

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Elaboración de una jalea adicionada con
fitoquímicos de cáscara de *Punica granatum* L.
con posible utilidad para el control de la
diabetes mellitus

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Biología Experimental

PRESENTA

M. en C. Janeth Margarita Ventura Sobrevilla

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar – Director

Dr. Rubén Román Ramos – Asesor

Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda – Asesor

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González – Asesor

México, D. F., 22 de Marzo del 2012.

Comité Tutorial de la Tesis

“Elaboración de una jalea adicionada con fitoquímicos de cáscara de *Punica granatum* L. con posible utilidad para el control de la diabetes mellitus”

realizada por

Janeth Margarita Ventura Sobrevilla en las instalaciones de la
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.

Laboratorio de Farmacología.
Ciencias Biológicas y de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
aaaf@xanum.uam.mx.

Dr. Rubén Román Ramos.

Laboratorio de Farmacología.
Ciencias Biológicas y de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
rrr@xanum.uam.mx.

Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda.

Laboratorio de Toxicología.
Departamento de Farmacología.
Facultad de Medicina.
Universidad Nacional Autónoma de México.
casam@servidor.unam.mx.

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González.

Departamento de Investigación en Alimentos.
Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Autónoma de Coahuila.
cristobal.aguilar@uadec.edu.mx.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Elaboración de una jalea adicionada con fitoquímicos de cáscara de *Punica granatum* L. con posible utilidad para el control de la diabetes mellitus", que presentó

Janeth Margarita Ventura Sobrevilla

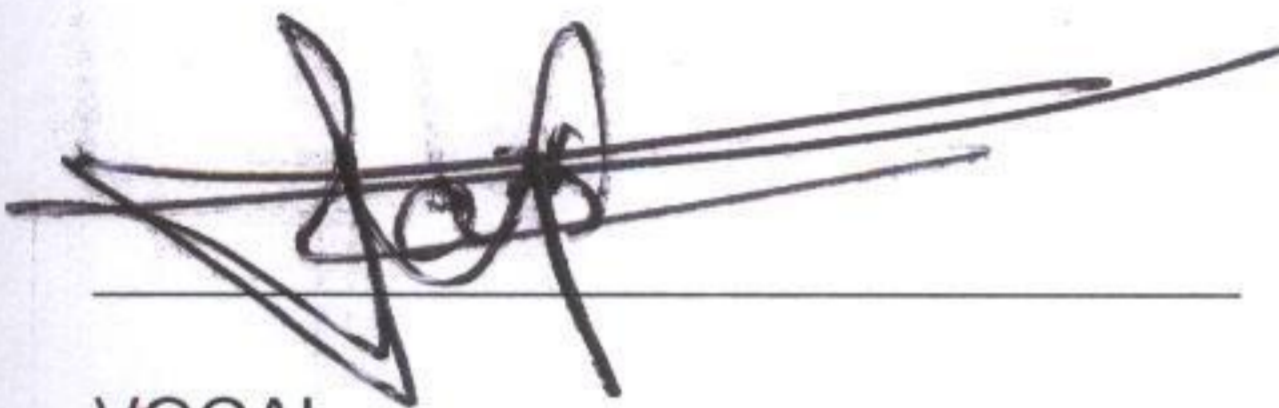
El 22 de Marzo del 2012



PRESIDENTE.
Dr. Rubén Román Ramos.
Universidad Autónoma
Metropolitana Unidad Iztapalapa.



SECRETARIO.
**Dr. Cristóbal Noé Aguilar
González.**
Universidad Autónoma de
Coahuila.



VOCAL.
**Dr. Alfonso Efraín Campos
Sepúlveda.**
Universidad Nacional Autónoma
de México.



VOCAL.
Dra. Lilia Arely Prado Barragán.
Universidad Autónoma
Metropolitana Unidad Iztapalapa.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “Elaboración de una jalea adicionada con fitoquímicos de cáscara de *Punica granatum* L. con posible utilidad para el control de la diabetes mellitus”, que presentó

Janeth Margarita Ventura Sobrevilla

El 22 de Marzo del 2012

PRESIDENTE.
Dr. Rubén Román Ramos.
Universidad Autónoma
Metropolitana Unidad Iztapalapa.

SECRETARIO.
**Dr. Cristóbal Noé Aguilar
González.**
Universidad Autónoma de
Coahuila.

VOCAL.
**Dr. Alfonso Efraín Campos
Sepúlveda.**
Universidad Nacional Autónoma
de México.

VOCAL.
Dra. Lilia Arely Prado Barragán.
Universidad Autónoma
Metropolitana Unidad Iztapalapa.

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC), registro 001482, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020”. Janeth Margarita Ventura Sobrevilla agradece el apoyo recibido por CONACYT (Registro No. 204289).

Resumen

Considerando que la diabetes mellitus (DM) es actualmente un problema importante de salud pública a nivel mundial, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una jalea de jugo de granada adicionada con extracto de cáscara de granada con posible utilidad para el control de la DM. Por lo tanto, se obtuvo y caracterizó bromatológicamente cáscara de granada. Después se preparó un extracto acuoso y se analizó su contenido de fenoles por HPLC. Se estudió el efecto de varias dosis del extracto sobre la glucemia de ratones macho CD1 sanos y diabéticos inducidos por estreptozotocina. Se determinó la dosis letal media para las vías oral e intraperitoneal. Con la dosis seleccionada del extracto se diseñó y elaboró una jalea de jugo de granada comercial reducida en azúcar, usando gomas como agentes espesantes. A las jaleas se les realizó análisis físicos, químicos, antioxidantes, microbiológicos y sensoriales. Antes de evaluar el efecto *in vivo* de las jaleas, se llevó a cabo un ensayo para determinar el efecto de la administración intraperitoneal de diferentes dosis de estreptozotocina para inducir diabetes experimental en ratones macho CD1. Los modelos que se evaluaron fueron: única dosis alta (UDA), con dos dosis (130 y 150 mg/Kg) y el modelo de múltiples dosis bajas (MDB) con una sola dosis (40 mg/Kg), pero administrada diariamente durante 2, 3, 4 y 5 días consecutivos en ratones no ayunados. Posteriormente las glucemias fueron evaluadas durante 4 semanas. Encontramos que en el modelo UDA, se producen hiperglucemias severas (> 600 mg/dL) e inestables desde el tercer día y una letalidad del 50% al día 21. Con el modelo MDB se encontraron hiperglucemias moderadas (250-450 mg/dL) y estables y 0 %

de letalidad en el día 28. Así, se decidió trabajar el modelo de MDB. Finalmente, se estudio el efecto de las jaleas sobre la glucemia, algunos marcadores de estrés oxidante, la relación glutatión reducido y oxidado, malondialdehído y actividad catalasa, así como algunos marcadores de inflamación como interleucinas 1 β , 6 y factor de necrosis tumoral alfa. Tanto el extracto, como la jalea con y sin extracto presentaron efecto hipoglucémico y antioxidante en ratones macho CD1, sin embargo, estos efectos no fueron encontrados en los animales diabéticos. Con base en los resultados, se concluye que existe un gran potencial terapéutico en un subproducto agrícola considerado un desperdicio, como lo es la cáscara de granada.

Abstract

Taking into account that the diabetes mellitus (DM) is an important public health problem globally, the aim of this work was to develop a reduced-sugar pomegranate juice jelly added with an aqueous extract of pomegranate peel with a possible use to the treatment of DM. Therefore, peel pomegranate was obtained and physicochemical analyzed. An aqueous pomegranate peel extract was prepared and the phenolic compounds were analyzed with HPLC. The effect of several doses of the extract on blood glucose in male CD1 mice normal and streptozotocin-induced diabetic mice was performed. After that, the oral and intraperitoneal lethal mean doses were determined. With the doses of extract selected, was produced a reduced sugar pomegranate juice jelly, using gums to get a semi solid consistency. Physical, chemical, antioxidant, microbiological and sensory analysis was evaluated in jellies. Before to evaluate the *in vivo* effect of jellies, we analyzed the effect of varying doses of streptozotocin (STZ) to induce experimental diabetes in male CD1 mice. The one high dose of STZ (OHDS) model (130 and 150 mg/Kg) and the multiple low doses of STZ (MLDS) with a dose (40 mg/Kg), but daily administrated for 2,3,4 and 5 consecutive days in non-fasted mice. Blood glucose was measured over 4 weeks. With OHDS, severe and unstable hyperglycemias (>600 mg/dL) and 50 % of deaths were observed at 21 day. With MLDS, mild and stable hyperglycemias (250-450 mg/ dL) and 0 % of deaths were found at 28 day. Therefore, the MLDS was selected to the next experiments. Finally, the effect of the jelly on blood sugar; some stress oxidative markers (glutathione, malondialdehyde and catalase activity) and some

