



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL JUGO DE DOS VARIEDADES
DE GRANADA ROJA (*Punica granatum* L.) SOBRE LOS
NIVELES DE GLUCOSA Y LÍPIDOS EN RATAS DIABÉTICAS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SALVADOR IVÁN MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2009.

No. Adq. 117 000

No. Título _____

Clas. IS 616.462

M 385e

AGRADECIMIENTOS

Deseo extender mi agradecimiento más sincero a:

Mi director de tesis la Dra. Rosalía Reynoso Camacho y a mi co-director el Dr. Candelario Mondragón Jacobo por su guía y apoyo durante mi trabajo.

El Programa de Nopal y Frutales del Campo Experimental Bajío ubicado en Celaya, Gto. del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por proporcionar los frutos de granada roja como objeto de estudio y apoyar el financiamiento del proyecto.

La Dra. Minerva Ramos Gómez que guío y facilitó mi trabajo en el Laboratorio de Toxicología Molecular del Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC) además de tener una participación activa en la redacción del mismo.

La Dra. Laura Cristina Berumen Segura que me prestó su invaluable sentido crítico, guiándome en la revisión y corrección del proyecto escrito.

A las personas involucradas temporalmente en el Laboratorio de Biología Molecular (Tania, Rosalba, Cristina, Karla Angélica, Karla Diana, Flor, Tere, Cipactli, Giovanna, Consuelo, Nadia, Gemma e Irais), el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Postcosecha de Frutas y hortalizas (Jesús y Lorenzo), el Laboratorio de Toxicología (Aby) y el Laboratorio de Toxicología Molecular (Linka); todos del PROPAC, por todo el apoyo en la realización de éste trabajo.

Al personal del Laboratorio Clínico Acueducto; a cargo de la Q.F.B. Norma Pacheco Hernández, quienes, durante mis prácticas profesionales, facilitaron los permisos y el tiempo para llevar a cabo los trámites administrativos.

A mis amigos: Angeles, Deyanira Aidé, Diana María, Diana Pérez, Guadalupe, Jazmín Citlalli, Josafath Ezequiel, Karla Ahíde, Luis Miguel, María Elena, Martha Olivia, Pamela Elizabeth y Víctor Efraín por estar siempre en los momentos difíciles, por su apoyo y amistad; Gracias.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.	i
ÍNDICE DE CUADROS.	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
RESUMEN.	
I.INTRODUCCIÓN.	1
II.ANTECEDENTES.	3
II.1 Diabetes.	3
II.1.1 Generalidades.	3
II.1.2 Clasificación.	3
II.1.2.1 Tipo 1.	3
II.1.2.2 Tipo 2.	5
II.1.3 Relación entre el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas con la diabetes.	5
II.1.4 Tratamiento de la diabetes.	8
II.1.5 Dieta y diabetes.	8
II.2 Granada roja (<i>Punica granatum</i> L.).	9
II.2.1 Datos históricos y origen del nombre.	9
II.2.2 Características morfológicas.	10
II.2.3 Distribución geográfica y producción.	12
II.2.4 Clasificación agronómica.	14
II.2.5 Composición química.	15
III.HIPÓTESIS.	20
IV.OBJETIVOS.	21
IV.1 General.	21
IV.2 Específicos.	21

V.METODOLOGÍA.	22
V.1 Materiales.	22
V.1.1 Material químico.	22
V.1.2 Material biológico.	22
V.1.2.1 Animales de experimentación.	22
V.1.2.2 Granada roja.	22
V.2. Métodos.	23
V.2.1 Elaboración del jugo de granada roja.	23
V.2.2 Determinaciones en el jugo de granada roja.	23
V.2.2.1 Cuantificación de fenoles totales.	23
V.2.2.2 Cuantificación de antocianinas.	24
V.2.2.3 Cuantificación de flavonoides totales.	25
V.2.2.3 Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .	26
V.2.3 Evaluación del efecto del jugo de granada roja sobre los niveles de lípidos en ratas diabéticas.	27
V.2.3.1 Inducción de diabetes con estreptozotocina (STZ).	27
V.2.3.2 Determinación de glucosa sanguínea en ayuno.	27
V.2.3.3 Estudio experimental.	27
V.2.3.4 Determinación de triglicéridos, colesterol total y HDL en suero.	29
V.2.3.5 Análisis estadístico.	29
VI.RESULTADOS.	30
VI.1 Parámetros físicos y químicos del jugo de granada roja.	30
VI.1.1 Determinaciones de pH y sólidos solubles totales.	30
VI.1.2 Determinaciones de parámetros de color.	31
VI.2 Cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .	31
VI.3 Estudios <i>in vivo</i> .	33

VII.DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	44
VIII.CONCLUSIONES.	50
IX.BIBLIOGRAFÍA.	51
X.ANEXO 1.	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición nutrimental de fruto del granado (100 g ó 3.5 oz).	15
2	Compuestos fenólicos identificados en diferentes grupos de granada roja.	17
3	Perfil lipídico sérico en sujetos sanos (grupo control), así como en pacientes diabéticos antes y después del consumo de jugo de granada.	19
4	Evaluación del efecto del jugo de granada roja sobre los niveles séricos de glucosa y lípidos en ratas diabéticas.	28
5	Comparación de los niveles de pH y SST en las diferentes variedades de granada roja en estudio.	30
6	Determinación de color en las diferentes variedades de granada roja en estudio.	31
7	Comparación entre la determinación de fenoles totales, flavonoides totales, antocianinas y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en las diferentes variedades de granada roja en estudio	32
8	Peso corporal de las ratas sanas y diabéticas tratadas con el jugo de granada roja.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Patogenia de la diabetes.	4
2	Árbol y brazos característicos del granado.	11
3	Flor, fruto y semillas de granada roja (<i>Punica granatum</i> L.).	12
4	Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en jugos de granada roja comparada con las de vino rojo, té verde y el extracto acuoso de las cáscaras de la fruta evaluada por los métodos ABTS, DPPH, FRAP y DMPD.	16
5	Niveles de glucosa en ratas sanas tratadas con el jugo de granada roja (5%).	33
6	Niveles de glucosa en ratas diabéticas tratadas con el jugo de granada roja (2.5% y 5%).	34
7	Consumo de alimento en ratas sanas tratadas con el jugo de granada roja (5%).	36
8	Consumo de alimento en ratas diabéticas tratadas con el jugo de granada roja (2.5% y 5%)	36
9	Consumo de agua o jugo en ratas sanas durante el tiempo de experimentación.	37
10	Consumo de agua o jugo en ratas diabéticas tratadas con el jugo de granada roja (2.5% y 5%).	38
11	Niveles de triglicéridos en suero de animales sanos y diabéticos tratados con el jugo de granada roja.	39
12	Niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en suero de animales tratados con el jugo de granada roja.	40
13	Niveles de colesterol total en suero de los animales sanos y diabéticos tratados con el jugo de granada roja.	41

14	Niveles de colesterol no HDL en suero de animales tratados con el jugo de granada roja.	42
15	Niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en suero de animales tratados con el jugo de granada roja.	43

RESUMEN.

El jugo de la granada roja (*Punica granatum* L.) contiene altas concentraciones de compuestos fenólicos, los cuales son capaces de disminuir los niveles de glucosa en sangre y el estrés oxidativo relacionado con la diabetes. Sin embargo, la concentración y perfil de estos compuestos están en función de la variedad de granada. En base a lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo cuantificar los compuestos fenólicos del jugo de granada de dos variedades (Tecoautla y Apaseo EA) y determinar su efecto sobre los niveles de glucosa y perfil lipídico en ratas sanas y diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ). Las muestras de dichos frutos fueron donadas por el INIFAP, campus Celaya, además, se utilizó la variedad Wonderful proveniente de EUA para fines comparativos. Al jugo de granada se le cuantificó pH, sólidos solubles totales (SST), color, fenoles totales, flavonoides totales, antocianinas y capacidad antioxidante *in vitro* (expresada en equivalentes trolox). Para los estudios *in vivo* se evaluó el jugo de granada roja incorporándolo en el agua de beber de ratas sanas (5%) y diabéticas (2.5 y 5%) inducidas con STZ. Cada semana se determinaron los niveles de glucosa sanguínea. Después de tres semanas de tratamiento, los animales se sacrificaron y se cuantificó el perfil lipídico: triglicéridos, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y colesterol no HDL. Se encontró que la variedad Wonderful muestra la mayor concentración de fenoles totales (3601.66 mg eq. ácido gálico/L de muestra), flavonoides totales (5.19 mg eq. catequina/mL de muestra), antocianinas (425.02 mg eq. cianidina-3-glucósido/L de muestra) y capacidad antioxidante (20.96 mM eq. trolox). En los estudios *in vivo* se encontró que el jugo de granada roja incrementó los niveles de glucosa hasta en un 41% en sanas y 25% en diabéticas. Así mismo, en el caso de las ratas sanas la variedad Wonderful incrementó sus niveles de triglicéridos (18%). Mientras que en el caso de las ratas diabéticas, se observó una disminución para la variedad Tecoautla y Apaseo EA al 5% (28% y 39%, respectivamente), pero esta última fue la única variedad que disminuyó también los niveles de colesterol total y colesterol no HDL. Estos resultados sugieren que el jugo de granada de la variedad Apaseo EA, no controla los niveles de glucosa en sangre pero podría disminuir el riesgo cardiovascular.

I. INTRODUCCIÓN.

La diabetes en México ocupa el primer lugar de mortalidad y actualmente existen 12 millones de enfermos en nuestro país. Esta enfermedad acelera su incidencia por los malos hábitos de alimentación, falta de ejercicio y sobre todo la obesidad. En general, los pacientes con diabetes se caracterizan por dos defectos metabólicos: una alteración en la secreción de insulina que se produce en forma retardada o insuficiente por la carga de glucosa y una incapacidad de los tejidos periféricos para responder a esta hormona (resistencia a la insulina). Lo anterior predispone a este tipo de pacientes a padecer una mayor incidencia de complicaciones e incluso desarrollar enfermedades cardiovasculares, arterioescleróticas, vasculares periféricas, cerebrales, renales, entre otras.

Actualmente, una de las terapias más importantes para el control de la diabetes se basa principalmente en la incorporación de alimentos con la capacidad de disminuir los niveles de glucosa en sangre. Entre los alimentos más importantes destacan el nopal, frijol, maíz, chaya, chilacayote, etc.

Recientemente se han reportado estudios en los que se ha propuesto al árbol del granado (*Punica granatum* L.) como una fuente importante de fitoquímicos con alto valor medicinal. Estos compuestos pueden estar presentes en la raíz, corteza, flores, frutos maduros y semillas. En la medicina tradicional se encuentran recetas donde es recomendado por su actividad antimicrobiana, astringente, antitusígena y antiinflamatoria, por mencionar algunas.

El jugo de granada, rico en compuestos fenólicos (principalmente antocianinas), tiene la capacidad de disminuir los niveles de glucosa en sangre y el estrés oxidativo relacionado con la diabetes. Se han evaluado los efectos de una dilución del jugo de granada en pacientes diabéticos tipo 2 obteniendo efectos antioxidantes en suero (perfil de lípidos) y macrófagos, los cuales podrían contribuir a la atenuación del desarrollo de la enfermedad junto con sus complicaciones. Otro

estudio evaluó el consumo de jugo de granada concentrado en pacientes diabéticos tipo 2 con hiperlipidemias mostrando cambios en los parámetros séricos lipémicos siendo benéfico en la modificación de factores de riesgo cardiovasculares.

El cultivo de granada roja en México es considerado como marginal, debido a que la superficie plantada es mínima y el consumo limitado, aun cuando el árbol y la fruta son ampliamente conocidos desde los tiempos de la colonia. Entre las posibles causas del bajo consumo están la competencia con otras frutas de verano, la ignorancia de los beneficios de su ingestión regular y probablemente la dificultad para comerla. La información generada recientemente fuera de México sobre las propiedades funcionales de los productos de la granada no ha llegado al consumidor nacional.

Sin embargo el árbol de granada roja es altamente productivo, adaptable a muchas regiones del Centro y Norte de México y nuestro país posee variedades criollas que son apreciadas por el consumidor. Los estados de Guanajuato e Hidalgo son los productores más importantes, en Guanajuato, Apaseo El Alto aporta el 72% de la producción. El mercado actual también ha sido explorado con granada importada de California con gran éxito. Todos estos factores indican que la producción de este frutal será de mayor interés para los productores mexicanos en el mediano plazo.

En base a lo anterior, en el presente estudio se evaluaron características físicas y compuestos fenólicos del jugo de dos variedades nacionales de granada roja (Apaseo EA y Tecozautla), en comparación con una variedad de importación (Wonderful) altamente comercializada en México. Así mismo, se determinó su efecto en el control de glucosa y perfil lipídico en ratas sanas y diabéticas.

II. ANTECEDENTES.

II.1 Diabetes.

II.1.1 Generalidades.

La diabetes es un trastorno crónico que afecta al metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas. Dicho trastorno metabólico altera el proceso normal de la glucosa en el organismo e inicia cuando la producción natural de insulina en el páncreas se reduce y su acción disminuye. Con el paso del tiempo y a medida que la enfermedad va avanzando, las células que producen la insulina se van alterando, perdiendo su función de manera paulatina, además, la alta concentración de azúcar en la sangre puede afectar a diversos órganos, generando las complicaciones propias de la enfermedad (Figura 1).

Dentro de los factores de riesgo de esta enfermedad se encuentran: la herencia, edad avanzada, exceso de peso y el estilo de vida. El exceso de peso es una de las características más relevantes de la diabetes tanto en niños como en adultos, pues la obesidad puede producir resistencia a la insulina, es decir, ocasionar cierta incapacidad en el organismo para usar eficazmente esta hormona. Una vida sedentaria ligada a hábitos alimenticios inadecuados (consumir un alto contenido de grasa, comida chatarra, productos con elevado contenido de sodio, etc.) aumenta las posibilidades de desarrollar la enfermedad (OMS, 1999).

