no significativa de 36.56 mg/dL ($p = 0.105$, IC: -5.72-78.84 mg/dL), lo que equivale a una reducción del 60.0%, por lo que se considera que el tratamiento administrado vía oral durante las comidas es efectivo en la disminución de triglicéridos pero no lo esperado.

Los niveles de CT, cLDL y cHDL no mostraron diferencias significativas en los promedios en el transcurso del estudio en ninguno de los grupos observados ($p > 0.05$).

Discusión

El presente estudio evaluó el efecto hipolipemian- te de un extracto de *H. sabdariffa* y la diferencia que se presenta dependiendo el momento de administración. Se observó una reducción en los triglicéridos plasmá-

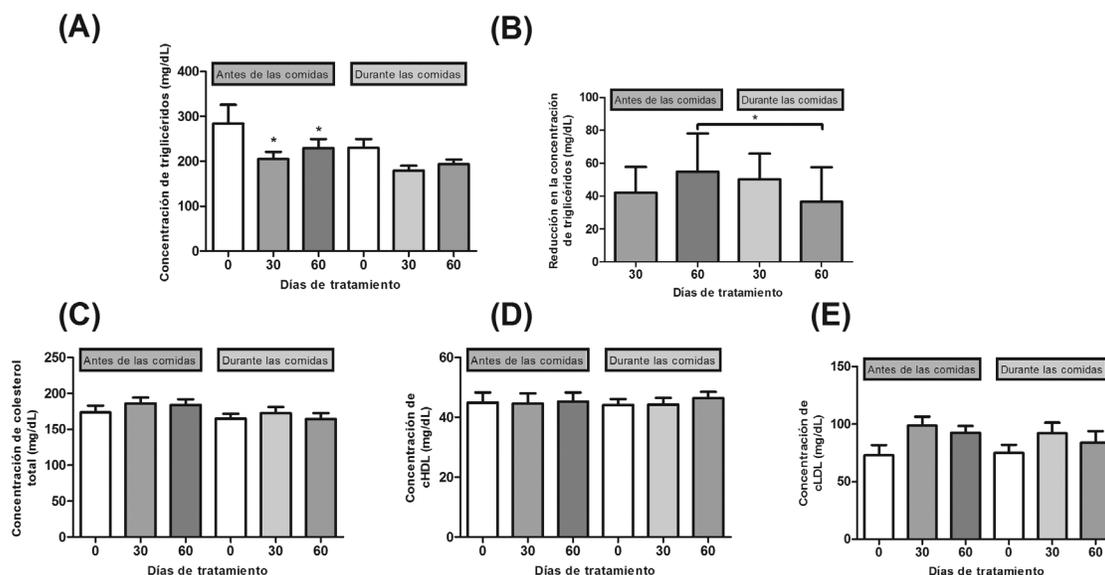


Figura 1. Comparación en el momento de administración al inicio y final de 60 días de tratamiento con *H. Sabdariffa* en las concentraciones promedio de triglicéridos (A), reducción de los niveles de triglicéridos (B), colesterol total (CT) (C), colesterol contenido en lipoproteínas de alta densidad (cHDL) (D), colesterol contenido en lipoproteínas de baja densidad (cLDL) (E). Los datos mostrados están expresados en promedio \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ indica diferencias significativas entre grupos.

60 días después de la administración del extracto, con mayor correlación, número de casos y significancia estadística al administrarla antes de cada comida.