inflammation markers (interleukin 1 β and 6 and tumor necrosis factor alpha) were evaluated. The pomegranate extract, jelly with extract and jelly without extract presented hypoglycemic and antioxidant effect on health CD1 mice, however, these effects were not found in diabetic mice. So, we concluded that there is a great therapeutic potential for the byproduct of pomegranate as the peel, considering that this is industrial and agricultural waste.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Diabetes mellitus	1
1.2. Inflamación y su relación con la DM	4
1.2.1. TNF α e IL-6	6
1.3. Estrés oxidante y su relación con la DM	8
1.3.1. GSH	10
1.3.2. Lipoperoxidación	11
1.4. Uso de las plantas medicinales como alternativa para el control de la DM	11
1.5. <i>Punica granatum</i> L.	12
1.6. Propósito de la presente investigación	14
2. Antecedentes	16
2.1. Origen y distribución de la granada	16
2.2. Botánica de la granada	16
2.3. Propiedades medicinales de la granada	18
2.4. Fitoquímica de la granada	20
2.5. Toxicidad de la granada	26
2.6. Perfil farmacocinético de los componentes del jugo de granada	29
2.7. Acciones farmacológicas asociadas con la administración de granada	30
2.7.1. Efecto de la granada sobre PPARs	30
2.7.1.1. Efecto de la granada sobre PPAR γ	30
2.7.1.2. Efecto de la granada sobre PPAR α	31
2.7.2. Efecto de la granada sobre la fibrosis	32
2.7.3. Efecto de la granada sobre la α -glucosidasa	33
2.7.4. Efecto de la granada sobre la aldosa reductasa	34
2.7.5. Efecto de la granada sobre TNF α e IL-6	36
2.7.6. Efecto de la granada sobre NF κ B	36
2.7.7. Efecto de la granada sobre GSH	38
2.7.8. Efecto de la granada sobre lipoperoxidación	39
2.7.9. Efecto de la granada sobre SOD, CAT y GPx	40
2.7.10. Efecto de la granada sobre ONOO $^-$	41
3. Justificación	45
4. Hipótesis	47
5. Objetivos	48
5.1. Objetivo general	48
5.2. Objetivos específicos	48
6. Material y métodos	49
6.1. Preparación de la cáscara de granada y obtención del extracto	49
6.1.1. Obtención de la materia prima	49
6.1.2. Análisis bromatológico de las cáscaras de granada	49
6.1.3. Obtención del extracto acuoso de la cáscara de granada	50
6.1.4. Análisis de monómeros fenólicos en el extracto por HPLC	50
6.2. Selección del extracto de cáscara de granada	52
6.2.1. Animales y protocolo de investigación	52

6.2.2.	Efecto agudo del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia de ratones sanos	52
6.2.3.	Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia en ratones sanos	53
6.2.4.	Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre la curva de tolerancia a la glucosa en ratones sanos	53
6.2.5.	Efecto subagudo del extracto de sobre la glucemia glucosa en ratones diabéticos	54
6.2.5.1.	Inducción de diabetes con STZ	54
6.2.5.2.	Administración de tratamientos	55
6.2.5.3.	Determinación de glucemias	55
6.2.5.4.	Obtención de suero y determinación de insulina	56
6.3.	Determinación de dosis letal media (DL ₅₀)	56
6.3.1.	Determinación de DL ₅₀ para vía oral e intraperitoneal	56
6.4.	Diseño, elaboración y análisis de la jalea de jugo de granada	57
6.4.1.	Componentes de la jalea	57
6.4.2.	Diseño y selección de la jalea base	58
6.4.3.	Preparación de las jaleas	58
6.4.4.	Análisis físico de las jaleas	59
6.4.5.	Análisis químico de las jaleas	59
6.4.6.	Análisis antioxidante de las jaleas	60
6.4.7.	Análisis microbiológico de las jaleas	61
6.4.8.	Análisis sensorial de las jaleas	61
6.5.	Actividad biológica <i>in vivo</i> de la jalea con extracto	62
6.5.1.	Efecto de la jalea con extracto en animales diabéticos	62
6.5.1.1.	Inducción de la diabetes con múltiples dosis bajas de STZ	62
6.5.1.2.	Administración de los tratamientos	63
6.5.1.3.	Determinación de las glucemias	63
6.5.1.4.	Obtención del suero y determinación de TNF α e IL-6	63
6.5.1.5.	Obtención de tejidos y análisis de estrés oxidante	63
6.5.2.	Efecto de la jalea con extracto en animales sanos	64
6.6.	Análisis estadístico	65
7.	Resultados	66
7.1.	Preparación de la cáscara de granada y obtención del extracto	66
7.1.1.	Análisis bromatológico de la cáscara de granada	66
7.1.2.	Análisis de monómeros fenólicos en el extracto de la cáscara	67
7.2.	Selección del extracto de cáscara de granada	68
7.2.1.	Efecto agudo del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia en ratones sanos ayunados	68
7.2.2.	Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia en ratones sanos	69
7.2.3.	Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre la curva de tolerancia a la glucosa en ratones sanos	70
7.2.4.	Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre el peso, glucemia e insulina en ratones diabéticos	72
7.2.4.1.	Efecto de la STZ sobre la glucemia y peso de ratones no tratados	72

7.2.4.2. Efecto subagudo del extracto sobre el peso en ratones diabéticos	73
7.2.4.3. Efecto subagudo (30 días) del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia e insulina sérica de ratones diabéticos	75
7.3. Dosis letal media (DL ₅₀) del extracto de cáscara de granada oral e intraperitoneal	76
7.3.1. DL ₅₀ para la vía oral	76
7.3.2. DL ₅₀ para la vía intraperitoneal	77
7.3.3. Efecto sobre la temperatura rectal	77
7.4. Diseño, elaboración y análisis de la jalea de jugo de granada	78
7.4.1. Selección de la jalea base	78
7.4.2. Análisis físico de las jaleas	80
7.4.3. Análisis químico de las jaleas	82
7.4.4. Análisis antioxidante de las jaleas	84
7.4.5. Análisis microbiológico de las jaleas	84
7.4.6. Análisis sensorial de las jaleas	85
7.5. Actividad biológica de la jalea con extracto	86
7.5.1. Efecto subagudo de la administración de jalea con extracto (JE) sobre la curva de tolerancia a la glucosa en ratones sanos	86
7.5.2. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la lipoperoxidación en ratones sanos	87
7.5.3. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la relación GSH/GSSG en ratones sanos	88
7.5.4. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la actividad catalasa en ratones sanos	89
7.5.5. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la actividad TNF α e IL-6 en ratones sanos	90
7.5.6. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la glucemia en ratones diabéticos	91
7.5.7. Efecto subagudo de la administración de JE sobre TNF α e IL-1 β en ratones diabéticos	92
7.5.8. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la lipoperoxidación tisular en ratones diabéticos	92
7.5.9. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la actividad catalasa tisular en ratones diabéticos	93
8. Discusión	95
8.1. Obtención y selección del extracto	95
8.2. Efecto del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia	96
8.3. DL ₅₀ oral e intraperitoneal del extracto de cáscara de granada	101
8.4. Diseño, elaboración y análisis de la jalea de jugo de granada	104
8.5. Actividad biológica <i>in vivo</i> de la JE	110
9. Conclusiones	117
10. Bibliografía	118
11. Perspectivas	153

1. Introducción

1.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades caracterizado por una hiperglucemia crónica, resultante de defectos en la secreción y/o acción de la insulina, que afecta el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (ADA, 2011). La Organización Mundial de la Salud estima que más de 220 millones de personas padecen diabetes y que es una de las 10 principales causas de muerte en países de alto y mediano ingreso (WHO, 2011). En México la prevalencia de la DM oscila entre 6.5 y 10 millones de personas (FDM, 2010) y es considerada la principal causa de muerte en hombre y mujeres (SINAIS, 2010). Existen diferentes tipos de DM, sin embargo el 90% de los casos de este padecimiento pertenecen al tipo 2 (DM2).

La Federación Mexicana de Diabetes (FDM) en su apartado “Economía y Diabetes”, establece que son muchos los gastos involucrados en el tratamiento de la DM y que la Organización Mundial de Salud destina entre el 4 y 5% de su presupuesto para el tratamiento de enfermedades relacionadas con dicha patología. Entre los gastos relacionados con la DM se encuentran (FDM, 2010):

‣ Costos directos al paciente. Son aquellos egresos económicos que la persona enferma o su familia destinan principalmente en el pago del médico y medicamentos.

- Costos directos al sistema de salud. Incluye consultas, hospitalizaciones e incapacidades de las personas afectadas por DM.
- Costos indirectos a la sociedad. Se refieren a la baja productividad de los pacientes como resultado de las complicaciones de la enfermedad.
- Costos intangibles: Relacionados con los problemas psicosociales (estrés, ansiedad, depresión, dolor, etc.) que afectan tanto a las personas enfermas como a las personas que los rodean.

Además de la hiperglucemia, la DM se acompaña de un aumento en el estrés oxidante (EOx) e inflamación crónica (IC). Estos tres factores, aunados a la falta de actividad física y a los malos hábitos alimenticios, llevan al desarrollo de obesidad e hiperlipidemia, contribuyendo a la aparición de complicaciones diabéticas y enfermedades cardiovasculares que guían a la muerte de los pacientes (ADA, 2011; Miranda-Garduño y Reza-Albarrán, 2008; Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez, 2007).

La hiperglucemia es la característica más sobresaliente de la DM, generando glucotoxicidad, estrés oxidante por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) e inflamación crónica por la elevación de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleucinas 6 y 1 β (IL-6 e IL-1 β) (Bahtiyar *et al.*, 2004; Dandona *et al.*, 2004; Knobler *et al.*, 2003).

Se han descritos varias rutas metabólicas que se asocian al EOX con la DM2, entre las cuales encuentran la ruta del sorbitol o polioles (aldosa-reductasa), la autooxidación de la glucosa, la glucosilación no enzimática de proteínas, la modificación de la actividad de la protein-cinasa C, la pseudohipoxia, el metabolismo alterado de lipoproteínas y la alteración vía citocinas (Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez, 2007; Robertson *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2003; Glugliucci, 2000).