II.1.2 Clasificación.

II.1.2.1 Tipo 1

La diabetes tipo 1, también conocida como juvenil (debido al inicio temprano) o insulino-dependiente (debido a la necesidad clínica de insulina), es subclasificada

como tipo 1 autoinmune (tipo 1a) o tipo 1 idiopática (tipo 1b). Lo que las diferencia es la presencia o no de autoanticuerpos contra los islotes (Winter, 2002).

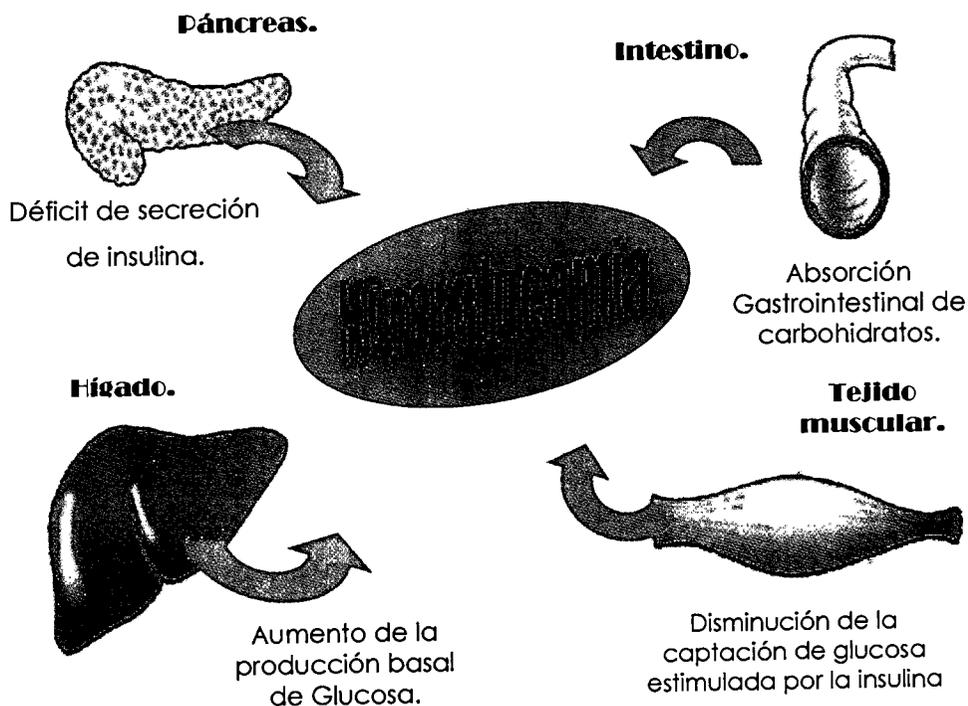


Figura 1. Patogenia de la diabetes (Adaptado de Litwak, 2002).

La tipo 1a es una enfermedad de origen multifactorial, donde el sistema inmune juega un papel importante en su patogénesis. Debido a la destrucción autoinmune de las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas, la producción de insulina disminuye y esto es lo que conlleva finalmente la presentación clínica de la enfermedad.

En el periodo en que son evidentes los síntomas clínicos, 80-90% de las células β han sido destruidas. Las células que secretan glucagón, somatostatina, y polipéptido pancreático generalmente se preservan y se distribuyen dentro de los islotes (Notkins, 2001).

En general la diabetes tipo 1 tiene un amplio componente genético debido a la alta tasa de transmisión familiar; el pariente de un diabético tiene aproximadamente un 7% de riesgo de desarrollar la enfermedad, y a su vez el hijo de un diabético tiene un 6%, afectando a 1 de cada 300 niños (Bach, 1994; Wucherpfenning, 2001).

II.1.2.2 Tipo 2.

En este grupo se incluyen individuos que demuestran resistencia a la insulina y en ocasiones una relativa deficiencia de la hormona. La patogénesis de esta enfermedad indica que en individuos genéticamente predispuestos se produce inicialmente resistencia a la insulina por defectos en los transportadores de glucosa o alteración de la cascada de acción de la insulina (Cline, 1999).

En la homeostasis de la glucosa tiene especial importancia el transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT-4 (Shepherd y Kahn, 2005). La resistencia a la insulina produce progresivamente un deterioro de la función celular beta por lo que se han postulado diferentes mecanismos aún en estudio: toxicidad de la elevada concentración de glucosa, agotamiento de las células beta, alteración en la síntesis de insulina y lipotoxicidad derivada de los productos metabólicos del exceso de ácidos grasos circulantes (Leahy, 2005). No se produce una destrucción autoinmune de las células beta. La mayoría de pacientes son obesos y tienen un elevado riesgo de padecer complicaciones macro y microvasculares (ADA, 2002).

II.1.3 Relación entre el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas con la diabetes mellitus.

Metabolismo de carbohidratos

Los diabéticos presentan un metabolismo similar al que se tiene normalmente en ayuno. Al no haber insulina suficiente para facilitar la entrada de glucosa en la célula, el nivel de sangre aumenta, con lo cual la célula se deshidrata por

osmolaridad; esto hace que la célula pierda agua para intentar igualar las presiones osmóticas; en consecuencia, habrá un aumento de la osmolaridad en el compartimiento extracelular y por ello, también en la sangre. Presentándose una hiperglucemia, que puede llegar a valores serológicos de 300-350 mg/dL.

En el riñón se produce una glucosuria y es que la glucosa se excreta por la orina debido al hecho que la concentración de glucosa en el plasma sanguíneo supera el umbral renal. Así, esta glucosa que pasa a la orina arrastra agua osmóticamente, dando lugar a una deshidratación intra y extracelular, estimulando el centro de la sed y derivando en una acentuada polidipsia.

Metabolismo de proteínas

En el diabético se disminuye la síntesis de proteínas en los tejidos, favoreciéndose la proteólisis (se tiene que hacer gluconeogénesis a partir de los aminoácidos). Ello se manifiesta clínicamente, en conjunto con las alteraciones del metabolismo lipídico, en una disminución del peso y una polifagia. La disminución de peso, si bien es progresiva, puede alcanzar un estado crítico que se denomina caquexia (Domínguez, 2005).

Metabolismo de lípidos

Cuando no se produce la captación de glucosa mediada por la insulina, las células del organismo reaccionan obteniendo energía (ATP) de los ácidos grasos. En la sangre se incrementarán los ácidos grasos y tendrán lugar una serie de anomalías en el metabolismo lipídico, favoreciéndose la acumulación de lípidos en las paredes de los vasos, derivando en una arterioesclerosis. En el hígado, por otra parte, se estimulará el mecanismo de transporte a través de la carnitina hacia la mitocondria, que es donde tiene lugar la beta-oxidación de los ácidos grasos. Los derivados del catabolismo de los ácidos grasos, los cuerpos cetónicos, saldrán entonces de las mitocondrias y se irán acumulando en la sangre, dando lugar a una cetoacidosis, la

cual disminuye el pH sanguíneo, que a su vez puede conducir al paciente a una situación crítica de coma diabético e incluso a la muerte (Domínguez, 2005; Villa, 2007).

Numerosos mecanismos de base lipídica se han citado como posibles explicaciones para el aumento de riesgo asociado a diabetes. Entre ellos cabe mencionar la coagulación aumentada, la eliminación de lipoproteínas glucosiladas alterado y la susceptibilidad aumentada del colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) a la oxidación (Villa, 2007).

El perfil lipídico de los pacientes con diabetes tipo 1 suele ser normal si es efectivo su control de glucosa. Además de niveles altos de glucosa en sangre, como consecuencia de su insensibilidad a la insulina, las personas con diabetes tipo 2 también tienen un alto nivel de triglicéridos tras las comidas, incluso cuando sus niveles de triglicéridos antes de comer son normales. En personas sin diabetes, los triglicéridos aumentan gradualmente tras las comidas y vuelven a su nivel normal entre 4 y 6 horas después de las mismas. En personas con diabetes tipo 2, incluso con niveles de triglicéridos normales antes de las comidas, los niveles de triglicéridos siguen aumentando tras el desayuno a lo largo del día (Dekker, 2004).

Debido a la transferencia continúa de lípidos enzimáticos entre diferentes partículas, en los diabéticos se observa un tiempo de circulación mucho más largo con niveles elevados de triglicéridos, niveles de colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) bajos, niveles normales de colesterol LDL y niveles aumentados de apo B. Las partículas de colesterol LDL y HDL son pequeñas, además de densas, mostrando efectos tóxicos sobre las paredes arteriales. Se ha demostrado que todas estas partículas son predictivas independientes de enfermedades cardiovasculares, especialmente en diabetes tipo 2 y esta condición es agravada por la coexistencia de otros factores de riesgo, como la hipertensión (Watkins, 2003; Dekker, 2004; Villa, 2007).

II.1.4 Tratamiento de la diabetes.

El tratamiento de la diabetes está dirigido a aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y la prevención de complicaciones agudas y crónicas. Las estrategias de tratamiento se dividen en no farmacológicas, como estrategias nutricionales (dieta en conjunto con ejercicio), y las farmacológicas que se dividen en medicamentos orales e insulina (Alfaro y col., 2000; Mateos y Zacarías, 2002).

Los principales grupos de fármacos orales los constituyen las sulfonilureas, eficaces en controlar la hiperglucemia con mínimos efectos secundarios; las biguanidas que incrementan la sensibilidad a la insulina; los inhibidores de glucosidasas intestinales que reducen la hiperglucemia postprandial; las tiazolindinedionas que mejoran el síndrome de resistencia a la insulina y las meglitinidas que restauran la primera fase de secreción de insulina disminuyendo la hiperglucemia postprandial sin pico hiperglucémico entre comidas (Alfaro y col., 2000).

Cada grupo de fármacos orales tiene características propias por mecanismo de acción, indicaciones y contraindicaciones específicas, así como, efectos adversos, por lo que su conocimiento es indispensable para su adecuado uso. La terapia con insulina tradicionalmente utilizada en la diabetes tipo 1 ha ampliado su uso recientemente como indicación en la diabetes tipo 2 que puede utilizarse sola o combinada con medicamentos orales, con lo que pueden lograrse mejores metas de control y conseguir los objetivos deseados (Mateos y Zacarías, 2002).

II.1.5 Dieta y diabetes.

La dieta tiene un papel fundamental en la prevención y control de la diabetes. Estudios epidemiológicos han demostrado que poblaciones que consumen dietas mediterráneas tienen una menor incidencia de enfermedades crónico degenerativas (Wahle, 2004). Las características principales de esta alimentación

son un alto consumo de productos vegetales (frutas, verduras, legumbres, frutos secos, pan y otros cereales) siendo el trigo el alimento base, el aceite de oliva como grasa principal, un mayor consumo de aves y pescado que de carnes rojas, y el consumo regular de vino en cantidades moderadas (León y Castillo, 2002). Por lo tanto, patrones dietarios tradicionales pueden ayudar a reducir el riesgo de obesidad y diabetes, debido a un adecuado balance de calorías y adecuado consumo de nutrimentos. Aunque no es posible definir una dieta típica para el mexicano, si se puede hablar de algunos alimentos que normalmente consume la población mexicana, entre los cuales se encuentran: el frijol, el maíz, el nopal, la calabaza, el chile, etc.

La incorporación de productos industrializados altos en azúcares en la dieta tradicional junto con un consumo pobre en frutas y verduras ha demostrado tener un mayor riesgo de presentar la enfermedad (hasta un 31%) en comparación a las personas que no lo hacen (Feinglos y Totten, 2008; Harding y col, 2008; Palmer y col, 2008).

II.2 Granada roja (*Punica granatum* L.).

II.2.1 Datos históricos y origen del hombre.

La granada roja es fruta del árbol del granado cuyo origen es, probablemente, el Oriente Próximo. Su existencia es conocida desde antes de la era de Cristo y el árbol fue cultivado por fenicios, griegos, árabes y romanos. Se sabe que los antiguos egipcios preparaban con su jugo un vino ligero con sabor a frambuesa (Agustí, 2004).

A los fenicios se les debe el nombre del género, *Punica*. El nombre de la especie *granatum* deriva del latín, mientras que en inglés se hace referencia a ésta como *pomegranate*.

II.2.2 Características morfológicas.

El granado, *P. granatum* L., es una planta dicotiledónea perteneciente al orden mirtales, familia *Punicaceae*.

Es un arbusto caducifolio que alcanza hasta 6 m de altura. Su raíz es superficial, nudosa, fuerte, de color rojizo y alcanza gran desarrollo. Sus ramas alternas y abiertas, son de porte llorón, de grosor medio y, en ocasiones, con espinas terminales (Figura 2a).

Las yemas del granado son de tipo determinado, vegetativas o mixtas. Las hojas son opuestas, enteras, lisas, sin estípulas, de 2-5 cm de longitud y 1-3 cm de anchura y con peciolo cortos (Figura 2b).

Las flores, solitarias o en grupos de hasta siete, se sitúan en los ramos mixto, en posición axilar y/o coronándolos, y/o en ramos anticipados; poseen entre 5-9 pétalos y sépalos, ambos de color rojo y alternantes (Figura 3a); son hermafroditas.



(a)



(b)

Figura 2 (a) Árbol y (b) brazos característicos del granado (Mondragón y Juárez, 2008).

El fruto, denominado balausta, es una baya globosa coronada por el cáliz, carnoso y persistente, de corteza gruesa y de color rojizo, formada por varias cavidades polispermas, separadas por membranas (Figura 3b).

Las semillas, que rellenan completamente las cavidades, son voluminosas y poseen bien desarrollada la capa externa de la testa (sarcotesta), de color rosáceo casi transparente y comestible (Figura 3c), mientras que la capa interna esta lignificada, su pulpa es roja y jugosa (Agustí, 2004).