Otros estudios respaldan estos resultados, demostrado por la capacidad de los antocianósidos por disminuir los triglicéridos plasmáticos a nivel clínico (Gurrola-Díaz et al., 2010; Hernández-Pérez & Herrera-Arellano, 2011) y a una evidencia en la inhibición de la enzima glicerol-3-fosfato-acil-transferasa 1 (GPAT1) lo que genera una disminución en la síntesis de triglicéridos (Guo, Li, Ling, Feng, & Xia, 2011).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, los valores de colesterol no fueron alterados en ninguno de los grupos, en ningún momento de la evaluación. Contrario a esto, se ha demostrado en otros estudios la capacidad de los antocianósidos por aumentar concentraciones plasmáticas de cHDL y disminuir los niveles de cLDL, debido a la inhibición de la proteína transportadora de esteres de colesterol (CETP), con lo que se promueve y facilita el transporte reverso de colesterol (Andersen & Markham, 2006). Incluso ensayos clínicos han demostrado este efecto en el colesterol con el uso de *H. sabdariffa* (Gurrola-Díaz et al., 2010; Hernández-Pérez & Herrera-Arellano, 2011;

Lin et al., 2007; Mohagheghi, Maghsoud, Khashayar, & Ghazi-Khansari, 2011). Sin embargo, esto no pudo demostrarse experimentalmente debido probablemente a que el valor de colesterol total no se encontraba fuera de los rangos establecidos como normales o involucrando procesos patológicos.

La actividad farmacológica de *H. sabdariffa* ha sido atribuida principalmente a sus antocianinas y en menor medida a sus flavonoides y compuestos fenólicos (Hopkins, Lamm, Funk, & Ritenbaugh, 2013). Es importante considerar que la estabilidad de estas sustancias activas podría estar relacionada con una actividad dependiente de sus procesos farmacocinéticos (Castañeda & Cáceres, 2014). En base a los mecanismos de absorción, distribución, metabolismo, eliminación y a la biodisponibilidad de las antocianinas, la mejor vía de administración es la oral, debido a su estabilidad en ambientes ácidos, con una parte del proceso de absorción de éstas moléculas en este compartimento biológico (Kong, Chia, Ngoh, Chia, & Brouillard, 2003; Passamonti, Vrhovsek, Vanzo, & Mattivi, 2005; Prior, 2004).

De igual forma, las antocianinas no son estables al pH sanguíneo y se degradan, consecuentemente su vida media es muy corta (1.3-7 hr). Similarmente, la

vida media de las antocianinas de *H. sabdariffa*, del-finidina 3-sambubiósido y cianidina 3-sambubiósido, ha sido demostrada experimentalmente con una vida media aproximada de 2.18 y 3.34 h, respectivamente (Frank et al., 2005; 2012). Por tal motivo, una frecuencia en su administración de tres veces al día fue considerada apropiada para dividir la dosis. Debido a la baja biodisponibilidad de las antocianinas de *H. sabdariffa* (0.018%) y a su baja absorción reportada (1%), son necesarias alternativas enfocadas a mejorar estas limitantes para lograr evaluar el verdadero potencial terapéutico de este producto natural.

En este estudio se plantearon dos momentos de administración tres veces al día, una 30 min antes de cada comida y la otra durante la comida. De acuerdo a los resultados obtenidos, según la administración del extracto, se demostró que existe mayor efecto cuando es administrado 30 min antes de la comidas, que durante las mismas, probablemente por una mayor absorción de la sustancia activa. Esto puede ser explicado por el hecho que las antocianinas son absorbidas a partir de diversos receptores en el intestino delgado y colón, los cuales podrían saturarse con la absorción de azúcares provenientes de la ingesta de alimentos, provocando una competición ocasionada por las moléculas glucosídicas unidas a las antocianinas (Manach, Williamson, Morand, Scalbert, & Remesy, 2005). Estos resultados sugieren que la biodisponibilidad de los principios activos, y por lo tanto la actividad, de *H. sabdariffa* puede ser incrementada al consumirla antes de la ingesta de alimentos.

El extracto de rosa de Jamaica (*H. sabdariffa*) utilizado a dosis diarias de 15 mg, administrado vía oral antes y durante las comidas, mostró un efecto hipotriglicéridémico al finalizar el tratamiento, al reducir los triglicéridos sanguíneos en pacientes con valores superiores a 150 mg/dL, con un mayor efecto al administrarlo antes de cada comida.