También se han reportado diversos mecanismos que vinculan a la IC con la DM. Uno de ellos está relacionado con la obesidad y la activación endocrina del tejido adiposo, en donde se observa un incremento en algunas citocinas proinflamatorias y factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NFκB), que está relacionado con la transcripción de proteínas asociadas a procesos inflamatorios, además de que este factor puede ser activado por ERO. Un segundo mecanismo se debe al desarrollo de la respuesta inmune ante los productos finales de glucosilación avanzada (AGEs), mismos que promueven la generación de ERO y ERN. Además, se ha observado un aumento en la oxidación de lipoproteínas e infiltración de macrófagos en diversos órganos (Miranda-Garduño y Reza-Albarrán, 2008; Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez, 2007; Dandona *et al.*, 2004), lo que favorece el proceso inflamatorio en esta patología.

Todo esto favorece el desarrollo de complicaciones, tales como retinopatía, neuropatía, hipertensión, hiperlipidemia, enfermedad cardiovascular, insuficiencia

renal, entre otras, dañando el funcionamiento de las principales moléculas biogénicas (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) y la integridad celular (Latha y Pari, 2004; Yokozawa *et al.*, 2002).

1.2. Inflamación y su relación con la DM

La inflamación crónica (IC) está vinculada con la resistencia a la insulina, obesidad, diabetes y enfermedad cardiovascular. Varios estudios confirman que la inflamación aumenta el riesgo de desarrollar DM2 (Bahtiyar *et al.*, 2004; Knobler *et al.*, 2003). En sujetos no diabéticos con alto riesgo de arterosclerosis, se detectaron altas concentraciones de ácido siálico, orosomucoide, IL-6 y proteína C reactiva (PCR) en plasma (Duncan *et al.*, 2003) antes del desarrollo de DM2. Similarmente se encontró una correlación entre la concentración de insulina en ayunas y la concentración de PCR en plasma (Lemieux *et al.*, 2001; Yudkin *et al.*, 1999).

La IC se relaciona con la DM2 por varios mecanismos. Uno de ellos está asociado con la obesidad y la actividad endocrina del tejido adiposo. Otro mecanismo es la interacción de los AGEs con receptores tipo gammaglobulinas; se ha demostrado que esta unión induce la liberación IL-1 y TNF α en macrófagos y monocitos (Rosado-Pérez y Mendoza Nuñez, 2007).

Los adipocitos y los macrófagos tienen una expresión génica similar, es decir, en los macrófagos y adipocitos se sintetizan algunas proteínas en común (Wellen y Hotamisligil, 2005). El tejido adiposo produce una amplia variedad de sustancias con actividad inmunológica, entre las que se incluyen proteínas mediadoras de inflamación y hormonas como la leptina, adiponectina, resistina, grelina y visfatina, todas relacionadas con el metabolismo de la glucosa (Moreno-Aliaga, 2008). Algunos de los mediadores de inflamación incluyen al TNF α , inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (AIP-1), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), IL-6, IL-1 β , IL8, IL10, IL15 y factores de complemento B, D y C3 (Bastarrachea *et al.*, 2007). En la obesidad se encuentran elevadas concentraciones de PCR, IL-6, AIP-1 y TNF- α (Dandona *et al.*, 2004).

Las rutas de señalización de la inflamación pueden ser activadas por el estrés metabólico originado tanto de manera intracelular como extracelular. La obesidad causa estrés en el retículo endoplásmico (RE), esto permite la activación de vías de señalización que regulan la inflamación y consecuentemente se genera resistencia a la insulina (Özcan *et al.*, 2004). Adicionalmente, la hiperglucemia y la obesidad llevan a un aumento en la producción mitocondrial de EROs, lo cual causa una mayor activación de las rutas de señalización relacionadas con la inflamación (Wellen y Hotamisligil, 2005). Varias cinasas de serina/tirosina son activadas por estímulos inflamatorios y estresantes, entre estas enzimas se incluyen a la cinasa de la región amino terminal de c-Jun (JNK), cinasa del inhibidor de NF κ B (IKK) y PKC.

En la obesidad la actividad de JNK se encuentra elevada en el hígado, músculo y tejido adiposo. La falta de JNK-1 previene el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes tanto en ratones genéticamente obesos como en ratones con obesidad inducida por dieta (Hirosumi *et al.*, 2002). La JNK se activa en respuesta a estrés inducido por RE, citocinas y ácidos grasos. La forma activa de JNK promueve la fosforilación de la serina³⁰⁷ en IRS-1, de este modo se inhibe la acción de la insulina (Aguirre *et al.*, 2000; Aguirre *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004).

Altas concentraciones de lípidos provocan un aumento intracelular de metabolitos de ácidos grasos, como los diacilgliceroles (DAG) y la acil-CoA. Este aumento está correlacionado con la activación de PKC y un incremento en la fosforilación de Ser³⁰⁷ en IRS-1 (Yu *et al.*, 2002). La PKC puede afectar la acción de la insulina mediante la activación IKK β , JNK y otras cinasas de serina/tirosina (Gao *et al.*, 2004; Schmitz-Peiffer, 2002).

1.2.1. TNF α e IL-6

El TNF- α es producido de manera constitutiva en el adipocito y su expresión es inducida por ácidos grasos libres y TG. Esta citocina proinflamatoria está sobreexpresada en el tejido adiposo de roedores y humanos obesos (Wellen y Hotamisligil, 2005). Una mutación (G-308A) en el promotor de TNF α está asociada

con un incremento en la concentración plasmática de $\text{TNF}\alpha$ y a un riesgo 1.8 veces mayor de desarrollar diabetes (Kubaszek *et al.*, 2003).

Se ha reportado que la tercera parte de IL-6 se produce en las células adiposas, donde tiene efectos autocrinos y paracrinos y su expresión es inducida por estrés biológico y $\text{TNF}\alpha$ (Arner, 2003). Esta citocina promueve la secreción hepática de TG, que a su vez inducen la producción de $\text{TNF}\alpha$ (Wellen y Hotamisligil, 2005). Una mutación (C-124G) en el promotor de IL-6 incrementa el riesgo de resistencia a la insulina (Kubaszek *et al.*, 2003).

Particularmente, $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 interfieren en la señalización de la insulina e inducen un estado de resistencia a la insulina. De manera normal, la insulina se une a la subunidad α extracelular de su receptor, provoca un cambio conformacional que permite la unión de ATP a la subunidad β intracelular; esto promueve su autofosforilación y le confiere la actividad tirosina cinasa, por lo que se inicia la fosforilación de tirosina en las proteínas IRS, permitiendo que se activen otras proteínas como la PI3K, que promueve la translocación del GLUT4 a la membrana celular y de esta manera, la glucosa entra a la célula. El $\text{TNF}\alpha$ inhibe la autofosforilación del receptor de la insulina y promueve la fosforilación de la serina³⁰⁷ en IRS-1; esta forma de IRS-1 promueve la fosforilación de serina en el receptor de la insulina, inhibe la fosforilación de tirosina y, consecuentemente, el receptor de la insulina pierde su actividad tirosina cinasa (Lorenzo *et al.*, 2007; Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez, 2007). Por otro lado, se ha señalado que la IL-6

inhibe la señalización de la insulina en el hepatocito, efecto que ha sido relacionado con la SOCS-3 (supresor de señalización de citocinas 3), una proteína asociada al receptor de la insulina. La SOCS-3 inhibe la autofosforilación del receptor de la insulina, la fosforilación de tirosina en IRS-1 y la asociación de la subunidad p85 de PI3K a IRS-1 (Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez, 2007; Dandona *et al.*, 2004).

1.3. Estrés oxidante y su relación con la DM

El estrés oxidante (EOx) puede ser definido como un desbalance entre la producción de especies moleculares altamente reactivas, principalmente de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), que pueden ser radicales libres y la producción y/o acción de antioxidantes (Meigs *et al.*, 2007; Sies, 1997).

Los radicales libres (RL[·]) son especies químicas inestables y altamente reactivas que provienen de un rompimiento homolítico y tienen un electrón desapareado en su último nivel de energía; para estabilizarse toman un electrón de moléculas vecinas. En condiciones normales se producen bajas concentraciones de radicales libres, pues son necesarios para el buen funcionamiento del organismo. Sin embargo, la sobreproducción de RL[·] genera alteraciones estructurales sobre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, provocando daño celular, tisular y sistémico (Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez, 2007; Maritim *et al.*, 2003).

Las principales especies reactivas de oxígeno (ERO) presentes en el organismo son el singulete delta de oxígeno molecular ($^1\Delta_gO_2$), el radical superóxido ($\cdot O_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Para neutralizar a las ERO existen sistemas antioxidantes que pueden clasificarse en sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc.) y no enzimáticos (glutatión reducido, GSH).

Entre las principales especies reactivas de nitrógeno (ERN) se encuentran los radicales como el óxido nítrico ($\cdot NO$) y el dióxido de nitrógeno ($\cdot NO_2$), así como los no radicales como el nitronio (NO_2^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), peroxinitrito ($ONOO^-$), ácido peroxinitroso ($ONOOH$), nitroxilo (NO^-), nitrosonio (NO^+), tetraóxido de dinitrógeno (N_2O_4), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) y cloruro de nitrilo (NO_2Cl) (Chirino *et al.*, 2006). Estas especies son agentes nitrantes y tienen la capacidad de modificar la estructura de los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. El N_2O_3 puede desaminar a guanina, citosina y adenina, convirtiéndolas en xantina, uracilo e hipoxantina, respectivamente.