(a)



(b)



(c)

Figura 3 (a) Flor, (b) fruto y (c) semillas de granada roja (*Punica granatum* L.) (Cooper, 1986; Morton, 1987; Takoradee, 2006).

Los frutos son no climatéricos y se recolectan a los 5-7 meses de la floración, de principios de septiembre a principios de noviembre, dependiendo de la variedad y de las condiciones climáticas (Agustí, 2004). Se abre espontáneamente al llegar la madurez por fisuras que dejan al descubierto el contenido de cada lóculo (Morton, 1987).

II.2.3 Distribución geográfica y producción.

Actualmente, el granado se cultiva en casi toda la Cuenca Mediterránea y países de Oriente Medio. España es el país productor más importante en Europa, mientras

que Túnez y Egipto, lo son en el Norte de África. En el cercano Oriente; Irán, Jordania, y Turquía abastecen al mercado regional y el europeo. En Asia, la India es líder en producción, en Afganistán la granada roja se ha mencionado como opción de uso de tierras dedicadas al cultivo de amapola. En el continente americano la granada se produce en los EUA y México, y existen plantaciones jóvenes en Chile y Argentina. El estado de California produce granada roja para el mercado domestico y con pequeños volúmenes exportados a México y Brasil desde el año 2001, aun cuando la planta se adapta también al sur de Texas y Florida (Agustí, 2004, Mondragón y Juárez, 2008).

En California, la cosecha comienza a mediados del mes de Septiembre, época en la cual la fruta alcanza las características mínimas de maduración; acidez menor a 1.85% y color rojo del grano similar o más oscuro 5 R-5/12 de la carta de color de Munsell (Salaheddin y Kader, 1984).

El árbol es poco exigente en suelos y con crecimiento algo lento; son primordialmente de temperaturas cálidas y subtropicales aunque naturalmente se adaptan a regiones con frío invernal o semiáridas. La granada es resistente a la sequía pero no al frío intenso (-11.11° C) (Morton, 1987).

La producción en México de granada roja es muy escasa; para el 2005 alcanzó un volumen de 3050 toneladas obtenidas en una superficie de 292 hectáreas, siendo los estados de Hidalgo y Guanajuato los que aportaron el 72% de la producción.

La naturaleza no climatérica de este fruto trae una problemática también particular para la cosecha de los mismos, pues aunque el color externo es un índice de cosecha, el fruto cortado no madurará más. Aunado a dicho problema existe una alta incidencia de partido de frutos que se asocia a heterogeneidad en las prácticas de cultivos (riegos inadecuados o exceso de lluvia en el periodo de maduración) y aplicación excesiva de nitrógeno lo cual propicia alto nivel de pérdidas en el

mercado fresco que los mismos productores han canalizado al desgranado sin una adecuada tecnología para su manejo (Mercado y col., 2007).

En el municipio de Apaseo El Alto, Guanajuato, los productores de granada roja cuentan con una experiencia de más de 30 años en el manejo, selección y explotación de este fruto (López, 2007) que les ha permitido incursionar en el mercado nacional, cubriendo la demanda de la industria restaurantera en los meses de Agosto y Septiembre. La tecnología de producción es tradicional, susceptible a mejorarse y al respecto se cuenta ya con el primer paquete tecnológico generado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, el cual fue diseñado con la idea de impulsar este cultivo (Mondragón y Juárez, 2008) Queda pendiente la difusión de los beneficios del consumo de granada como fruta fresca y sus derivados entre el público en general, lo cual generaría más interés en su consumo y consolidaría la demanda, con un beneficio directo a los productores.

II.2.4 Clasificación agronómica.

Las variedades de granada en cultivo son muy numerosas, sin embargo, se carece de una clasificación tipificada de las mismas que no sean la de grupos de características similares, su época y origen de recolección del cultivo.

En EUA, las principales variedades en cultivo son de fruto de gran tamaño como Wonderful, de alto rendimiento en semilla, Paper Shell, muy dulce, Spanish Ruby, de semilla roja y Purple Seeded, de semillas muy rojas (Agustí, 2004).

En México, se encuentran numerosas variedades criollas pero la más conocida en el comercio se obtiene del municipio de Apaseo El Alto, Gto., la cual en este trabajo se reporta como "Apaseo EA". Otra variedad que comparte numerosos caracteres con "Apaseo EA" es "Tecozaotla", producida en el municipio del mismo nombre ubicado en el estado de Hidalgo. Ambos genotipos se encuentran en proceso de registro por parte del INIFAP con el fin de protegerlos de la utilización indiscriminada.

II.2.5 Composición Química.

El fruto de granada presenta un bajo contenido calórico, debido a su escaso contenido de carbohidratos, entre los cuales se encuentran de manera importante la glucosa y la fructosa. El componente mayoritario es el agua y en lo que se refiere a otros nutrientes, tan sólo destaca su aporte mineral de potasio. Otros componentes destacables son el ácido cítrico y el ácido málico (Cuadro 1) (Salaheddin y Kader, 1984; Lansky, 2007).

Cuadro 1. Composición nutrimental de fruto del granado (100 g) (USDA, 2007)

Fracción	Contenido
Agua	80.97 g
Contenido energético	68 kcal
Proteínas	0.095 g
Lípidos totales	0.3 g
Carbohidratos	17.17 g
Azúcar total	16.57 g
Fierro (Fe)	0.3 mg
Zinc (Zn)	0.12 mg
Potasio (K)	259 mg
Sodio (Na)	3 mg
Cobre (Cu)	0.07 mg

El jugo de granada, contiene compuestos químicos importantes que se han relacionado con beneficios a la salud; debido a su capacidad antioxidante, dentro de dichos compuestos se encuentran las antocianinas y los flavonoides, los cuales además le proporcionan color a la fruta (Morton, 1987; Lansky, 2007).

La capacidad antioxidante del jugo de granada roja obtenido por diversos procesos ha sido evaluada utilizando cuatro diferentes métodos; ABTS, DPPH, DMPD y

FRAP, dichas actividades fueron mayores a las presentadas por una muestra de vino tinto comercial y por una infusión de té verde (Gil y col., 2000), los cuales han sido ampliamente recomendados por su capacidad antioxidante (Ceriello y col., 2001; Juśkiewicz y col., 2008; Büyükbalci y El., 2008; Kishore y col., 2009). Durante la elaboración del jugo se utilizaron muestras de arilos congelados, dicho proceso afectó la capacidad antioxidante de éste. Por otro lado, algunas muestras fueron procesadas industrialmente mostrando la mayor capacidad antioxidante de todos los tratamientos, lo que se atribuye a la extracción de algunos de los taninos hidrolizables presentes en la corteza de la fruta (Figura 4).

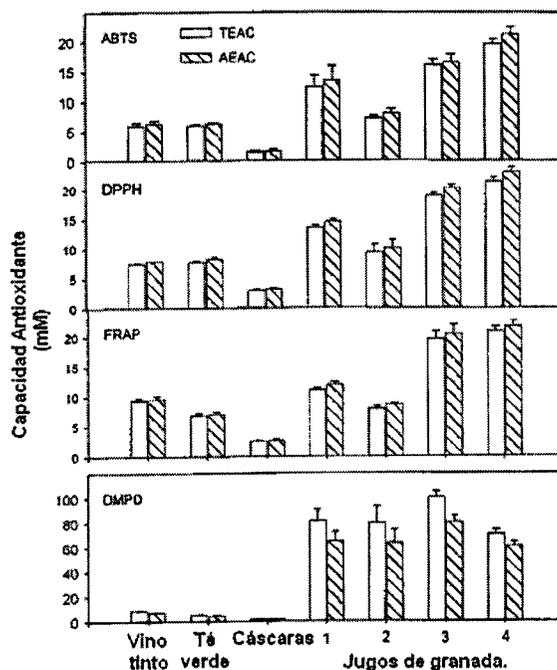


Figura 4. Capacidad antioxidante *in vitro* en jugos de granada roja comparada con las de vino tinto, té verde y el extracto acuoso de las cáscaras de la fruta evaluada por los métodos ABTS, DPPH, FRAP y DMPD (Adaptado de Gil y col., 2000).

Dentro de los compuestos fenólicos del jugo de granada se tiene a: las antocianinas, los taninos tipo galagil (punicalaginas), los derivados del ácido elálgico y los taninos hidrolizables (Cuadro 2).

Cuadro 2. Compuestos fenólicos identificados en dos tipos de jugo de diferentes presentaciones de granada roja (Adaptado de Gil y col., 2000).

Compuestos fenólicos	Jugo de arilos frescos(1)	Jugo de arilos congelados(2)
<i>Primer grupo:</i>		
<i>Antocianinas</i>		
Delfinidina 3,5-diglucósido	42.9	38.8
Cianidina 3,5- diglucósido	53.0	46.4
Delfinidina 3-glucósido	76.0	23.6
Cianidina 3-glucósido	128.3	59.5
Pelargonidina 3-glucósido	5.9	3.9
Antocianinas totales	306	172.2
<i>Segundo grupo:</i>		
<i>Taninos tipo galagil</i>		
Punicalagina B	12.7	14.4
Punicalagina D	10.1	11.1
Otros	45.1	102.5
Taninos tipo galagil totales	67.9	128.1
<i>Tercer grupo:</i>		
<i>Derivados del ácido elálgico.</i>		
Ácido elálgico glucósido	17.9	17.9
Ácido elálgico	15.3	8.7
Derivados del ácido elálgico totales	33.2	26.5
<i>Cuarto grupo:</i>		
<i>Otros taninos hidrolizables.</i>		
Galoil glucosa	51.1	43.9
Compuesto C	224.5	203.6
Otros compuestos	264.1	277.7
Taninos hidrolizables totales	539.2	525.2

En la medicina tradicional la granada roja se utiliza como: astringente, antitusígeno, antidiarreico, antihipertensivo, vermífugo, diurético, contra la fiebre, cólicos, combatir el colesterol y la arteriosclerosis (Agustí, 2004).

Debido a que la hiperglucemia postprandial juega un papel importante en el desarrollo de diabetes tipo 2 y en las complicaciones asociadas a esta enfermedad, tales como, las enfermedades cardiovasculares, se ha recomendado el consumo de alimentos con capacidad de disminuir glicemia postprandial, los cuales mejorarían el control de la diabetes y sus complicaciones. La administración oral de un extracto etanólico de flores de granada a ratas Zucker obesas, disminuye de manera importante sus niveles de glucosa en condiciones de alimentación y dicho efecto está relacionado con la capacidad del extracto para inhibir a la enzima intestinal α -glucosidasa (Li y col., 2005).

Recientemente las investigaciones se han enfocado a determinar el efecto y mecanismo de acción de extractos metanólicos (w/v) de las flores de granada roja en el metabolismo lipídico, y se reportó que el blanco de estos compuestos son los receptores activadores de peroxisomas (PPAR- γ) (Huang y col., 2005a), la activación de estas proteínas ha sido utilizada en el tratamiento de la diabetes tipo 2, al mejorar la sensibilidad de los receptores de insulina, en otro estudio se evaluó un extracto metanólico de flores de granada en ratas Zucker delgadas y obesas encontrando actividad similar al ácido gálico (Huang y col., 2005b).

Con respecto al jugo de granada, se han realizado estudios con pacientes diabéticos tratados durante tres meses con un jugo diluido 1:5 y se demostró que la concentración del colesterol total y LDL en los pacientes tratados fueron similares a los niveles mostrados en el grupo control sano (Cuadro 3). Eventualmente se encontró que el consumo de jugo de granada en ese grupo específico de pacientes, no empeoró los parámetros diabéticos, pero dio lugar a efectos antioxidantes sobre el suero y los macrófagos, que podrían contribuir a la atenuación del desarrollo de aterosclerosis (Rosenblat y col., 2006).

Cuadro 3. Perfil lipídico sérico en sujetos sanos (grupo control), así como en pacientes diabéticos antes y después del consumo de jugo de granada (Adaptado de Rosenblat y col., 2006).

Parámetros	Grupo Control	Pacientes diabéticos antes del consumo de jugo de granada	Pacientes diabéticos después del consumo de jugo de granada.
Triglicéridos (mg%)	115 ± 25	327 ± 79*	302 ± 64
Colesterol total (mg%)	190 ± 9	203 ± 13	193 ± 10
Colesterol-LDL (mg%)	111 ± 10	112 ± 8	110 ± 8
Colesterol-HDL (mg%)	56 ± 3	39 ± 3	41 ± 3*

Los resultados señalados muestran ± error estándar de la media (SEM) *p<0.01 contra los controles.

Por otro lado, también se evaluó el jugo de granada concentrado (JGC) en una dosis de 40 g al día en pacientes diabéticos tipo II con hiperlipidemia por ocho semanas mostrando una reducción significativa en colesterol total, la relación LDL/HDL y la relación colesterol total/HDL. En cambio, esto no sucedió en concentraciones séricas de triglicéridos y HDL. Al tomar en cuenta otros factores (índices antropométricos, actividad física, clases y dosis de agentes orales hipoglucémicos; así como, el tipo de alimentación) se concluyó que el consumo de CPJ puede modificar factores de riesgo de la enfermedad cardíaca en pacientes hiperlipidémicos y su inclusión, por lo tanto, en sus dietas puede ser benéfica (Esmailzadeh y col., 2004).

En base a lo anteriormente expuesto, se propone que las nuevas selecciones (Apaseo EA y Tecozautla) de granada pudieran tener efectos similares o superiores a los jugos de granadas comerciales con respecto al control de la diabetes debido a que comparten numerosos caracteres.

III. HIPÓTESIS.

El jugo de granada roja de las variedades Apaseo EA y Tecozautla tiene efectos benéficos en el perfil de lípidos y concentración de glucosa en ratas diabéticas inducidas químicamente con estreptozotocina (STZ).

IV. OBJETIVOS.

IV.1 General.