Futuras investigaciones deberán enfocarse a esclarecer las interacciones que tienen los metabolitos activos de productos naturales con esquemas de administración y a evaluar formulaciones diseñadas para mejorar la biodisponibilidad de diversos fitofármacos.

Agradecimientos

A todas las personas e instituciones que colaboraron con el proceso de realización o con la revisión de ésta investigación: Unidad de Salud y Laboratorio Biológico de la Unidad de Salud, Usac; Laboratorio de

Investigación de Extractos Vegetales (LIEXVE), Facultad de Ingeniería, Usac; Servicio de Consulta Terapéutica y Toxicológica (SECOTT), de la Usac. Especial agradecimiento a todos los sujetos que voluntariamente cumplieron con la administración del extracto.

Referencias

- Ali, B. H., Al Wabel, N., & Blunden, G. (2005). Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Phytotherapy Research*, 19(5), 369-375. doi: 10.1002/ptr.1628
- Andersen, Ø., & Markham, K. (Eds.). (2006). *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Castañeda, R., & Cáceres, A. (2014). Compuestos bioactivos y propiedades terapéuticas de los cálices de rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* Linn). *Revista Científica*, 24,(1), 7-24.
- Carvajal-Zarrabal, O., Hayward-Jones, P. M., Orta-Flores, Z., Nolasco-Hipólito, C., Barradas-Dermitz, D. M., Aguilar-Uscanga, M. G., & Pedroza-Hernández, M. F. (2009). Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. dried calyx ethanol extract on fat absorption-excretion, and body weight implication in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1-5. doi: 10.1155/2009/394592
- Carvajal-Zarrabal, O., Waliszewski, S. M., Barradas-Dermitz, D. M., Orta-Flores, Z., Hayward-Jones, P. M., Nolasco-Hipólito, C., ... Trujillo, P. R. (2005). The consumption of *Hibiscus sabdariffa* dried calyx ethanolic extract reduced lipid profile in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60(4), 153-159. doi: 10.1007/s11130-005-9023-x
- Chang, Y. C., Huang, K. X., Huang, A. C., Ho, Y. C., & Wang, C. J. (2006). *Hibiscus* anthocyanin-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 44(7), 1015-1023. doi:10.1016/j.fct.2005.12.006
- Dupont, W., & Plummer, W. (1998). *Power and sample size calculations for studies involving linear regression: Controlled Clinical Trials*. [A Review and Computer Program. Version 3.0.43]