El EOx ha sido asociado con muchas enfermedades crónico degenerativas, entre las que se encuentra la DM (Urbina-Bonilla, 2008). Tanto la hiperglucemia como la inflamación presentes en la DM favorecen el incremento en el EOx. Por otro lado, existen reportes de experimentos *in vitro* e *in vivo*, tanto en roedores como en humanos, que sugieren que el EOx contribuye a la resistencia a la

insulina y por lo tanto, el EOx puede ser considerado con un factor de riesgo para el desarrollo de la DM (Meigs *et al.*, 2007; Houstis *et al.*, 2006; Ceriello y Motz, 2004).

Son varios los mecanismos que estimulan la producción de oxidantes y promueven el daño en los sistemas antioxidantes, incrementado el EOx en la DM, entre éstos se encuentran la ruta de los polioles (aldosa reductasa) y las hexosaminas, la autooxidación de la glucosa, la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), la formación de AGEs, la pseudohipoxia y el incremento en la actividad de la PKC y el NFκB (Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez, 2007; King y Loeken, 2004; Maritim *et al.*, 2003).

1.3.1. GSH

El GSH es un antioxidante no enzimático que se encuentra en animales, plantas y microorganismos, principalmente en forma soluble en el citosol, aunque también se ha detectado en mitocondria y núcleo (Forman *et al.*, 2009; Iwasaki *et al.*, 2009; Giustarini *et al.*, 2003). El GSH es un tripéptido formado por tres aminoácidos (ácido glutámico-cisteína-glicina), el grupo -SH de la cisteína le confiere la capacidad antioxidante. El GSH reacciona con los peróxidos (H₂O₂ y ROOH) para formar glutatión oxidado (GSSG), esta reacción es catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (GPx); se requieren dos moléculas de GSH para formar una de GSSG. En las células el GSSG es reducido a GSH por la enzima

glutación reductasa (GR) en presencia de NADPH, este último es generado por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en la vía de las pentosas fostato (Espinosa, 2007, Berg *et al.*, 2008).

1.3.2. Lipoperoxidación

Los peróxidos (H_2O_2 y ROOH) tienen efectos tóxicos sobre las células ya que pueden remover átomos de hidrógeno de los lípidos, alterando las estructuras de las membranas celulares.

La oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Ox-LDL) acelera la conversión de los monocitos y macrófagos a células espumosas en la pared arterial, las cuales son un componente esencial para la formación de la placa arteroesclerótica (Malaguarnera *et al.*, 2009). Tanto los Ox-LDL como el malondialdehído (MDA) se encuentran elevados en los pacientes con DM. Además del MDA existen otros subproductos tóxicos de lipoperoxidación importantes como el 4-hidroxinonenal y el 4-hidroxihexenal. Sin embargo, el MDA es el marcador de oxidación de lípidos de mayor estudio.

1.4. Uso de las plantas medicinales como alternativa para el control de la DM

Aunque se acepta de manera general que la mejor defensa para prevenir dichas complicaciones es el control de los niveles de glucosa en la sangre, en

muchas ocasiones el efecto de los fármacos reguladores de glucosa existentes en el mercado (sulfonilureas, biguanidas, tiazolidinedionas, inhibidores de alfa glucosidasa, potenciadores de incretinas, etc.) no es suficiente, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas.

En la medicina tradicional existe una gran variedad de plantas empleadas en el control empírico de la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Tiwari y Madhusudana, 2002). Aunque de estas plantas se han aislado una gran cantidad de compuestos orgánicos antioxidantes con efecto hipoglucémico y en los últimos años su uso se ha incrementado, aún no se tiene un control de calidad estricto que garantice a los usuarios el consumo de fitomedicamentos o nutraceuticos seguros y eficaces. La Organización Mundial de la Salud establece que en los países desarrollados el 70-80% de la población ha usado la medicina tradicional y que la herbolaria es la forma más popular y lucrativa en el mercado internacional (WHO, 2010). Un ejemplo claro es la granada roja *Punica granatum* Linneo.

1.5. *Punica granatum* Linneo

El empleo de la granada roja (*Punica granatum* Linneo) ha sido reportado desde tiempos ancestrales en las religiones del Judaísmo, Cristianismo, Islamismo, Budismo y Zoroastrismo. La granada roja ha sido empleada tradicionalmente en India, Guatemala, China, Cuba, Tunes y Brazil para el tratamiento de diversos padecimientos como la diarrea, acné, fiebre, úlceras,

dermatitis, disentería, infecciones en órganos sexuales y enfermedades respiratorias. Es particularmente utilizada para el control de la DM tipo 2 en la medicina Unani practicada en India (Jurenka, 2008; Katz *et al.*, 2007; Lasnky y Newman, 2007; Hu, 1997; Nasr y *et al.*, 1996).

Aunque la granada es una fruta de uso ancestral, la mayor parte de la información científica relacionada con esta planta se ha efectuado en los últimos años. Existen reportes donde se ha analizado tanto la fruta de la granada (jugo, semillas, cáscara y fruto completo) como el árbol de granado (hojas, flores y raíces). La granada y el granado exhiben propiedades hipoglucemiantes, antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antihelmíticas, antibacterianas, antitumorales, antivirales y astringentes. También se han empleado para el control de DM, hiperlipidemia, hipertensión, arterosclerosis, problemas bucales, infertilidad femenina, disfunción eréctil, obesidad, Alzheimer, diarrea y úlceras. Además se han identificado más de 100 fitoquímicos de esta especie vegetal, que pueden clasificarse en diversos grupos, tales como: azúcares simples, ácidos orgánicos alifáticos, lactonas, ácidos hidroxibenzóicos, flavonas, flavonoles, antocianinas, elagitaninos, aminoácidos, alcaloides, ácidos grasos no conjugados, esteroides, esteroles, terpenos, glucósidos, vitaminas, entre otros (Jurenka, 2008; Lansky y Newman, 2007).

Respecto al control de la DM, en la mayoría de las investigaciones científicas reportadas al momento se ha evidenciado el efecto de los extractos

hidroalcohólicos de las flores del granado y del jugo del fruto sobre la glucemia, estrés oxidante e inflamación. En la presente investigación se propone el uso de la cáscara seca del fruto de granada, la cual se sabe que contiene compuestos biológicamente activos similares a los contenidos en el jugo de granada (Jurenka, 2008; Li *et al.*, 2008; Katz y *et al.*, 2007; Lansky y Newman 2007).

Algunas ventajas que ofrece la utilización de la cáscara de granada es su alto contenido en antioxidantes fenólicos, como elagitaninos (punicalagina) y ácidos hidroxibenzóicos (ácidos gálico y elágico). Al respecto cabe señalar que en México la producción anual de granada es cercana a 3,740 ton/año (SIAP, 2008). Considerando que la cáscara representa un 30-40% del peso total de la fruta (Al-Maiman y Mahad 2002) y que un Kg de cáscara de granada mexicana tiene 2.6 g AE/Kg cáscara (Robledo *et al.*, 2008) y sabiendo que 1 g de ácido elágico (AE) con una pureza aproximada al 95%, tiene un precio de \$ 1,499.00 pesos (Sigma Aldrich). Tenemos que el ácido elágico presente en el total de la cáscara de granada producida en México es de 5.72 ton, lo que se traduce a 8, 585 millones de pesos.

1.6. Propósito de la presente investigación

En la presente investigación se propone elaborar una jalea de jugo de granada adicionada con antioxidantes de cáscara de granada, como un posible alimento funcional, mediante la adición de antioxidantes de cáscara de granada

con efecto sobre la glucemia, el estrés oxidante y la inflamación presentes en DM. Para esto se obtendrá una decocción acuosa de cáscara de granada. Posteriormente se realizarán ensayos *in vivo* en ratones machos cepa CD1 sanos y con diabetes inducida con estreptozotocina, y se determinará la dosis letal media. Después de observar el potencial del extracto y la dosis efectiva, se diseñará y elaborará un producto con potencial funcional, mismo que será probado en animales sanos y diabéticos. Además se efectuarán los ensayos correspondientes para determinar la calidad nutricional e inocuidad del producto.

2. Antecedentes

2.1. Origen y distribución de la granada

La granada (*Punica granatum* L.) es originaria de Persia (De Candolle, 1967), su primera domesticación fue en Irán 2000 A.C. (Evreinoff, 1949). El nombre granada o *pomegranate* (Inglés) proviene del latín *pomum* que significa manzana y *granatus* que quiere decir semillas. Inicialmente fue científicamente llamada *Malum granatum*, que significa manzana con semillas. Por su parte, el adjetivo púnico deriva del latín “punicus”, que a su vez deriva del griego “*phoiniki*” que significa fenicios. Estos términos aluden al comercio de la púrpura, un pigmento obtenido de caracoles marinos que los fenicios utilizaban (Amjad, 2005). Por lo tanto podemos decir que *Punica granatum* significa semillas de fenicios o semillas púrpuras.

En cuanto a su distribución, la granada se esparció de Persia a áreas cercanas como el mediterráneo y subsecuentemente alcanzó países orientales como India y China, finalmente se extendió hasta el nuevo mundo (Purseglove, 1981; Lansky y Newman, 2007). Actualmente la granada es cultivada en España, Marruecos, Egipto, Israel, Irán, Afganistán, Arabia, Pakistán, Arabia Saudita, India, China, Birmania, Estados Unidos de América, México, Argentina y Chile.