Evaluar los compuestos fenólicos del jugo de tres variedades de granada roja y su efecto sobre los niveles de glucosa y perfil lipídico en ratas sanas y diabéticas inducidas químicamente con estreptozotocina.

IV.2 Específicos.

- Cuantificar parámetros de pH, sólidos solubles totales (SST) y color del jugo de granada roja.
- Determinar la concentración de antocianinas, flavonoides, fenoles totales y capacidad antioxidante *in vitro* en el jugo de granada roja.
- Evaluar el efecto del consumo de dos variedades de jugo de granada roja sobre los niveles de glucosa y perfil lipídico en ratas sanas y diabéticas.

V. METODOLOGÍA.

V.1 Materiales.

V.1.1 Material químico.

- Estreptozotocina (STZ) mínimo 98% HPLC de la marca SIGMA-ALDRICH para la inducción química de diabetes en ratas de experimentación.
- Tiras reactivas marca Accucheck para la determinación de glucosa sanguínea.
- Kits enzimáticos de la marca Randox Laboratories para la determinación de triglicéridos, colesterol y HDL en suero.

V.1.2 Material biológico.

V.1.2.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas macho Wistar cuyo peso corporal comprendió entre 250 y 330 g del bioterio del CINVESTAV-México y se sometieron a un periodo de adaptación de una semana bajo condiciones de ciclos de luz/obscuridad (12:12 h.), temperatura y humedad controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ y $55 \pm 15\%$, respectivamente) teniendo acceso a comida, agua o dilución del jugo *ad libitum* durante todo el estudio experimental.

V.1.2.2 Granada roja.

Las muestras de granada roja nacional se recolectaron de huertas comerciales en Apaseo El Alto, Gto. y Tecozautla, Hgo. en el mes de Agosto de 2006, la muestra de granada de importación (variedad Wonderful) fue obtenida de un supermercado local en Diciembre del mismo año. En ambos casos se obtuvieron frutas frescas en

estado de madurez de consumo, que se almacenaron en cámaras de refrigeración a 4°C en bolsas de polietileno negras hasta su posterior análisis químico.

La fruta de la variedad Apaseo EA recolectada en el mes de Agosto se denominó primera cosecha (EA1), así mismo la recolectada en el mes de Septiembre fue la segunda cosecha (EA2) y la recolectada en el mes de Noviembre fue la tercera cosecha (EA3). Por lo anterior, el suministro del jugo de dicha variedad siguió el mismo orden.

Todas las muestras de granada fueron proporcionadas por el Programa de Nopal y Frutales del Campo Experimental Bajío ubicado en Celaya, Gto., del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

V.2 Métodos.

V.2.1 Elaboración del jugo de granada roja.

El jugo de granada roja se preparó utilizando los granos del fruto fresco que se molieron en un extractor. El jugo obtenido se filtró para eliminar el bagazo residual y se utilizó tanto para los análisis químicos como para el estudio *in vivo*. El jugo se conservó en frascos ámbar y en congelación (-20°C).

V.2.2 Determinaciones en el jugo de granada roja.

V.2.2.1 Cuantificación de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotungstico y ácido fosfomolibdico, reducida por acción

de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida absorbe a una longitud de onda de 764 nm.

La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de ácido gálico (0 a 20 µg) como estándar. Se pesó 1 g de jugo de granada, se disolvió en 10 mL de metanol y se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. De esta solución se tomó 40 µL para llevarlo a un volumen de 2 mL. Posteriormente se tomó 20 µL de esta muestra y su respectivo blanco (agua).

Ambas muestras se mezclaron con 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N) adicionando 1.250 mL de Na₂CO₃ (20%) y se dejó reposar en la obscuridad por 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia a 730 nm. El valor obtenido de la muestra se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (AG) por L de jugo (mg equivalentes AG/L muestra).

V.2.2.3 Cuantificación de antocianinas.

La determinación de antocianinas totales se realizó en el jugo de granada roja siguiendo el método recomendado por Abdel-Aal y Hucl (1999).

En un vaso de precipitado de 50 mL se colocaron 0.5 g de jugo y se adicionó 4 mL de etanol acidificado (85 mL de etanol al 95% + 15 mL de HCl 1N); mezclándose fuertemente, en forma manual, durante 2 minutos y se ajustó el pH a 1.0 con HCl (dilución 1:1 HCl concentrado:agua). Posteriormente se centrifugó durante 20 minutos a 10,000 rpm y el sobrenadante se ajustó a un volumen de 10 mL.

Una vez realizado lo anterior, se leyó la absorbancia (Espectrofotómetro UV-Visible, SmartSpec™ Plus, BIO RAD) a 535 nm, realizando previamente un barrido para obtener el espectro de absorbancia, en un rango de 400-600 nm.

El valor de la absorbancia obtenido a 535 nm se sustituyó en la fórmula:

$$C = (A/\epsilon) \times (VT/1000) \times MW \times (1/PM) \times 10^6$$

que, bajo las condiciones de estudio, la fórmula puede simplificarse en :

$$C = A \times 228.21 \text{ mg/kg}$$

donde C=concentración total de antocianinas (mg/kg) o miligramos equivalentes de cianidina 3-glucósido/L de muestra, A=lectura de absorbancia a 535 nm, ϵ =coeficiente de absortividad molar (cianidina 3-glucósido=25965 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), VT=volumen total del extracto de antocianinas, MW=Peso molecular de la cianidina 3-glucósido=449, PM=peso de la muestra.

VI.2.2.3 Cuantificación de flavonoides totales.

El contenido de flavonoides totales se determinó usando un método colorimétrico (Gutiérrez y col., 2000). La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de (+)-catequina como estándar. Se mezclaron 1250 μL de agua HPLC con diferentes volúmenes de la solución inicial (1mg/mL etanol) de (+)-catequina (0, 20, 40, 60, 80, 100), se agregó 75 μL de NaNO_2 al 5%, se mezcló y se dejó reposar durante 6 minutos, posteriormente se adicionó 150 μL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10%, se mezcló y se dejó reposar durante 5 minutos, finalmente se agregó 500 μL de NaOH 1 M, ajustando el volumen a 2.5 mL para leer inmediatamente la absorbancia a 510 nm contra el blanco (Espectrofotómetro UV-Visible, SmartSpecTM Plus, BIO RAD).

Para las muestras problema, se tomaron 100 μL y se añadieron las mismas cantidades mencionadas en el párrafo anterior, ajustando el volumen a 2.5 mL bajo

las mismas condiciones de lectura. El valor obtenido de la muestra se expresó como mg equivalentes de (+)-catequina/mL de muestra.

V.2.2.4 Capacidad antioxidante *in vitro*.

Este método evalúa la capacidad antioxidante *in vitro* expresada como equivalentes del ácido (+/-)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetramil-croman-2-carboxílico (trolox), tanto de compuestos puros como de materiales biológicos (Mariken y col., 2004). Este método se basa en la capacidad del compuesto antioxidante a estudiar de atrapar radicales del compuesto ABTS (2,2'-azinosbis-(2-aminodinopropano-HCl). El radical libre se produce mediante la reacción de ABTS con persulfato de potasio, generando el radical ABTS*.

Para esta determinación se utilizó una curva estándar de trolox, preparado en etanol. Se pesó 1 g de jugo el cual se agitó con 10 mL de metanol durante 24 h a temperatura ambiente. Obtenido el extracto metanólico, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos, del sobrenadante se tomó 10 μ L y se agregaron 990 μ L de la solución con el radical ABTS* con una $A_{734\text{nm}}$ de 0.7.

La absorbancia se obtuvo después de realizar diluciones previas de la solución preparada con ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2.5 mM con solución amortiguadora de fosfatos salino (PBS) 0.2 M, pH 7.4. La solución del radical ABTS* con la muestra tuvo una absorbancia a 734 nm después de 6 minutos, a partir de la cual se obtendrá el valor de TEAC para el extracto del fruto. El valor TEAC es el indicador de la capacidad antioxidante de una muestra en relación al trolox y se calculará de la siguiente manera:

$$\text{TEAC}_{\text{muestra}} = A_{\text{muestra}} / [m + A_{\text{muestra}}]$$

Donde A_{muestra} es la absorbancia de la muestra a 734 nm a los 6 minutos de reacción y m es la pendiente de la curva estándar de trolox.

V.2.3 Evaluación del efecto del jugo de granada roja sobre los niveles de glucosa y lípidos en ratas diabéticas.

V.2.3.1 Inducción de diabetes con estreptozotocina (STZ).

Para la inducción química de diabetes se utilizó estreptozotocina (STZ) a una dosis de 45 mg/kg de peso corporal; administrada por vía intraperitoneal a ratas con 15 h. de ayuno.

La estreptozotocina se preparó minutos antes de la inducción disolviendo en una solución amortiguadora de citratos 0.1 M a pH 4.5.

Cinco días posteriores a la inducción se determinaron los niveles de glucosa en sangre tras un ayuno de 8 h. Aquellas ratas que mostraron valores arriba de 180 mg/dL fueron consideradas diabéticas y se incluyeron en el estudio.

V.2.3.2 Determinación de glucosa sanguínea en ayuno.

El nivel de glucosa se cuantificó en muestras de sangre obtenidas de la vena caudal de los animales de experimentación, con un ayuno mínimo de 8 h. Se utilizaron tiras reactivas de la marca ACCU-CHECK y un glucómetro de la marca Roche, con una sensibilidad de 10-600 mg/dL de glucosa para llevar a cabo la determinación.

V.2.3.3 Estudio experimental.

En este estudio se manejaron grupos de experimentación conformados por ratas sanas y diabéticas, las cuales se trataron con diferentes variedades y dosis de jugo de granada (2.5 y 5%). Además, se consideró un grupo control de ratas sanas y diabéticas.

El Cuadro 4 muestra las dosis a administrar a los diferentes grupos de experimentación. El jugo de granada se administró en el agua de consumo diario durante tres semanas. Durante este periodo de tiempo, se determinó diariamente tanto el consumo de alimento como el consumo de agua o jugo diluido (2.5 y 5%). Cada semana se determinaron los niveles de glucosa sanguínea en ayuno así como la ganancia de peso de cada grupo experimental. Al término del tiempo de estudio se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca, la cual se centrifugó a 10000 rpm por 10 min. para la obtención de sueros, los cuales se congelaron a -20 ° C hasta su uso.

Cuadro 4. Evaluación del efecto del jugo de granada roja sobre los niveles séricos de glucosa y lípidos en ratas diabéticas

Grupo	Ratas	Población (n)	Tratamiento
1	Sanas	5	Ninguno (Control Sano)
2	Sanas	5	Wonderful al 5%
3	Sanas	5	Apaseo EA al 5%
4	Sanas	5	Tecoautla al 5%
5	Diabéticas	7	Ninguno (Control Diabético)
6	Diabéticas	7	Wonderful al 5%
7	Diabéticas	7	Apaseo EA al 2.5 %
8	Diabéticas	7	Apaseo EA al 5%
9	Diabéticas	7	Tecoautla al 2.5%
10	Diabéticas	7	Tecoautla al 5%

V.2.3.4 Determinación de triglicéridos, colesterol total y HDL en suero.

Para la cuantificación de triglicéridos, colesterol y HDL se utilizaron kits enzimáticos comerciales de la marca Randox Laboratories. Las determinaciones se realizaron en muestras de suero de los animales de experimentación (Anexo 1).

V.2.3.5 Análisis estadístico.

Los resultados de las determinaciones de: pH y sólidos solubles totales, parámetros de color y fenoles totales junto con capacidad antioxidante *in Vitro* fueron reportados como la media \pm desviación estándar (DE). Por otro lado, los resultados de los estudios *in vivo* fueron reportados como la media \pm error estándar de la media (SEM). Se utilizó el estadístico mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 90 y 95%, posteriormente se determinó la diferencia entre los tratamientos mediante la comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer y la comparación de medias de cada tratamiento con su grupo control, por la prueba de Dunnet. Los datos se analizaron con el paquete estadístico JMP 5.0.1. y Sigma Stat 3.5.

VI. RESULTADOS.

VI.1 Parámetros físicos y químicos del jugo de granada roja.

VI.1.1 Determinaciones de pH y sólidos solubles totales.

Los jugos de granada roja fueron evaluados con respecto al pH y sólidos solubles totales (SST), los cuales son parámetros utilizados para cuantificar la acidez y el porcentaje de azúcares contenidos en una muestra, respectivamente. En el Cuadro 5 se muestra que el jugo de la variedad Tecozautla presentó el valor más alto de pH (3.45); mientras que la variedad Wonderful y Apaseo EA primera cosecha (EA1) muestran el más bajo (alrededor de 2.80). Así mismo, se muestra que el pH incrementa en el jugo conforme pasa el tiempo de cosecha. Con respecto a los SST, el mayor porcentaje de azúcares corresponde a la variedad Apaseo EA tercera cosecha (EA3) (16.41°Bx) y la menor concentración la presenta la variedad Wonderful (13.7°Bx).

Cuadro 5. Comparación de los niveles de pH y SST en las diferentes variedades de granada roja en estudio.

Variedad	pH	SST (°Bx)
Apaseo EA (primera cosecha)	2.80 ± 0.01 ^c	14.36 ± 0.12 ^b
Apaseo EA (tercera cosecha)	3.03 ± 0.03 ^b	16.41 ± 0.16 ^a
Tecozautla	3.45 ± 0.01 ^a	15.66 ± 0.09 ^a
Wonderful	2.79 ± 0.03 ^c	13.70 ± 0.11 ^c

Valores con la misma letra en la misma columna no tienen diferencia significativa ($p < 0.05$) (Prueba de Tukey-Kramer). Datos expresados como media ± desviación estándar.

VI.1.2 Determinación de parámetros de color.