- Fernández-Arroyo, S., Herranz-López, M., Beltrán-Debón, R., Borrás-Linares, I., Barrajón-Catalán, E., Joven, J., ... Micol, V. (2012). Bioavailability study of a polyphenol-enriched extract from *Hibiscus sabdariffa* in rats and associated antioxidant status. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(10), 1590-1595. doi: [10.1002/mnfr.201200091](https://doi.org/10.1002/mnfr.201200091)
- Frank, T., Janßen, M., Netzel, M., Straß, G., Kler, A., Kriesl, E., & Bitsch, I. (2005). Pharmacokinetics of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. extract. *Journal of Clinical Pharmacology*, 45(2), 203-210. doi: [10.1177/0091270004270561](https://doi.org/10.1177/0091270004270561)
- Frank, T., Netzel, G., Kammerer, D. R., Carle, R., Kler, A., Kriesl, E., ... Netzel, M. (2012). Consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. aqueous extract and its impact on systemic antioxidant potential in healthy subjects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2207-2218. doi: [10.1002/jsfa.5615](https://doi.org/10.1002/jsfa.5615)
- Frings, C. S., & Dunn, R. T. (1970). A colorimetric method for determination of total serum lipids on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology*, 53, 89-91.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217-225. doi: [10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8)
- Guo, H., Li, D., Ling, W., Feng, X., & Xia, M. (2011). Anthocyanin inhibits high glucose-induced hepatic mtGPAT1 activation and prevents fatty acid synthesis through PKC ζ . *Journal of Lipid Research*, 52(5), 908-922. doi: [10.1194/jlr.M013375](https://doi.org/10.1194/jlr.M013375)
- Gurrola-Díaz, C. M., García-López, P. M., Sánchez-Enríquez, S., Troyo-Sanromán, R., Andrade-Gonzales, I., & Gómez-Leyva, J. F. (2010). Effects of *Hibiscus sabdariffa* extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomedicine*, 17(7), 500-505. doi: [10.1016/j.phymed.2009.10.0142010](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.10.0142010)
- Hernández-Pérez, F., & Herrera-Arellano, A. (2011). Tratamiento de la hipercolesterolemia con *Hibiscus sabdariffa*. Ensayo clínico aleatorizado controlado. *Revista Médica del Instituto Mexicano de Seguridad Social*, 49(5), 469-480.
- Hopkins, A., Lamm, M. G., Funk, J. L., & Ritenbaugh, C. (2013). *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: A comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia*, 85, 84-94. doi: [10.1016/j.fitote.2013.01.003](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.01.003)
- Kao, E. S., Tseng, T. H., Lee, H. J., Chan, K. C., & Wang, C. J. (2009). Anthocyanin extracted from *Hibiscus attenuate* oxidized LDL-mediated foam cell formation involving regulation of CD36 gene. *Chemico-Biological Interactions*, 179(2-3), 212-218. doi: [10.1016/j.cbi.2009.01.00](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.01.00)
- Kim, J. K., So, H., Youn, M. J., Kim, H. J., Kim, Y., Park, C., ... Park, R. (2007). *Hibiscus sabdariffa* L. water extract inhibits the adipocyte differentiation through the PI3-K and MAPK pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(2), 260-267. doi: [10.1016/j.jep.2007.08.028](https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.028)
- Kuo, C. Y., Kao, E. S., Chan, K. C., Lee, H. J., Huang, T. F., & Wang, C. J. (2012). *Hibiscus sabdariffa* L. extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced rats. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 375-381.
- Kong J. M., Chia L. S., Ngoh N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933.
- Lin, T., Lin, H., Chen, C., Lin, M., Chou, M., & Wang, C. (2007). *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research* 27, 140-145.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 230S-242S.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. (2003). *Real Farmacopea Española. Suplementos 2.1 y 2.2* (2ª ed.). Madrid: Boletín Oficial del Estado.
- Mohagheghi, A., Maghsoud, S., Khashayar, P., & Ghazi-Khansari, G. (2011). The effect of *Hibiscus sabdariffa* on lipid profile, creatinine, and serum electrolytes: A randomized clinical trial. *International Scholarly Research Network Gastroenterology*, 2011, 1-4. doi: [10.5402/2011/976019](https://doi.org/10.5402/2011/976019)

- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, 544(1-3), 210–213. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00504-0
- Prior, R. L. (2004). Absorption and metabolism of anthocyanins: Potential health effects in phytochemicals - mechanisms of action. En M. S. Meskin, W. R. Bidlack, A. J. Davies, D. S. Lewis & R. K. Randolph (Eds.) *Phytochemicals: mechanism of action* (pp. 1-19). Boca Raton: CRC Press.
- Velasco, J. A., Cosín, J., Maroto, J. M., Muñoz, J., Casanovas, J. A., Plaza, I., & Abada, L. T. (2000). Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en prevención cardiovascular y rehabilitación cardíaca. *Revista Española de Cardiología*, 53(8), 1095-1120.
- Wallace, T. (2011). Anthocyanins in cardiovascular disease. *Advances in Nutrition*, 2, 1-7. doi:10.3945/an.110.000042
- Wang, L. S., & Stoner, G. D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269(2), 281-290. doi: 10.1016/j.canlet.2008.05.020
- World Health Organization. (1998). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Ginebra: Autor.
- World Health Organization. (2007). *WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues*. Ginebra: Autor.