2.2. Botánica de la granada

La granada o granada roja (francés: *grenadier*, inglés: *pomegranate*, portugués: *romã*, árabe: *román* y hebreo: *rimmon*) pertenece a la familia Punicaceae, representada por un solo género (*Punica*) y dos especies: *Punica granatum* L. y *P. protopunica* Balf, pero sólo *P. granatum* L. es cultivada por sus frutos comestibles. El granado de Socotora (*P. protopunica*) es endémico de la Isla de Socotora, cerca del cuerno africano de Somalia, y se encuentra en peligro de extinción; a diferencia de *P. granatum*, ésta posee flores rosas en lugar de rojas y un fruto menos abundante y más amargo (Asdule y Patil, 1995; Mohan Kumar, 1990).

El granado es considerado un árbol pequeño o un arbusto leñoso densamente enramado con una altitud de 6 a 7 m cuando crece de manera silvestre; sin embargo, cuando es cultivado se mantiene por debajo de los 2 ó 4 m (Martin *et al.*, 1987). Las hojas son verde oscuras; miden de 2 a 8 cm de anchura; tienen forma oblonga-lanceolada, es decir son estrechas alargadas con la parte media más ancha; se encuentran distribuidas en posiciones opuestas o en verticilios (espirales) de 5 ó 6 hojas y se encuentran unidas al tallo del árbol por cortos pedúnculos o rabillo. La flores pueden ser sexualmente hermafroditas, machos o intermedias. El fruto (granada) es esférico con una piel delgada, botánicamente es conocido como balaústa o balausta (lat. *Balaustium*, que significa flor de granada). La granada es un tipo de fruto desarrollado en un ovario ínfero caracterizado por dos verticilios de carpelos basales falsos en el interior del receptáculo. Con el desarrollo del ovario los carpelos más externos son inclinados

hacia arriba y superpuestos. Esto resulta en la formación de dos cámaras superiores que ocupan una posición parietal. El pericarpio del fruto es áspero y correoso, por dentro existen cámaras que están compuestas de una delgada pared llamada carpelo. La cabeza de las semillas está llena de una pulpa roja pálida (arilo) con jugo ácido (Jurenka, 2008; Dutta, 1982).

2.3. Propiedades medicinales de la granada

Desde principios del presente siglo se han desarrollado numerosas investigaciones científicas que han consolidado las bases de algunos usos tradicionales de la granada. Las propiedades anticarcéricas de las semillas, jugo, piel, hojas y flores de la granada y algunos de los fitoquímicos implicados en esta actividad han sido resumidos por Lansky y Newman (2007). En el tratamiento de la hipertensión y estenosis carotídea se observó que el consumo de 50 mL/día de jugo de granada durante dos años (1.5 mmol de polifenoles totales por día), redujo los niveles en suero de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y la presión sanguínea en pacientes diabéticos (Aviram y Dornfeld, 2001); para el caso de estenosis carotídea se observó que al año de consumo se incrementó en un 9% la capa media interior de las arterias carotídeas derecha e izquierda y se redujo la peroxidación de lípidos en suero de pacientes con severo daño de estenosis carotídea. También se demostró que el consumo diario de 240 mL de jugo de granada por un periodo de tres meses, redujo la isquemia miocárdica y mejoró la perfusión miocárdica en pacientes (Katz *et al.*, 2007).

En cuanto a problemas dentales, se reportó que un extracto hidroalcohólico de granada presentó actividad antibacteriana contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Escherichia coli*, todos ellas presentes en placa dental (Menezes *et al.*, 2006). En pacientes con candidiasis, tratados tres veces al día con un gel a base de corteza de granado por un tiempo de 15 días, se redujeron los síntomas clínicos de estomatitis aftosa (Vasconcelos *et al.*, 2003).

Se asocia fuertemente a los antioxidantes polifenólicos presentes en el jugo de granada con la disminución de disfunción eréctil en conejos (Azadzo *et al.*, 2005), el aumento en la concentración y movimiento de espermatozoides de ratas macho (Türk *et al.*, 2008) y el efecto neuroprotector en ratones con Alzheimer (Hartman *et al.*, 2006).

Además del consumo directo de la fruta, la granada es utilizada como condimento para dar presentación a algunos alimentos y en la industria alimentaria se emplea para la elaboración de jugos, vinos y jaleas (Cerde *et al.*, 2003; Gil *et al.*, 2000) y como agente saborizante y colorante. Se ha reportado (Negi *et al.*, 2003) que los extractos de granada sirven como biopreservativos de alimentos y para la fabricación de productos nutracéuticos. En particular, la cáscara de granada es un subproducto considerado un desecho agroindustrial y pocas son las aplicaciones generadas a partir de ella, sin embargo, existen reportes sobre el uso de extractos de cáscara de granada en la preparación de tintes, cosméticos y

algunos preparados farmacéuticos (Lansky y Newman, 2007; Negi *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2003).

2.4. Fitoquímica de la granada

La composición química y el valor nutricional de la granada, al igual que con otros frutos, se encuentran estrechamente influenciadas por el ambiente y las técnicas de cultivo; dentro de los factores que intervienen en estos hechos destacan: variedad, lugar de cultivo, clima, grado de maduración y técnicas de poscosecha y almacenamiento. Algunos investigadores han encontrado que la influencia de estos factores altera de manera significativa el contenido de azúcares, grasas, ácidos grasos, vitaminas solubles en agua, minerales y polifenoles en la granada (Fadavi *et al.*, 2005; Al-Maiman y Ahmad, 2002; Melgarejo *et al.*, 2000).

En los estudios sobre la composición química de la granada se incluye el análisis de raíz, corteza, hojas, semillas, cáscara, jugo y fruto completo, como se presenta a continuación. En la Tabla 1 se muestran los fitoquímicos de las diferentes partes de la granada y los usos tradicionales de las mismas.

Además del consumo directo de los arilos frescos, la ingesta de jugo extraído de los arilos (parte comestible) es otra forma preferencial de consumir la granada. La parte comestible constituye aproximadamente el 60% del peso neto, mientras

que el jugo extraído de estos arilos representa entre el 30-40% del peso total del fruto (Fadavi *et al.*, 2005; Al-Maiman y Ahmad, 2002). Además de las antocianidinas que confieren el color rojo a la bebida, el jugo es una rica fuente de antioxidantes y contiene una gran cantidad de azúcares, ácidos orgánicos, polifenoles (antocianinas, flavonoides y taninos), vitaminas y minerales.

Las semillas representan cerca del 20% del peso total del fruto (Fadavi *et al.*, 2005; Al-Maiman y Ahmad, 2002). Las semillas de granada contienen fibra cruda, pectina, azúcares (Aviram *et al.*, 2000) y lignanos (Dalimov *et al.*, 2003); además son ricas en aceite. Por su alto contenido en ácidos grasos de interés industrial, el aceite de semillas es utilizado como aceite para pinturas y en la elaboración de productos cosméticos (Moayadi, 2004; Hornung *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002). Otros componentes menos abundantes en el aceite de granada son los esteroides y esteroides.

La cáscara comprende entre el 30-40% del peso total del fruto. La cáscara de granada contiene una gran cantidad de compuesto polifenólicos, entre los que destacan los taninos (50-60 g/ kg cáscara). La punicalagina es el elagitanino más abundante en la cáscara, constituye cerca del 80-85% de los taninos totales presentes en la cáscara (Seeram *et al.*, 2006).

En las hojas de granada se han encontrado principalmente compuestos fenólicos como galotaninos, elagitaninos y glicósidos de flavonas. En menor proporción se han detectado ácido triterpénicos, alcaloides y minerales.

En las flores se han identificado menos compuestos que en las otras partes de la granada ya mencionadas. Algunos ácidos hidroxibenzóicos, taninos y terpenos presentes en el jugo, cáscara y hojas son también encontrados en las flores de granada.

La composición química de la corteza y la raíz se distingue de las otras partes de la granada por su contenido en alcaloides. Por otro lado, en la madera se han aislado ácidos hidroxibenzóicos y taninos.

Tabla 1. Usos tradicionales de las diferentes partes de la granada y sus compuestos principales.

Parte	Compuestos	Medicina Tradicional
Arilos (Jugo)	Azúcares: fructosa, glucosa (Fadavi <i>et al.</i> , 2005; Graça <i>et al.</i> , 2004) y sacarosa (Gabbasova y Abdurazakova, 1969). Ácidos grasos: A) insaturados: ácido linolénico, ácido linoleico, ácido oleico. B) Saturados: ácido esteárico, ácido palmítico y ácido mirístico (Ercisli <i>et al.</i> , 2008). Ácidos orgánicos: ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido málico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido cítrico (Graça <i>et al.</i> , 2004), ácido succínico, ácido quínico (Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002), ácido ascórbico o vitamina C (Fadavi <i>et al.</i> , 2005; Al-Maiman y Ahmad, 2002). Fenoles: Ácidos hidroxibenzoicos: ácido gálico, ácido elágico (Amakura <i>et al.</i> , 2000; Gil <i>et al.</i> , 2000), ácido protocatéuico (Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002) y ácido galágico (Reddy <i>et al.</i> , 2007). Ácidos hidroxicimámicos: ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido <i>p</i> -coumárico (Amakura <i>et al.</i> , 2000), ácido <i>o</i> -coumárico y ácido ferúlico (Poyrazoglu <i>et al.</i> , 2002). Elagitaninos: punicalina y punicalagina (Reddy <i>et al.</i> , 2007; Seeram <i>et al.</i> ,	India: antipirético (Arseculeratne <i>et al.</i> , 1985) y tónico sanguíneo (Lad y Frawley, 1960).