Al jugo de granada roja se le determinó en un colorímetro (Minolta TR2002 Software: Spectral Magic versión 1.01) las tres coordenadas cartesianas cilíndricas L*(luminosidad), a* y b*. Estas últimas se usaron para el cálculo de los parámetros de correlación de intensidad (chroma, C*) y correlación de la tonalidad cromática (hue, h) con las ecuaciones correspondientes, caracterizando el color. En el Cuadro 6 se muestra que el jugo de la variedad EA3 presenta el valor más alto de luminosidad (29.47), a*(11.79) y C*(11.81); mientras que, la variedad Wonderful los más bajos L* (22.30), a*(2.26) y C*(2.36). Así mismo, se muestra que para la variedad Apaseo EA dichos parámetros incrementan en el jugo conforme pasa el tiempo de cosecha. Contrariamente, EA1 muestra los valores más bajos de b* y de h. Estos datos nos sugieren que el jugo de Apaseo EA es la muestra con tonalidad más roja (debido a que valores positivos de a* pertenecen a tonalidades rojas) y luminosa comparada con el resto de las muestras.

Cuadro 6. Determinación de color en las diferentes variedades de granada roja en estudio.

Variedad	L*	a*	b*	C*	h
Apaseo EA (primera cosecha)	28.47±0.42 ^b	9.83±0.98 ^a	0.26±0.41 ^b	9.83±0.99 ^a	1.52±0.12 ^b
Apaseo EA (tercera cosecha)	29.47±0.13 ^a	11.79±0.16 ^a	0.55±0.11 ^b	11.81±0.16 ^a	2.69±0.52 ^b
Tecozautla	26.61±0.93 ^b	6.90±0.54 ^b	1.65±0.18 ^a	7.09±0.56 ^b	13.45±0.40 ^a
Wonderful	22.30±0.28 ^c	2.26±0.33 ^c	0.67±0.16 ^b	2.36±0.05 ^c	16.51±1.61 ^a

Donde $h = \tan^{-1}(b^*/a^*)$, $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ (Martí y col., 2001)

Valores con la misma letra en la misma columna no tienen diferencia significativa ($p < 0.05$) (Prueba de Tukey-Kramer). Datos expresados como media \pm desviación estándar.

VI.2 Cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante *in vitro*.

Se determinó la concentración de fenoles totales (Cuadro 7) encontrando que la variedad Wonderful tuvo el valor más alto de dicho parámetro (3601.66 mg eq. AG/L de muestra), de flavonoides (5.19 mg eq. catequina/mL de muestra), de antocianinas (425.02 mg eq. C3G/L de muestra) y de capacidad antioxidante (20.96 mM eq. trolox). Mientras que Tecozautla muestra el valor más bajo de fenoles totales (188.43 mg eq. AG/L de muestra); no así, un valor de antocianinas (172.23 mg eq. C3G/L de muestra) cercano al de EA3 (172.06 mg eq. C3G/L de muestra). La variedad EA3, mostró el menor valor de flavonoides (1.82 mg eq. catequina/mL de muestra) y capacidad antioxidante (9.13 mM eq. trolox). Estos datos sugieren que el jugo de la variedad Wonderful es la muestra que tiene mayor actividad antioxidante y, por consiguiente, se espera que sea el que reduzca en la misma magnitud el estrés oxidativo, reforzando los mecanismos antioxidantes endógenos junto con efectos benéficos en el control de la diabetes.

Cuadro 7. Comparación entre las determinaciones de fenoles totales, flavonoides totales, antocianinas y capacidad antioxidante *in vitro* en las diferentes variedades de granada roja en estudio.

Variedad.	Fenoles totales (mg eq. AG/L de muestra).	Flavonoides totales (mg eq. catequina/mL de muestra).	Antocianinas (mg eq. C3G/L de muestra).	Capacidad Antioxidante (mM eq. trolox)
Apaseo EA (tercera cosecha)	2212.77±0.14 ^b	1.82±0.06 ^a	172.06±3.18 ^b	9.13±0.67 ^c
Tecozautla	188.43±0.23 ^c	2.08±0.05 ^b	172.23±2.94 ^b	16.10±0.52 ^b
Wonderful	3601.66±0.11 ^a	5.19±0.29 ^b	425.02±28.81 ^a	20.96±0.23 ^a

C3-G = Cianidina-3-glucósido, AG = ácido gálico. Datos expresados como media ± desviación estándar. Valores con la misma letra en la misma columna no tienen diferencia significativa ($p < 0.05$). (Prueba de Tukey-Kramer).

VI.3 Estudios *in vivo*.

Para determinar el efecto del jugo de granada roja sobre los niveles de glucosa y lípidos se realizaron los estudios *in vivo*. La Figura 5 muestra las concentraciones de glucosa con respecto al tiempo de tratamiento de las ratas sanas, observándose que los animales que consumieron jugo de granada de la variedad Wonderful y Tecozautla presentaron mayores niveles de glucosa comparados con el control, hasta un 41% a la tercera semana. Con respecto a los animales diabéticos se observó un efecto muy similar incrementándose la glucosa sanguínea hasta en un 16% para los animales alimentados con jugo al 5% de la variedad Apaseo EA para la segunda semana (Figura 6). Mientras que en la tercera semana de tratamiento hubo un incremento en los niveles de glucosa sanguínea del 25% con la variedad Wonderful al 2.5%. Así mismo, un incremento del 21% para la variedad Apaseo EA al 5% y de 25% para Tecozautla al 5% (Figura 6).

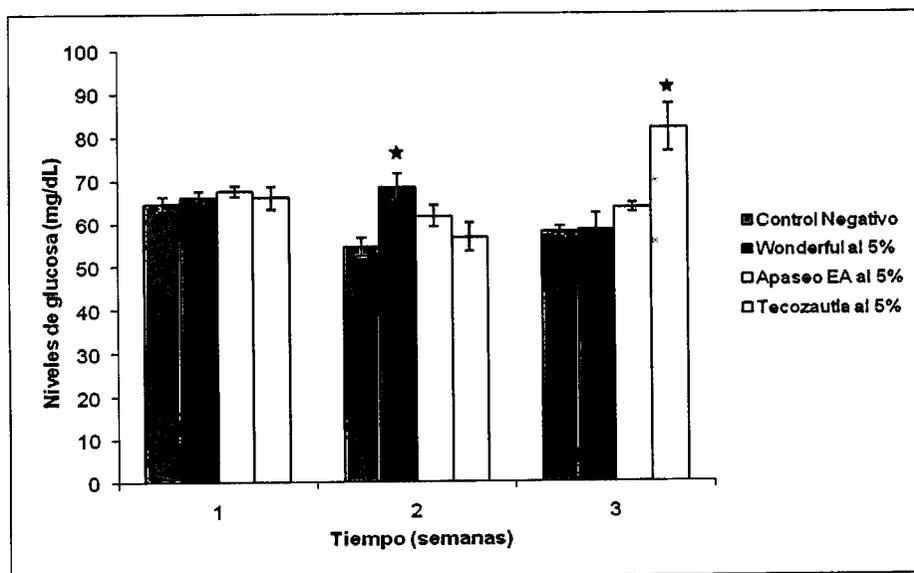


Figura 5. Niveles de glucosa en ratas sanas tratadas con el jugo de granada roja (5%).

Los datos son presentados como la concentración de glucosa \pm error estándar de la media (SEM). ★Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

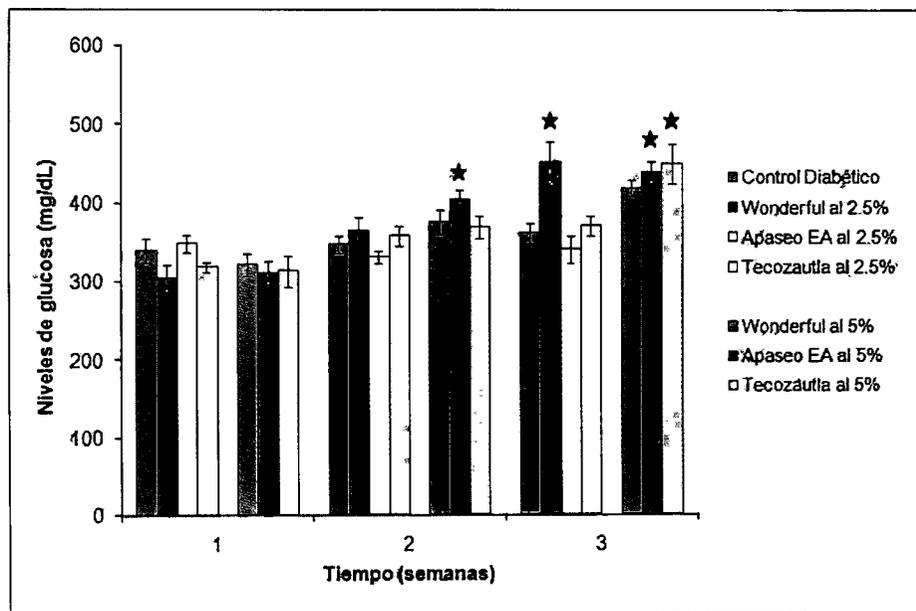


Figura 6. Niveles de glucosa en ratas diabéticas tratadas con el jugo de granada roja (2.5% y 5%).

Los datos son presentados como la concentración de glucosa \pm error estándar de la media (SEM). ★Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

El Cuadro 8 muestra los datos del peso corporal con respecto al tiempo de tratamiento de todos los grupos de experimentación, no observándose diferencia significativa utilizando la prueba de Dunnet. Cabe señalar, que a medida que avanzó el tratamiento las ratas sanas, tanto control como tratadas incrementaron el peso corporal, mientras que, las ratas diabéticas presentaron un decremento del mismo parámetro, sin observarse una diferencia estadísticamente significativa de los tratamientos con respecto al control.

Cuadro 8. Peso corporal de las ratas sanas y diabéticas tratadas con el jugo de granada roja.

Variedad	Tiempo (semanas)			
	0	1	2	3
Control Sano	336.66±1.85	363.18±2.00	384.64±3.81	392.26±5.82
Wonderful al 5% Sano	335.94±5.86	361.40±6.29	381.94±7.58	392.30±8.71
Apaseo EA al 5% Sano	325.70±3.82	355.88±6.79	381.96±10.3	391.26±8.63
Tecozautla al 5% Sano	328.44±3.55	355.44±5.71	373.82±8.26	374.38±8.66
Control Diabético	278.13±8.08	253.46±5.03	241.05±4.47	236.17±5.51
Wonderful al 2.5% Diabético	286.67±2.81	253.11±8.84	222.10±12.3	234.70±14.4
Apaseo EA al 2.5% Diabético	286.69±8.95	268.73±11.4	249.79±12.4	250.53±16.1
Tecozautla al 2.5% Diabético	285.87±3.31	267.71±6.79	253.50±6.34	256.39±5.83
Wonderful al 5% Diabético	283.24±6.60	252.14±5.11	250.58±5.42	243.73±9.54
Apaseo EA al 5% Diabético	294.34±4.46	265.33±5.94	353.90±9.51	249.90±11.3
Tecozautla al 5% Diabético	290.89±3.87	260.77±7.00	241.16±9.12	250.47±9.10

Los datos son presentados como la peso corporal ± error estándar de la media (SEM).

La Figura 7 muestra el consumo de alimento de ratas sanas con respecto a las semanas de experimentación. Los animales que consumieron jugo de las diferentes variedades de granada roja presentaron el mismo consumo de alimento que el grupo control.

Por otro lado, los resultados observados en el consumo de alimento con respecto al tiempo de tratamiento para las ratas diabéticas (Figura 8) muestran que en la primera semana el grupo tratado con la variedad Wonderful al 5% presentó una disminución del 13% con respecto al grupo control. En la segunda semana el grupo tratado con la variedad Wonderful al 2.5% presentó una disminución importante del 18% comparado con el control. Mientras que para la tercera semana, todos los grupos alimentados con las diferentes variedades disminuyeron dicho consumo, mostrando un decremento estadísticamente significativo desde un 14% (Apaseo EA al 5%) hasta del 24% (Wonderful al 5%) respecto al grupo control.

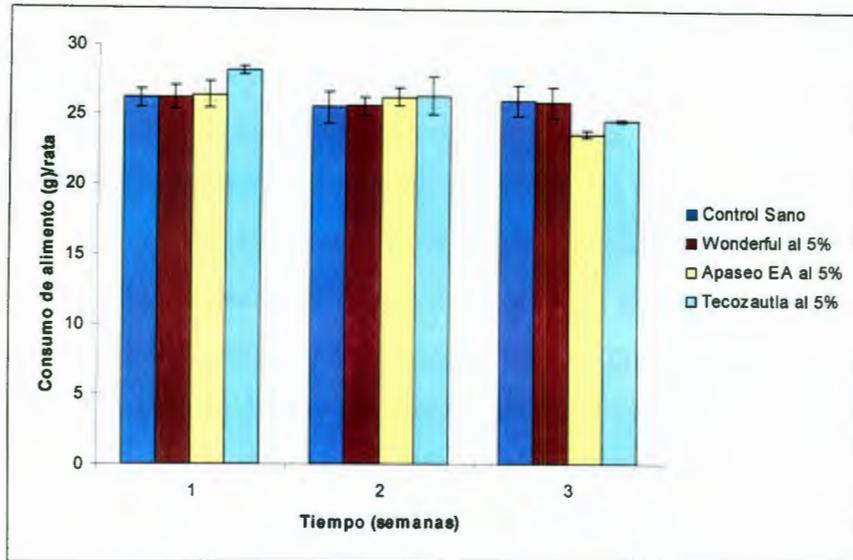


Figura 7. Consumo de alimento en ratas sanas tratadas con el jugo de granada roja (5%).

Los datos son presentados como la cantidad de alimento consumida \pm error estándar de la media (SEM).