	<p>2006; Gil <i>et al.</i>, 2000). Flavanoles: flavan-3-ol, catequina, epicatequina, epigallocatequina 3-galato (De Pascual-Teresa <i>et al.</i>, 2000). Flavonoles: quercitina (Poyrazoglu <i>et al.</i>, 2002) y rutina (Artik, 1998). Antocianinas: delfinidina 3,5-diglucósido, delfinidina 3-glucósido, cianidina 3,5-diglucósido, cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3,5-diglucósido y pelargonidina 3-glucósido (Alighourchi <i>et al.</i>, 2008; Graça <i>et al.</i>, 2004). Chalconas: floridzina (Poyrazoglu <i>et al.</i>, 2002). Aminoácidos: prolina (Velioglu <i>et al.</i>, 1997), valina, metionina (Seppi Ak Franciosi, 1980).</p> <p>Aminas: triptamina, serotonina, melatonina (Badria, 2002).</p>	
Semillas	<p>Azúcares: manitol (Sharaf <i>et al.</i>, 1967).</p> <p>Ácidos grasos: A) Insaturados: ácido linoléico, ácido linoleico, ácido oleico (Fadavi <i>et al.</i>, 2005), ácido vaccénico, ácido gadoleico, ácido punícico (Yamasaki <i>et al.</i>, 2006), ácido palmitoleico (Melgarejo <i>et al.</i>, 2000). B) Saturados: ácido araquídico (Yamasaki <i>et al.</i>, 2006), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido behénico (Fadavi <i>et al.</i>, 2005), ácido lignocérico y ácido láurico (Melgarejo <i>et al.</i>, 2000).</p> <p>Fenoles: Ácidos hidroxibenzóicos: ácido elágico, ácido 3,3'-di-O-metilelágico, ácido 3,3',4'-tri-O-metil elágico (Wang <i>et al.</i>, 2004). Flavonoles: glicósidos de quercitina y kaempferol (Chauhan y Chahuan, 2001). Antocianinas: delfinidina 3,5-diglucósido, delfinidina 3-glucósido, cianidina 3,5-diglucósido, cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3,5-diglucósido y pelargonidina 3-glucósido (Du <i>et al.</i>, 1975).</p> <p>Esteroides: daucosterol (Wang <i>et al.</i>, 2004), campesterol, estigmaesterol, β-sitoesterol, colesterol, testosterona, estriol, estrona (Abd El Wahab <i>et al.</i>, 1998), 17-α-estradiol (Lansky y Newman, 2007).</p> <p>Tocofelores: γ-tocoferol (Kim <i>et al.</i>, 2002).</p> <p>Terpenos: ácido ursólico (Li <i>et al.</i>, 2008).</p> <p>Glicolípidos: cerebrósido (Tsuyuki <i>et al.</i>, 1981).</p> <p>Otros compuestos: Glicósidos fenólicos: Coniferil 9-O-[β-D-apiofuranosil(1\rightarrow6)]-O-D-glucopiranosido, sinapil 9-O-[β-D-apiofuranosil(1\rightarrow6)]-O-D-glucopiranosido, fenetil rutinosido, icarisida D1 (Wang <i>et al.</i>, 2004).</p>	Ninguna aplicación
Cáscara	<p>Ácidos orgánicos: ácido quínico (Amakura <i>et al.</i>, 2000).</p> <p>Fenoles: Ácidos hidroxibenzóicos: ácido elágico (Aguilera-Carbó <i>et al.</i>, 2008; Robledo <i>et al.</i>, 2007), ácido gálico, ácido galágico (Seeram <i>et al.</i>, 2006; Amakura <i>et al.</i>, 2000). Ácidos hidroxicimámicos: ácido caféico, ácido clorogénico, ácido <i>p</i>-coumárico (Amakura <i>et al.</i>, 2000). Elagitaninos: punicalina, punicalagina (Seeram <i>et al.</i>, 2006), corilagina, casuarinin, galagildilactona, pedunculagina, telimagrandina</p>	<p>India: Ayurveda. astringente, antidiarréico y como tratamiento para aftas (fuego labial) (Naovi <i>et al.</i>, 1991),</p>

(Satomi *et al.*, 1993), granatina A y B (Tanaka *et al.*, 1990). **Flavanoles:** flavan-3-ol, catequina, epicatequina, epigallocatequina 3-galato (de Pascual-Teresa *et al.*, 2000). **Flavonoles:** quercitina, rutina (Artik, 1998), kaempferol, kaempferol 3-O-glicósido, kaempferol 3-O-ramnoglicósido (van Elswijk *et al.*, 2004). **Flavonas:** luteolina, luteolina 7-O-glicósido (van Elswijk *et al.*, 2004). **Flavononas:** naringina (Kim *et al.*, 2002). **Antocianidinas:** delfinidina, cianidina, pelargonidina (Noda *et al.*, 2002). **Terpenos:** ácido ursólico (Sharaf *et al.*, 1967).

Guatemala: astringente, germicida, antidiarréico y como tratamiento para aftas y úlceras (Caceres *et al.*, 1987).

China: tratamiento de infecciones en órganos sexuales, mastitis, acné, foliculitis, hemorroides, dermatitis alérgica, timpanitis, diarrea, disentería y enfermedades orales (Fengchun *et al.*, 1997; Hu, 1997).

México: antidiarréico, antidisentérico, antihelmíntico y amebicida (Osuna *et al.*, 2005).

Ninguna aplicación

Hojas **Azúcares:** manitol (Sharaf *et al.*, 1967).

Fenoles: Ácidos hidroxibenzoicos: ácido elágico (Lei *et al.*, 2003), ácido brevifolin (Nawwar *et al.*, 1994). **Elagitaninos:** punicalina, punicalagina (Gil *et al.*, 2000), punicafolina, granatina A y B, corilagina, estrictinina (Tanaka *et al.*, 1985). **Galotaninos:** 1,2,4,6-tetra-O-galoil- β -D-glucosa, 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glucosa (Tanaka *et al.*, 1985), 1,2,6-tri-O-galoil- β -⁴C₁-glucopiranososa, 1,4,6-tri-O-galoil- β -⁴C₁-

	<p>glucopiranososa (Nawwar <i>et al.</i>, 1994), 1,2,4-tri-O-galoil-glucopiranososa, 1,3,4- tri-O-galoil-glucopiranososa (Hussein <i>et al.</i>, 1997). Flavonas: apigenina, apigenina 4'-O-β-glucopiranososa, luteolina 4'-O-β-glucopiranososa, luteolina 3'-O-β-glucopiranososa, luteolina 3'-O-β-xilopiranososa (Nawwar <i>et al.</i>, 1994).</p> <p>Esteroides: β-sitoesterol (Sharaf <i>et al.</i>, 1967).</p> <p>Terpenos: ácido ursólico, ácido betulico (Sharaf <i>et al.</i>, 1967; Elgamal y Fayed, 1964).</p> <p>Alcaloides: cloruro de N-(2'5'-dihidroxifenil) piridium (Nawwar <i>et al.</i>, 1994).</p>	
Flores	<p>Fenoles: Ácidos hidroxibenzoicos: ácido gálico (Li <i>et al.</i>, 2008) brevifolin carboxilato de etilo (sal), ácido elágico, ácido 3,3',4'-tri-O-metil elágico, pomegranatato (Wang <i>et al.</i>, 2004). Elagitaninos: 1,2-di-O-galoil-4,6-O-(S)-hexahidroxidifenoil-β-D-glucopiranososa (Xie <i>et al.</i>, 2008). Galotaninos: 1,2,6-tri-O-galoil-β-glucopiranososa (Xie <i>et al.</i>, 2008). Flavonas: luteolina, tricetina (Xie <i>et al.</i>, 2008). Esteroides: β-sitoesterol (Xie <i>et al.</i>, 2008), daucosterol (Wang <i>et al.</i>, 2004). Terpenos: ácido urólico (Wang <i>et al.</i>, 2004), ácido maslínico, ácido punicanólico, oleanólico, ácido ursólico, ácido asiático (Xie <i>et al.</i>, 2008).</p>	<p>India y medio oriente: Unani. tratamiento para la diabetes mellitus (Saxena y Vikram, 2004).</p> <p>México: antidiarréico, antidisentérico, antihelmítico y amebicida (Osuna <i>et al.</i>, 2005).</p>
Corteza raíz y tallos	<p>Azúcares: manitol (Sharaf <i>et al.</i>, 1967).</p> <p>Fenoles: Ácido hidroxibenzóicos: ácido gálico, ácido elágico, ácido 3,3'-di-O-metilelágico (El-Toumy <i>et al.</i>, 2001). Elagitaninos: punicalina, punicalagina (Gil <i>et al.</i>, 2000), punigluconina, punicacorteina A, B, C y D (Tanaka <i>et al.</i>, 1985), corilagina, 6-O-galoil-2,3-O-(S)-hexahidroxidifenoil-(α/β)-D-glucopiranososa (El-Toumy <i>et al.</i>, 2001). Galotaninos: 6-O-galoil-(α/β)-glucopiranososa (El-Toumy <i>et al.</i>, 2001). Esteroides: β-sitoesterol (Sharaf <i>et al.</i>, 1967). Alcaloides: peletierina, N-metil-peletierina, pseudopeletierina, nor-pseudopeletierina, sedridina, 2-(2'-hidroxipropil)^{Δ1}-piperideina, 2-(2'-propenil)^{Δ1}-piperideina, higrina, nor-grina (Neuhofer <i>et al.</i>, 1993).</p>	<p>India: Ayurveda. Antiparasitario (Naovi <i>et al.</i>, 1991).</p> <p>México: antidiarréico, antidisentérico, antihelmítico y amebicida (Osuna <i>et al.</i>, 2005).</p>

2.5. Toxicidad de la granada

La inocuidad de un extracto comercial de granada (POMELLA®) fue analizada por Patel *et al.* (2008). El producto se estandarizó a 30% de punicalagina. La dosis letal media (DL₅₀) oral en ratas y ratones fue mayor a 5 g/kg y la DL₅₀ intraperitoneal (i.p.) fue de 217 y 187 mg/kg, respectivamente. En un estudio subcrónico con ratas, la administración oral de 60, 240 y 600 mg/kg durante 90 días no ocasionó cambios en las observaciones clínicas, peso corporal y de órganos, tejidos y parámetros sanguíneos, con respecto al grupo sin tratamiento.

Amorin (1995) no encontró efectos mutagénicos ni tóxicos en ratones tratados por vía oral con extractos acuosos del fruto. Además, reportó una DL₅₀ por esta vía de 4 g/kg en ratones. Por el contrario, Sánchez-Lamar *et al.* (2008), demostraron que un extracto etanólico de la fruta completa (cáscara incluida) obtenido por maceración, provoca efectos citotóxicos en médula ósea de ratón y efectos genotóxicos en concentraciones más altas a las dosis terapéuticas empleadas en la medicina tradicional cubana. Vidal *et al.* (2003), también encontraron que para inducir efectos tóxicos en embriones de pollo, con una preparación similar del extracto, se requiere de dosis más altas a las terapéuticas; además, demostraron que las dosis empleadas en humanos para el tratamiento de enfermedades respiratorias, no produce toxicidad en ratas administradas durante 6 semanas por vía nasal. La DL₅₀ del extracto en ratones OF-1 de ambos sexos

administrados por vía i.p. fue de 731 mg/kg. También se detectó la presencia de azúcares reductores, taninos, flavonoides, antocianinas y alcaloides en el extracto.

En hígado y riñón de ratas alimentadas con una dieta que contenía el 6% de punicalagina por 37 días se encontró ácido elágico, ácido galágico y urutilina A (todos derivados de punicalagina). En el plasma de las mismas ratas se detectaron isómeros de punicalagina. Además, los análisis histopatológicos corroboraron la ausencia de toxicidad en hígado y riñón (Cerdea *et al.*, 2003).

Aunque la granada es una fruta segura para el consumo humano, algunos autores consideran que los extractos de cortezas y raíces son tóxicos por su alto contenido en alcaloides (Tripathi y Singh, 2000; Ferrara *et al.*, 1989; Fuentes *et al.*, 1985). El consumo de dosis altas de corteza puede provocar náuseas, vómitos y mareos. Desta (1995) registró una DL₅₀ de 2031 mg/kg en ratones administrados con un extracto hidroalcohólico de raíz por vía intraperitoneal.

El jugo de granada es una bebida segura para el consumo humano, a pesar de su alto contenido de punicalagina. No se encontraron efectos tóxicos en 10 sujetos sanos y 10 pacientes con DM2 que consumieron jugo de granada (50 mL diariamente durante tres meses) que contenía 1561 mg/L de punicalagina, 384 mg/L de antocianinas y 121 mg/L de derivados de ácido elágico (Rosenblat *et al.*, 2006).

Respecto a la cáscara, la administración diaria por 4 semanas de decocción acuosa de cáscara de granada (1.5% p/v) en ratas no produjo alteraciones significativas en el peso corporal, ni en los niveles de glóbulos rojos, glóbulos blancos y hemoglobina, en comparación con el grupo sin tratamiento (Khalil, 2004). Settheetham e Ishida (1995) demostraron que la administración de un extracto acuoso de cáscara de granada indujo la fragmentación de DNA, ocasionando apoptosis en células humanas. De manera contraria Okonogi *et al.* (2007) reportaron que un extracto etanólico de cáscara de granada obtenido por maceración y reextraído tres veces, promovió la proliferación de células CaCo-2 derivadas de colon humano y de células mononucleares extraídas de la sangre periférica de sujetos sanos con valores de concentración efectiva media (CE₅₀) de 4.7 y 44.4 µg/mL, respectivamente.

En relación con la flor, en un ensayo agudo (Jafri *et al.*, 2000) se demostró que un extracto de flores de granada (200-1000 mg/kg), obtenido mediante reflujo con etanol al 50% dentro de un baño con agua en ebullición por seis horas y reextraído cinco ocasiones más, no produjo cambios en la conducta, ni muerte en ratones administrados por vía intraperitoneal. Un efecto hepatoprotector de las flores de granada ha sido reportado por Kaur *et al.*, (2006), en este ensayo se realizó una extracción exhaustiva de las flores de granada con etanol en un sistema Soxhlet. Un pretratamiento (7 días) del extracto a 150 mg/kg por vía oral disminuyó el estrés oxidante y el daño hepático en ratones tratados con nitrilotriacetato férrico (Fe-NTA) a una dosis de 9 mg/kg.

2.6. Perfil farmacocinético de los componentes del jugo de granada

Por otro lado Seeram *et al.* (2006) analizaron el perfil farmacocinético del jugo de granada en 18 sujetos (10 hombres y 8 mujeres) con una edad promedio de 32.6 ± 10.2 años y un índice de masa corporal (IMC) de 21.3 ± 1.4 kg/m², quienes consumieron una sola dosis de 180 mL de jugo (318 mg de punicalagina y 12 mg ácido elágico libre). En el plasma de todos los sujetos se detectó ácido elágico en una concentración máxima de 0.06 ± 0.01 μmol/L, con un tiempo máximo de concentración de 0.98 ± 0.06 h y una vida media de eliminación de $0.71 \text{ h} \pm 0.08$ h. El glucurónido del ácido dimetilelágico fue encontrado en 15 de 18 sujetos en la orina del mismo día de consumo. La urolitina A (glucurónido) fue detectada en la orina de 11 sujetos un día después del consumo, mientras que el glucurónido de urolitina B se detectó en la orina de 3 sujetos el mismo día de consumo y en la orina de 5 sujetos al día siguiente.

Otro estudio realizado en 6 sujetos sanos (4 hombres y 2 mujeres) con una edad promedio de 27 años y un IMC de 21.2 ± 2.5 kg/m², quienes tomaron 1 L de jugo (4.37 g punicalagina) por 5 días, demostró la presencia de urolitinas y la ausencia de punicalagina y ácido elágico en plasma y orina. Por otro lado, no se presentaron cambios significativos en los parámetros sanguíneos, ni en los niveles de las enzimas hepáticas ALT, AST, ALP y GGT (Cerdea *et al.*, 2003). Los

resultados sugieren que los elagitaninos del jugo son metabolizados por la microflora intestinal en el colon.

2.7. Acciones farmacológicas asociadas con la administración de granada

2.7.1. Efecto de la granada sobre PPARs

Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs) son moléculas blanco implicada en el metabolismo de la glucosa, lípidos, y la regulación de la inflamación y oxidación en la DM y obesidad. Se trata de factores de transcripción dependientes de ligando, que regulan la expresión génica. La familia de los PPARs, está formada por tres miembros: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , cada uno con funciones específicas.

2.7.1.1. Efecto de la granada sobre PPAR γ

El PPAR γ participa en la absorción y almacenamiento de ácidos grasos, homeostasis de la glucosa e inflamación (Steals y Fruchart, 2005). PPAR γ se expresa en células endoteliales (Sato *et al.*, 1999), macrófagos (Nagy *et al.*, 1998), hepatocitos (Sung *et al.*, 2004) y adipocitos (Berger y Moller, 2002).

La activación sistémica de PPAR γ aumenta la sensibilidad a la insulina en animales y humanos resistentes a la insulina. PPAR γ actúa sobre la ruta de señalización de la insulina, revirtiendo el daño en la fosforilación de tirosina en el

sustrato del receptor de insulina (IRS) y aumentando la actividad de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), en la ruta de señalización de la insulina, permitiendo la translocación del transportador de glucosa dependiente de insulina (GLUT4) a la membrana celular y, posteriormente, la entrada de glucosa a la célula (Moller y Berger, 2003). Por otra parte, la activación de PPAR γ induce la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, entre éstos se incluyen a la proteína enlazante a ácidos grasos 4, la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK), acil-CoA sintasa, lipoprotein lipasa y la proteína transportadora de ácidos grasos 1 (Berger y Moller, 2002).

La administración oral diaria de un extracto metanólico de flores de granada (EFG) de 500 mg/kg, durante 6 semanas en ratas diabéticas y obesas Zucker (ZDF), aumentó la expresión del ARNm de PPAR γ y restauró la expresión del ARNm del GLUT-4 en células cardiacas del ventrículo izquierdo. En este mismo ensayo se demostró que el mismo extracto incrementó la expresión del ARNm y los niveles de la proteína PPAR γ y la actividad de la enzima lipoprotein lipasa en células de macrófagos humanos THP-1. Uno de los compuestos activos presentes en el extracto es el ácido gálico, el cual en concentraciones de 10 y 50 μ g/mL aumenta significativamente los niveles de PPAR γ (Huang *et al.*, 2005a).

2.7.1.2. Efecto de la granada sobre PPAR α

PPAR α desempeña un papel importante en el metabolismo de ácidos grasos (absorción, activación y β -oxidación), inflamación y funciones vasculares. PPAR α se expresa de manera abundante en tejidos metabólicamente activos como hígado, riñón, músculo esquelético, tejido adiposo marrón y corazón (Berger y Moller, 2002).