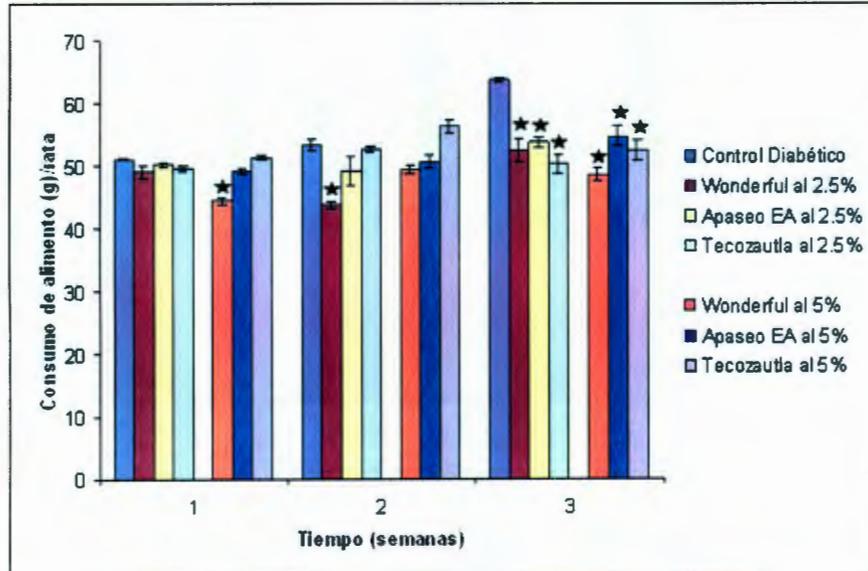


Figura 8. Consumo de alimento en ratas diabéticas tratadas con el jugo de granada roja (2.5% y 5%).

Los datos son presentados como la cantidad de alimento consumida \pm error estándar de la media (SEM). ★Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

La Figura 10 muestra los resultados observados para el consumo de agua o jugo para las ratas diabéticas con respecto al tiempo de tratamiento. Contrario a lo presentado por los animales sanos, los diabéticos tratados con jugo de granada consumieron menor cantidad de líquido, en su mayoría a la segunda y tercer semana de tratamiento. Los grupos que presentaron un aumento estadísticamente significativo en la primera semana fueron Apaseo al 2.5% (24%), Tecozautla al 2.5% (25%), Wonderful al 5% y Apaseo EA al 5% (9% y 10%, respectivamente). En la segunda semana el grupo tratado con la variedad Wonderful al 2.5% disminuyó significativamente este valor, hasta en un 52% y Apaseo EA al 2.5% en un 35% con respecto al grupo control. Así mismo, a la tercer semana, los grupos que mostraron diferencia significativa fue la variedad Wonderful al 2.5% que disminuyó en un 36%, un 46% para la variedad Apaseo EA al 2.5%, un 10% para Apaseo EA al 5% y Tecozautla al 5% en un 21% con respecto al grupo control.

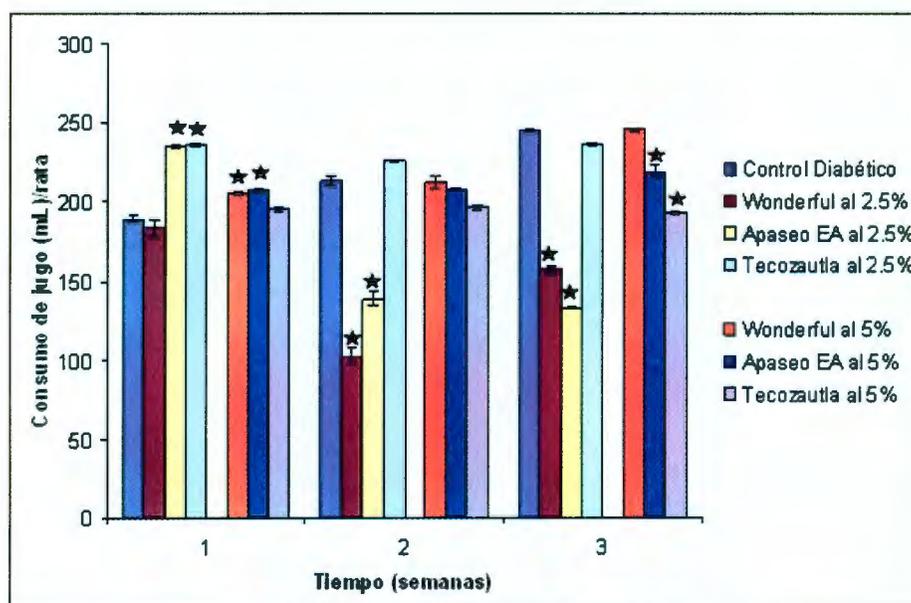


Figura 10. Consumo de agua o jugo en ratas diabéticas tratadas con el jugo de granada roja (2.5% y 5%).

Los datos son presentados como el volumen de agua o jugo consumido \pm error estándar de la media (SEM). ★ Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

Los resultados de la Figura 11 presentan los niveles de triglicéridos séricos después del periodo de experimentación, mostrando en las ratas sanas, un aumento significativo con respecto al grupo control con la variedad Wonderful al 5% (18%) y una disminución significativa para la variedad Tecozautla al 5% con respecto al grupo control en un 46%.

Mientras que en el caso de las ratas diabéticas, los valores aumentaron en un 29% para la variedad Wonderful al 2.5%, en un 38% en la variedad Apaseo EA al 2.5% y en un 53% para la variedad Wonderful en la dilución al 5%, todas respecto al grupo control. Por otro lado, las variedades que mostraron una disminución significativa, respecto al grupo control fueron Tecozautla al 2.5% con un 17%, Tecozautla al 5% con un 28% y Apaseo EA al 5% en un 39%.

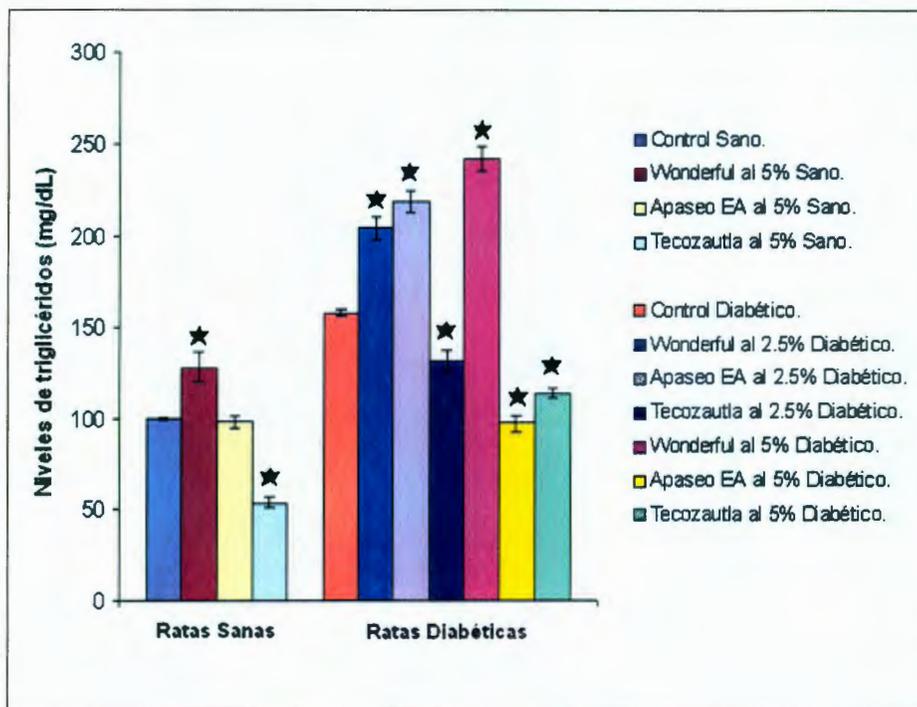


Figura 11. Niveles de triglicéridos en suero de animales sanos y diabéticos tratados con el jugo de granada roja.

Los datos son presentados como la concentración de triglicéridos en suero \pm error estándar de la media (SEM). ★ Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

En la figura 12 se observan los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en suero de los animales en estudio. En las ratas sanas, la variedad Wonderful al 5%, incrementó significativamente la concentración de VLDL en un 28%. Mientras que la variedad Tecozautla al 5% la disminuyó en un 46% con respecto al grupo control. En las ratas diabéticas se observó un aumento del 29% para la variedad Wonderful al 2.5%, un aumento en 38% para la variedad Apaseo EA al 2.5% y un aumento marcado (53%) en la variedad Wonderful al 5% con respecto al grupo control. Mientras que, para la variedad Tecozautla al 2.5 y 5% disminuyó los niveles de VLDL en un 17% y 28%, respectivamente. Un efecto similar fue presentado para la variedad Apaseo EA al 5% con una disminución significativa del 39%.

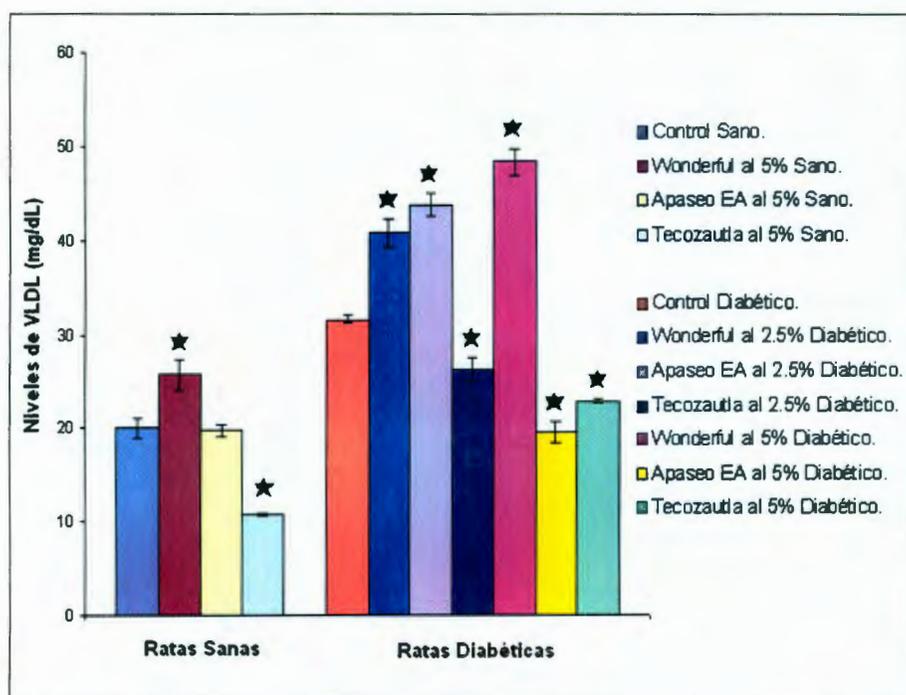


Figura 12. Niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en suero de animales tratados con el jugo de granada roja.

Los datos son presentados como la concentración de VLDL en suero \pm error estándar de la media (SEM). ★ Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

En la Figura 13, se muestran los valores de colesterol sérico determinado según la metodología descrita en la sección correspondiente. En las ratas sanas, se observó aumentos significativos con respecto al grupo control en la variedad Wonderful al 5% (18%), Apaseo EA al 5% (40%), y del 92% para la variedad Tecozautla al 5%. Mientras que para las ratas diabéticas, los grupos que muestran una disminución pertenecen a las variedades Wonderful al 5% (27%) y Apaseo EA en su dilución al 5% (12%). Así mismo, se presentó un incremento en las dos diluciones de la variedad Tecozautla al 2.5% y 5% (15% y 31%, respectivamente).

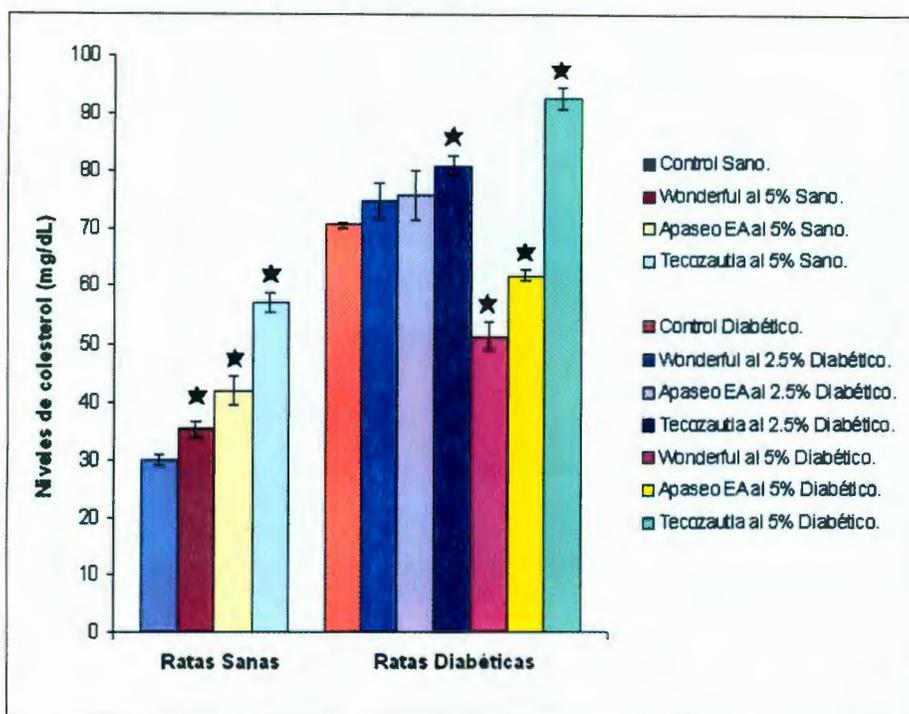


Figura 13. Niveles de colesterol total en suero de los animales sanos y diabéticos tratados con el jugo de granada roja.

Los datos son presentados como la concentración de colesterol total en suero \pm error estándar de la media (SEM). *Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

La figura 14 muestra los niveles de colesterol no HDL sérico. En las ratas sanas, se pueden observar incrementos significativos con respecto al grupo control en un 41% para la variedad Wonderful al 5%, en un 106% para la variedad Apaseo EA y del 158% para la variedad Tecozautla al 5%. Para las ratas diabéticas, el aumento significativo con respecto al grupo control, mostrado en las diluciones al 2.5% de las variedades Wonderful y Apaseo EA corresponde a un 23% y un 19%, respectivamente. Mientras que con la dilución al 5% de Wonderful se obtuvo una disminución significativa con respecto al grupo control del 43% y en un 7% para la variedad Apaseo EA. En cambio, se presentó un aumento del 19% y 36% para la variedad Tecozautla al 2.5 y 5%, respectivamente, con respecto al grupo control.

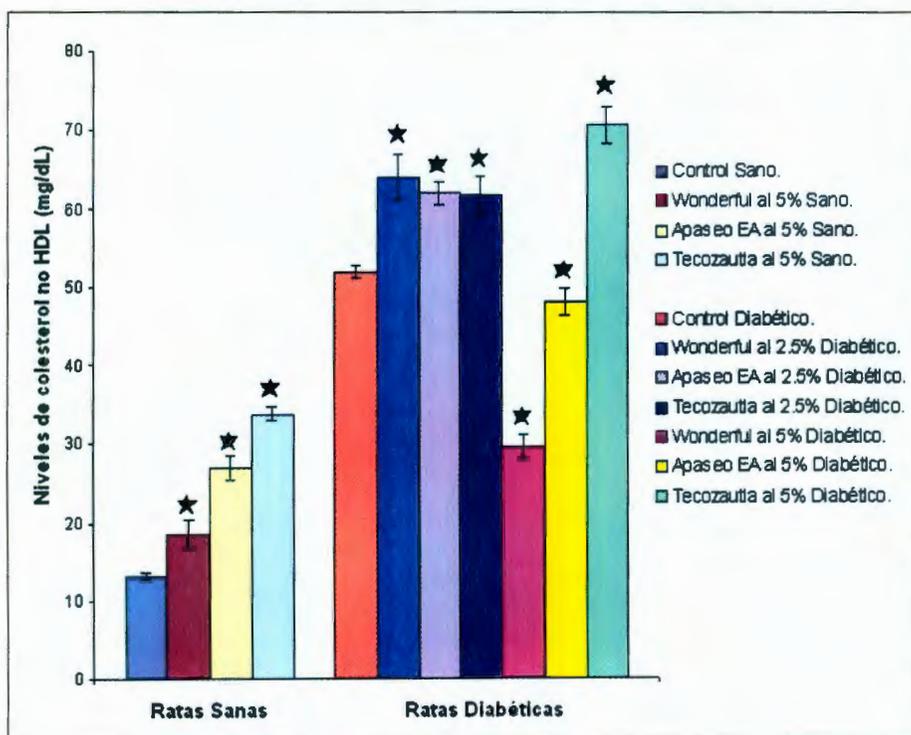


Figura 14. Niveles de colesterol no HDL en suero de animales tratados con el jugo de granada roja.

Los datos son presentados como la concentración de LDL en suero \pm error estándar de la media (SEM). *Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

La figura 15 muestra las lipoproteínas de alta densidad (HDL), presentando diferencia significativa con respecto al grupo control sólo en el grupo de ratas sanas, tratadas con la variedad Tecozautla al 5% con un aumento marcado del 40%. Con respecto a las ratas diabéticas se observó diferencia estadística significativa con respecto al grupo control en la mayoría de los grupos bajo tratamiento. Para las variedades Wonderful y Tecozautla al 5% se observó un aumento del 18 y 19%, respectivamente. Mientras que, la variedad Wonderful al 2.5% disminuyó en un 42% y la variedad Apaseo al 2.5 y 5%, disminuyó en un 26%.

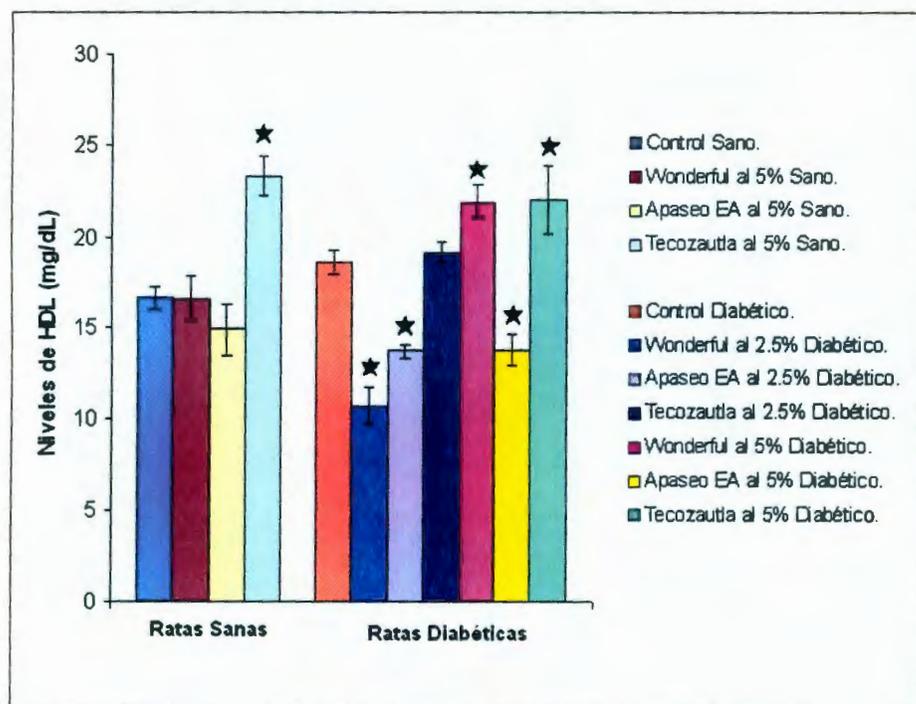


Figura 15. Niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en suero de animales tratados con el jugo de granada.

Los datos son presentados como la concentración de HDL en suero \pm error estándar de la media (SEM). *Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Los cambios de acidez en las dos variedades de granada roja utilizadas en este estudio (Cuadro 5) muestran datos similares a lo reportado para un jugo de granada de la variedad Mollar (pH 3.8) procedente de Alicante, España (Martí y col., 2001; Pérez-Vicente y col., 2004), así como, con frutos de granada roja procedentes de un huerto comercial en Apaseo El Alto, Gto. Sin embargo, el jugo de granada de Apaseo EA de la primera cosecha presentó menor valor de pH, lo cual podría estar influenciado por las condiciones ambientales (Mercado y col., 2007). Se ha demostrado la presencia de ácido cítrico y una pequeña cantidad de ácido ascórbico en el jugo de granada roja (Martí y col., 2001) y a dichos ácidos se les atribuye de manera importante la acidez de este jugo.

En cuanto a los resultados de SST, los valores de las diferentes variedades fluctúan en un intervalo de 14 a 16 °Bx. Este parámetro es una medida del porcentaje de azúcares disueltos en un líquido y está acorde a lo reportado para jugo de la variedad Mollar (15 °Bx) (Martí y col., 2001; Pérez-Vicente y col., 2004).

Con respecto al color, es interesante observar que dentro de estos parámetros existen cambios a través del tiempo en la variedad Apaseo EA, siendo mayores todos estos valores para EA3 en comparación a EA1 con tres meses de diferencia en el tiempo de cosecha. El valor positivo de a^* es característico de las tonalidades rojas (López y col., 2004) y dicho valor fue mayor para Apaseo EA3, lo cual nos indica que las granadas procedentes de esta localidad producen frutos con mayor contenido de pigmentos rojos y más luminosos (indicado por el parámetro L^*). El parámetro h en las muestras del trabajo experimental se encuentra entre 1° y 17°, donde al aumentar de 0° a 60°, el color cambia de rojo-magenta a rojo-naranja, por lo tanto la tonalidad de los jugos corresponde al rango de tonos magenta (Martí y col., 2001).

Por otro lado, cada una de las variedades presenta concentraciones diferentes en cuanto al contenido de compuestos fenólicos. En este estudio se observa, la diferencia existente entre el contenido de flavonoides y antocianinas entre las variedades de granada roja.

El contenido de fenoles totales en la variedad Mollar se ha reportado en 2750 mg eq. AG/L muestra (Pérez-Vicente y col., 2004); siendo equiparable, en nuestro estudio, a EA3 con 2212.77 mg eq. AG/L muestra, menor en el caso de la variedad Tecozautla (188.43 mg eq. AG/L muestra) y siendo superado por la variedad comercial Wonderful (3601.66 mg eq. AG/L muestra) utilizada con fines comparativos. Otros autores han reportado 0.8334 mg AG/g de arilos en la variedad Mollar de Elche (Guillen y col., 2007) que comparados con las variedades de este estudio se tiene a EA3 con 2.1406 mg AG/g de muestra, Tecozautla con 0.1773 mg AG/g de muestra y Wonderful con 2.7013 mg AG/g de muestra. Dichas diferencias pueden atribuirse a que en la variedad Mollar de Elche, estos compuestos fueron determinados en los arilos enteros y no únicamente en el jugo, lo que sugiere un mayor aprovechamiento de ésta característica del fruto en dicha presentación. Guillen y col., demuestran que la variedad Mollar de Elche es muy rica en fenoles totales en comparación a las variedades Taifi y Ganesh. Por lo que, la variedad Apaseo EA presenta concentraciones similares a la variedad Mollar, pero superiores a otras fuentes importantes tales como: el vino tinto (2036 mg AG/L muestra) y el té verde (1029 mg AG/L muestra) (Gil y col., 2000).

Con respecto a la concentración de antocianinas se observó una cantidad similar para la variedad EA3 (172.06 mg eq C3G/L muestra) comparada con Tecozautla (172.23 mg eq C3G/L muestra) y menor a Wonderful (425.02 mg eq C3G/L muestra). Esta última es superior a lo reportado para la variedad Mollar (250.9 mg eq C3G/L muestra) (Pérez-Vicente y col., 2004). Esta diferencia puede explicarse por los diferentes tiempos de cosecha, origen y variedad a la que pertenecen.

Así mismo, diversas investigaciones reportan que durante el almacenamiento de la granada roja, las antocianinas disminuyen en los arilos almacenados o en los zumos debido a que su estabilidad se ve alterada por el tiempo y la temperatura, en frío o a temperatura ambiente (Martí y col., 2001; Pérez-Vicente y col., 2004; Guillen y col., 2007). Dichos autores utilizaron temperaturas desde 2 a 25°C y en nuestro caso, fueron congelados los jugos (-20°C) hasta su uso.

En cuanto a la capacidad antioxidante, la variedad EA3 presentó 9.13 mM eq. trolox, Tecozautla 16.1 mM eq. trolox y Wonderful el valor de 20.96 mM eq. trolox, mientras que una muestra de la variedad Mollar contiene 17 mM eq. trolox (Pérez-Vicente y col., 2004) mostrando diferencias entre las variedades pero mayores a las presentadas en el vino tinto y una infusión de té verde determinadas bajo el mismo método. La variedad de importación (Wonderful) presentó un valor de TEAC similar a muestras de la misma variedad procesadas industrialmente, pero EA3 presentó valores inferiores a éstas (Gil y col., 2000).

Con respecto a los estudios *in vivo*, la administración vía intraperitoneal a una dosis de 60 mg/kg de peso corporal de STZ, un antibiótico de amplio espectro con actividad diabetogénica, oncolítica y oncogénica, provoca la destrucción selectiva de las células beta pancreáticas (Rossini y col., 1977; Spring, 2001); produciendo un aumento progresivo en niveles glucémicos en sangre (350-450 mg/dL) alrededor de 1 a 2 días después de la inyección (Rossini y col., 1977). En base a lo anterior, en el presente estudio se emplearon animales diabéticos con niveles de glucosa alrededor de 300 mg/dL, lo que sugiere que una parte importante del páncreas se encontraba ya destruido.

Cabe destacar que, en general, los niveles de glucosa determinados a lo largo del periodo experimental, son mayores a los obtenidos en las lecturas iniciales. Este hecho puede deberse a que en los inicios de la diabetes, la enfermedad suele ser menos agresiva y debido a que la destrucción del páncreas es progresiva, existe menor producción de insulina y por lo tanto los niveles de glucosa se van

En general, en las ratas diabéticas hubo una disminución en el consumo de alimento (Figura 8), a pesar de que no se reguló el metabolismo de glucosa. Por lo que, la disminución en el consumo de alimento pudo estar relacionada con la ingesta alta de glucosa a partir del jugo de granada, produciendo cierta saciedad.

Es un problema común que los pacientes con diabetes presenten elevadas concentraciones de triglicéridos y colesterol en sangre (Goldstein y col., 2003). El tejido adiposo requiere de una función apropiada de la insulina para incorporar glucosa y reesterificar los ácidos grasos, los cuales son transportados como triglicéridos. En el caso de la diabetes, la función de reesterificación no se lleva eficientemente a cabo, incrementándose los niveles de triglicéridos en sangre (Greenspan y Strewler, 1998). El jugo de la variedad Tecozautla disminuyó los niveles de triglicéridos tanto en ratas sanas como diabéticas (Figura 12), lo que podría estar relacionado con una disminución en la síntesis de triglicéridos en hígado. Mientras que, los jugos de granada de las variedades Apaseo EA y Wonderful al 2.5% incrementan estos niveles en ratas diabéticas. Se ha reportado que el consumo durante tres meses de jugo de granada diluido (1:5) en pacientes diabéticos, no mejora el perfil lipídico pero sí produce efectos antioxidantes sobre el suero y los macrófagos, lo que podría contribuir a la atenuación del desarrollo de aterosclerosis (Rosenblat y col., 2006). Así mismo, el consumo de 40 g al día de jugo de granada concentrado (JGC) no reduce las concentraciones séricas de triglicéridos en pacientes con hiperlipidemia. (Esmailzadeh y col., 2004).

Con respecto al colesterol total para las ratas sanas bajo tratamiento con las variedades Wonderful, Apaseo EA y Tecozautla, aumentaron significativamente los niveles de este lípido (Figura 14). Mientras que, las ratas diabéticas tratadas con la variedad Tecozautla al 2.5 y 5% también aumentaron los niveles de colesterol total respecto al grupo control. Por el contrario, la variedad Wonderful y Apaseo EA al 5% en las ratas diabéticas disminuyó considerablemente los niveles séricos del mismo. Lo anterior concuerda con dos estudios con pacientes humanos diabéticos tratados con jugo de granada roja diluido 1:5 (50 mL/día) o una dosis de 40 g de

JGC, donde se observó una reducción significativa en las concentraciones séricas de colesterol (Esmailzadeh y col., 2004; Rosenblat y col., 2006). Las discrepancias entre los resultados de diferentes variedades, pueden deberse a la dosis establecida entre los experimentos, las semanas de tratamiento y la composición fitoquímica de cada variedad de granada roja.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) juegan un papel importante en el metabolismo del colesterol, ya que son las responsables de transportar el colesterol sintetizado de manera endógena por el hígado, el obtenido por vía exógena a partir de los alimentos, del hígado a la periferia y viceversa para que sea metabolizado. Los pacientes diabéticos tanto insulino dependientes como no insulino dependientes generalmente presentan elevadas concentraciones de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y pocas concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (HDL) lo que repercute en problemas del corazón (Goldstein y col., 2003). Por otro lado, el cálculo de colesterol no HDL asume que todo el colesterol que no es transportado en las HDL es potencialmente aterogénico. Incluso es un mejor predictor de eventos vasculares que el colesterol LDL en poblaciones formadas por sujetos con diabetes, enfermedad cardiovascular o con hipertrigliceridemia (Aguilar y col., 2004). En las figuras 15 y 16 se muestran los resultados obtenidos sobre las concentraciones séricas de colesterol no HDL y HDL en los diferentes grupos de experimentación, encontrando que la administración del jugo de Tecozautla (al 2.5 y 5 %) en ratas diabéticas incrementa los niveles de colesterol no HDL; dicho resultado podría incrementar el riesgo de aterosclerosis aunque a la dilución al 5% se incrementa los niveles de HDL (19%). Por el contrario, las variedades Wonderful y Apaseo EA al 5% disminuyen significativamente con respecto al grupo control el nivel de colesterol no HDL e incrementa la variedad Wonderful a dicha dilución los valores de HDL (18%) no así, la variedad Apaseo a la misma dilución que disminuye los niveles de HDL en un 26%.

VIII. CONCLUSIONES.

El jugo de la variedad Apaseo EA presentó una tonalidad más roja comparado con las otras variedades; sin embargo, este efecto no puede atribuirse a la presencia de antocianinas, ya que la variedad Wonderful mostró los contenidos más altos de estos fenoles.

El consumo de granada roja de las variedades Wonderful, Apaseo EA y Tecozautla incrementó la concentración de glucosa sanguínea tanto en animales sanos como en diabéticos, lo cual pudiera estar relacionado con el contenido de sólidos solubles totales presentes en el jugo de dicha fruta.

El jugo de la variedad Tecozautla disminuye los niveles de triglicéridos, pero incrementa la concentración de colesterol total y de colesterol no HDL, lo cual predispone a riesgo cardiovascular.

El jugo de la variedad Apaseo EA no disminuye los niveles de glucosa en sangre, pero regula negativamente los niveles de triglicéridos, colesterol total y colesterol no HDL sugiriendo que podría ser recomendable para el control del perfil lipídico en la diabetes mellitus.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

Abdel-Aal, M. S., Hucl, P. 1999. A rapid method for quantifying total anthocianins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.* Vol. 76:350-354.

ADA American Diabetes Association, 2002. *Diabetes Care* Vol. 25 Sup. 1: s5-s20.

Alfaro, J., Botella, F., Simal, A. 2000. Tratamiento de la diabetes mellitus. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* Vol. 24(2): 33-43.

Andrade-Cetto, A., Becerra-Jimenez, J., Cárdenas-Vázquez, R. 2008. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *J. Ethnopharmacol.* Vol. 116(1): 27-32.

Agustí, M. 2004. *Fruticultura.*, Ed. Mundi-Prensa. Madrid: 425-435.

Aguilar, C.A., Gómez, F. J., Lerman, G., Vázquez, C., Méndez, O., Posadas, C. 2004. Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* Vol. 12(1):7-41.

Bach, J. F. 1994. Insulin- Dependent Diabetes Mellitus as an Autoimmune Disease. *Endocrine Reviews* Vol.15 (4): 516-542.

Büyükbacı, A., El, S. N. 2008. Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant. Foods. Hum. Nutr.* Vol. 63(1): 27-33.

Ceriello, A., Bortolotti, N., Motz, E., Lizzio, S., Catone, B., Assaloni, R., Tonutti, L., Taboga, C. 2001. Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation: a pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes. *Eur. J. Clin. Invest.* Vol. 31(4): 322-328.

Cline, G. W. 1999. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* Vol. 341: 240-246.

Cooper, G. A. 1986 http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=PUGR2&photoID=pugr2_002_ahp.tif

Dekker, J. M. 2004. Lípidos en sangre: una marea tóxica. *Diabetes Voice* Vol. 49: 12-13.

Dominguez, D. C. 2005. <http://www.iespana.es/trabajosdemedicina/dm.htm>

Esmailzadeh, A., Tahbaz, F., Gaieni, I., Alavi-Majd, H., Azadbakht, L. 2004. Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia. *J. Med. Food.* Vol. 7(3): 305-8.

Feinglos, M. N. y Totten S. E. 2008. Are You What You Eat, or How Much You Eat? The case of Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch. Intern. Med.* Vol. 168(14): 1485-1486.

Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., Kader, A. A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 48: 4581-4589.

Goldstein, B. J., Müller-Wieland D., Dunitz, M. 2003. Textbook of Type 2 Diabetes E.U.A. 343-355.

Guillen, F. 2007. V Congreso Iberoamericano de tecnología postcosecha y agroexportaciones Cartagena, Murcia, España. Vol. 31(5): S8-P107.

Gutiérrez Y. I., Miranda, M., Varona, N., Rodríguez A. T. 2000. Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (Quercetina) en *Psidium guajava* (L). Rev. Cubana Farm. Vol. 34(1): 50-55.

Harding, A. H., Wareham, N. J., Bingham, S. A., Khaw, K. T., Luben, R., Welch, A., Forouhi, N. G. 2008. Plasma Vitamin C Level, Fruit and Vegetable Consumption, and the Risk of New-Onset Type 2 Diabetes Mellitus. Arch. Intern. Med. Vol. 168(14): 1493-1499.

Huang, T. H., Peng, G., Kota, B. P., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D., Li, Y. 2005a. Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model: role of lowering circulating lipids. Br. J. Pharmacol. Vol. 145(6): 767-774.

Huang, T. H., Peng, G., Kota, B. P., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D., Li, Y. 2005b. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR- γ and identification of an active component. Toxicol. Appl. Pharmacol. Vol. 207: 160-169.

Jansoone, J., 2005. [http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Punica_granatum\(04\).jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Punica_granatum(04).jpg)

Juśkiewicz, J., Zduńczyk, Z., Jurgoński, A., Brzuzan, Ł., Godycka-Kłós, I., Zary-Sikorska, E. 2008. Extract of green tea leaves partially attenuates streptozotocin-induced changes in antioxidant status and gastrointestinal functioning in rats. Nutr. Res. Vol. 28(5): 343-349.

Kishore, R. K., Sudhakar D., Parthasarathy, P. R. 2009. Embryo protective effect of pomegranate *Punica granatum* L. fruit extract in adriamycin-induced oxidative stress. Indian. J. Biochem. Biophys. Vol. 46(1): 106-111.

Lansky, E. P., 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. Ethnopharmacol.* Vol. 109(2): 177-206.

Leahy, J. L., 2005. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch. Med. Res.* Vol. 36:197-209.

León, M. T., Castillo, M. D. 2002. La dieta mediterránea está de moda. *Medicina General* Vol. 49:902-908.

Li, Y., Wen, S., Kota, B. P., Peng, G., Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis B. D. 2005. *Punica granatum* flower extract, a potent α -glucosidase inhibitor improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *J. Ethnopharmacol.* Vol. 99: 239-244.

Litwak, L. 2002. Hiperglucemia postprandial, factor emergente de riesgo cardiovascular en la Diabetes tipo 2. *Medwave.* 5. http://www.medwave.cl/congresos/starlix/3.act?tpl=im_ficha_congresos.tpl

López, E. 2007. <http://www.guanajuato.gob.mx/sda/articulos/granada.htm>

López, C. A. B., Gómez, P. A., 2004 Comparison of color indexes for tomato ripening *Horticultura Brasileira, Brasilia.* Vol. 22(3): 534-537.

Mariken, J. T., Sebastian, J., Hans, P., Guido, R., Haenen, M., Bast, A. 2004. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem. Toxic.* Vol. 42: 45-49.

Martí, N., Pérez-Vicente, A., García-Viguera, C. 2001. Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *J. Sci. Food Agric.* Vol. 82: 217-221.

Mateos, N., Zacarías, R. 2002. Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus. Rev. Hosp. Gral. Dr. M Gea González Vol. 5(1 y 2): 33-41.

Mathews, C., Van Holde, K., Ahern, K. G. 2002. Bioquímica. 3era. ed., Pearson Educación, España: 627-629, 632-635.

Mercado, E., Rocha, L., Álvarez, B., Mondragón, C. 2007. Procesado mínimo de granada roja, efectos de calidad de material prima, forma y temperatura de almacenamiento en la calidad microbiológica y fisicoquímica. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones.

Morton, J. F. 1987. Fruits of warm climates: Pomegranate. Miami Florida: 352-355.
<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/pomegranate.html>

Mondragón, C., Juárez, S. 2008. Granada Roja Guía para su producción en Guanajuato. INIFAP. Folleto Técnico 2: 5-11, 33-38.

Notkins, A. L. 2001. Autoimmune Type 1 Diabetes: Resolved and Unresolved Issues. J. Clin. Invest. Vol. 108: 1247-1252.

OMS Organización Mundial de la Salud, 1999.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>

Palmer, J. R., Boggs, D. A., Krishnan, S., Hu, F. B., Singer, M., Rosenberg, L. 2008. Sugar-Sweetened Beverages and Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus in African American women. Arch. Intern. Med. Vol. 168(14): 1487-1492.

Pérez-Vicente, A., Serrano, P., Abellán, P., García-Viguera, C. 2004. Influence of packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. J. Sci. Food. Agric. Vol. 84: 639-644.

Rosenblat, M., Hayek, T., Aviram, M. 2006. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis* Vol. 187: 363-371.

Rossini, A. A., Like, A. A., Chick, W. L., Appel, M. C., Cahill, G. F. 1977. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 74(6): 2485-2489.

Salaheddin, M., Kader, A. A. 1984. Post-harvest physiology and storage behaviour of pomegranate fruits. *Sci. Hortic.* Vol. 24: 287-298.

Shepherd, P. R., Kahn B. B. 2005. Glucose transporters and insulin action. Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* Vol. 341:248-253.

Singlenton, V. L., Rossi J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* Vol. 16:144-158. <http://www.garfield.library.upenn.edu/classics1985/A1985AUG6900001.pdf>

Spring. 2001. Free Radicals in Biology and Medicine. University of Iowa, USA. Vol. 77: 222.

Takoradee, Y. 2006. <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Pomseeds2.jpg>

USDA United States Department of Agriculture, **2007.** Pomegranate raw. NDB No.09286. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list-nut-edit.pl>

Villa, M. 2007. Factores de Riesgo Cardiovascular. Lípidos plasmáticos y lipoproteínas. Colesterol. Triglicéridos
<http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/707/7/Factores-de-Riesgo-Cardiovascular.-Lipidos-plasmaticos-y-lipoproteinas.-Colesterol.-Trigliceridos>

Wahle, K. W. 2004. Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids*. Vol. 39(12):1223-1231

Watkins, P. J. 2003. Enfermedad Cardiovascular, Hipertensión y Lípidos en la Diabetes. *Br. Med. J.* Vol. 326:874-876.

Winter, W. E. 2002. Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. *Clin. Diabet.* Vol. 20(4): 183-191.

Wucherpfenning, K. W. 2001. Type 1 Diabetes. *Nat. Immunol.* Vol. 2:1-3.

X. ANEXO 1.

A continuación; se muestra el fundamento de las técnicas, para cada una de las determinaciones, incluidas en el perfil lipídico.

➤ Triglicéridos.

Los triglicéridos presentes en la muestra de sangre reaccionan con una lipasa para formar glicerol. El glicerol, convertido a glicerol-3-fosfato por la enzima glicerol cinasa, reacciona con la enzima glicerol fosfato oxidasa para formar fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con la enzima con 4-aminoantipirina/p-clorofenol y a través de la enzima peroxidasa se lleva a cabo la formación de un compuesto de color rojo intenso llamado quinoneimina, el cual se lee espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm.

➤ Colesterol total.

Para esta determinación también se utiliza el indicador quinoneimina que se forma a partir de peróxido de hidrógeno y 4-amino-antipirina en presencia de fenol y peroxidasa. Los ésteres de colesterol presentes en la muestra reaccionan con la enzima colesterol esterasa para liberar colesterol, el cual al reaccionar de nuevo con esta enzima produce colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno a partir del cual se obtiene el indicador antes mencionado, que se lee a una longitud de onda de 546 nm.

◦

➤ HDL.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL y VLDL) y las fracciones de quilomicrones precipitan cuantitativamente al añadir ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio. Después de centrifugar, la concentración de colesterol se determina en la fracción HDL que queda en el sobrenadante. Por lo que esta determinación se basa en el mismo principio que la determinación enzimática de colesterol.