Huang *et al.* (2005b) reportaron que la administración oral (500 mg/kg/día) de un extracto metanólico de flores de granada redujo el contenido cardiaco de TG y disminuyó sus niveles en plasma, de ácidos grasos no esterificados y colesterol total en ratas ZDF. Este mismo tratamiento suprimió la sobreexpresión cardiaca de ARNm que codifica para la proteína transportadora de ácido grasos, PPAR α , carnitina palmitoiltransferasa-1, Acil-CoA oxidasa y la cinasa α 2 activada por 5'AMP y restauró los bajos niveles del ARNm de Acetil-CoA. Finalmente, el EFG aumentó la actividad de PPAR α en la línea celular 293 de embriocitos de riñón humano. El EFG contiene ácido gálico, ácido oleanólico (AO) y ácido ursólico. De estos tres compuestos, únicamente el AO (100 y 300 μ M), incrementó la actividad PPAR α . Este efecto fue suprimido por MK866 (20 μ M), un antagonista selectivo de PPAR α que es activado por fenofibrato (100 y 300 μ M), un agonista de PPAR α . El AO también aumentó la actividad PPAR α en las líneas HaCaT y CV-1 de queratinocitos (Liu, 2005).

2.7.2. Efectos de la granada sobre la fibrosis

En la diabetes, el corazón muestra un persistente riesgo a desarrollar fibrosis que lleva a rigidez miocárdica y finalmente, a disfunción ventricular y falla cardiaca (Li *et al.*, 2004). El comienzo de enfermedades coronarias en un corazón diabético es atribuido, en parte, al incremento en la expresión de fibronectina, seguido de una activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) y endotelina (ET)-1, está última promueve la síntesis de colágeno, promueve la proliferación de fibroblastos y reduce la actividad colagenolítica en corazón de ratas (Chen *et al.*, 2003; Guarda *et al.*, 1993).

Activadores de PPAR α como el fenofibrato y activadores de PPAR γ como la rosiglitazona previenen la fibrosis cardiaca y abrogan el incremento del ARNm de ET-1. Por tanto, los activadores PPAR están asociados a la disminución en la producción de ET-1 (Iglarz *et al.*, 2003).

En tinciones de van Gienson sobre ventrículo izquierdo y área media de arteria coronaria del corazón de ratas ZDF se observó que el EFG redujo el depósito de colágeno. Además, disminuyó la sobreexpresión del ARNm que codifica para fibronectina, colágeno 1 y 3, ET-1, ET_A y *c-jun*, pero no afectó la expresión de ET_B (Huang *et al.*, 2005c). Este hecho sugiere que el EFG reduce la fibrosis cardiaca vía ET-1/ET_A.

2.7.3. Efecto de la granada sobre la α -glucosidasa

La enzima α -glucosidasa (E.C. 3.2.1.20) es una de las glucosidasas localizadas en la membrana de las células del borde de cepillo intestinal. Esta enzima promueve la conversión de oligosacáridos y disacáridos a monosacáridos. Las glucosidasas no son esenciales para la digestión de carbohidratos, pero son vitales en el procesamiento de glicoproteínas y glicolípidos (Stuart *et al.*, 2004). Los inhibidores de las α -glucosidasas, no pueden prevenir la absorción intestinal de monosacáridos, pero pueden reducir los niveles de glucosa posprandial.

Ensayos *in vivo* mostraron que la administración oral de EFG (500 mg/kg) durante dos semanas redujo los niveles plasmáticos de glucosa en ratas ZDF con libre acceso a alimento, mientras que este efecto no fue observado en ratas ZDF y ZL (Zucker delgadas) sometidas a ayuno. Por otro lado, una sola administración de EFG (250, 500 y 1000 mg/kg, vía oral) una hora antes de una carga de sacarosa (1 g/kg) redujo los niveles séricos de glucosa en ratones ddY ayunados por 20 h; este efecto no se observó en ratones con carga de glucosa (0.5 mg/kg) ni en animales que no recibieron sacáridos. Además el EFG presentó un potente efecto inhibitorio sobre la actividad α -glucosidasa (IC₅₀: 1.8 μ g/mL). Estos resultados sugieren que el EFG puede mejorar los niveles de glucosa posprandial, en parte por la inhibición de la actividad α -glucosidasa intestinal (Li *et al.*, 2005).

2.7.4. Efecto de la granada sobre la aldosa reductasa

La aldosa reductasa (ALR2; E.C. 1.1.1.21) es la primera enzima de la ruta de los polioles y convierte la glucosa en sorbitol en presencia de NADPH como cofactor, posteriormente la sorbitol deshidrogenasa convierte el sorbitol en fructosa en presencia de NAD^+ (Soni *et al.*, 2008). Generalmente la ALR2 tiene poca afinidad por la glucosa, sin embargo en la diabetes mellitus se incrementa la formación y acumulación de sorbitol en tejidos no insulino dependientes, generando micro y macroangiopatías (Ueda *et al.*, 2004). La hiperglucemia aumenta la actividad ALR2, este aumento resulta en una disminución en la proporción $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$, que impacta en la actividad de otras enzimas NADPH dependientes, tales como la óxido nítrico sintasa y la glutatión reductasa (El-Kabbani *et al.*, 2004). Por otro lado, se genera un aumento en la proporción NADH/NAD^+ , con lo cual se bloquea la ruta glucolítica (acumulación de fructosa-3-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato); como consecuencia, la proteína cinasa C (PKC) es activada y se incrementa la formación de productos de glucosilación avanzada (Friedman, 1992). Los Inhibidores de la ALR2 como el epalrestat, tolrestat y zopolrestat previenen la reducción de glucosa a sorbitol y reducen el riesgo al desarrollo complicaciones en la DM.

El efecto inhibitorio sobre la ALR2 de un extracto metanólico de granada fue demostrado por Jung *et al.* (2003), sin embargo se desconoce cuáles son los compuestos responsables de este efecto. La granada contiene compuestos como el ácido elágico, ácido brevifolin, ácido clorogénico, todos ellos inhibidores de la ALR2 (de la Fuente y Manzanaro, 2003).

2.7.5. Efecto de la granada sobre TNF α e IL-6

Diferentes extractos de granada han mostrado efecto inhibitorio sobre estas citocinas y otros marcadores de inflamación como las ciclooxigenasas, lipooxigenasas, IL-1 β , metaloproteasas, proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y NF κ B (Shukla *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2005; Schubert *et al.*, 1999).

El tratamiento con dispositivos biodegradables que contenían pericarpio de granada redujo la placa dental, caries y las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6 en pacientes con periodontitis dental (Sastravaha *et al.*, 2005).

Un EFG metanólico inhibió la citotoxicidad inducida por TNF α en células L929. Los compuestos responsables del efecto inhibitorio fueron: 1,2,6-tri-O-galoil- β -D-glucopiranosas, 1,2-di-O-galoil-4,6-O-(S)-hexahidroxi-difeniloil- β -D-glucopiranosas, luteolina y los ácidos punicanólico, oleanólico, maslínico y asiático, todos ellos a una concentración de 30 μ M (Xie *et al.*, 2008).

2.7.6. Efecto de la granada sobre NF κ B

El NF κ B es una proteína que regula la transcripción de muchas moléculas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-2, TNF- α , IL-8, molécula de adhesión intracelular tipo 1 (ICAM-1), molécula de adhesión de la célula vascular (VCAM), óxido nítrico

sintasa (NOS) y ciclooxigenasa tipo 2 (Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez, 2007; Nakamori *et al.*, 2006; López, 2004; Gao *et al.*, 2002).

La granada es un potente inhibidor del NF κ B. Un extracto de granada estandarizado con base en su contenido de punicalagina, disminuyó la activación del NF κ B en células SKU-1064 de fibroblastos de piel humana expuestos a luz UV (Lisbeth *et al.*, 2008).

Por su parte, el vino de granada bloqueó la migración nuclear de la subunidad p65 de NF κ B inducida por TNF α y estrés mecánico en células endoteliales de aorta bovina (BAEC). En este mismo estudio se encontró que en BAEC tratadas con TNF α , el vino de granada inhibió la síntesis *de novo* de I κ B α ; sin embargo, no afectó la fosforilación y degradación de I κ B α ni la fosforilación en la serina⁵³⁶ de p65. Posteriormente se demostró que el tratamiento con vino de granada sobre BAEC promueve la fosforilación de I κ B α , y dicha fosforilación no se acompañó de degradación de I κ B α , ni translocación de p65. Finalmente se encontró que el ácido gálico, la quercetina y la catequina, aislados del vino de granada, inhiben la translocación de p65 en BAEC tratadas con TNF α (Schubert *et al.*, 2002).

En un ensayo *in vitro* se demostró que tanto el EFG como sus componentes, los ácidos oleanólico, ursólico y gálico, inhibieron la activación de NF κ B inducida por LPS en macrófagos de ratón tipo RAW264.7 (Huang *et al.*,

2005c). El ácido gálico impide la translocación nuclear del NF κ B inducida por TNF α y estrés mecánico en células vasculares endoteliales.

Además de inflamación, el NF κ B puede inhibir la muerte celular a través de la expresión de genes de supervivencia, por tal razón puede influir en el desarrollo de cáncer. Algunos estudios muestran que las MAPK están involucradas en la activación de NF κ B. Afaq *et al.* (2005) observaron que la aplicación tópica de un extracto de granada 30 minutos antes de la aplicación de TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) sobre la piel de ratones inhibe la activación de NF κ B e IKK α , así como la fosforilación y degradación de I κ B α inducidas por el promotor tumoral TPA. Además demostraron que este extracto impide la fosforilación de ERK 1/2, JNK 1/2 y p38, proteínas pertenecientes a la familia de las MAPK inducidas por TPA.

Como se mencionó antes, las flores de granada pueden regular la actividad de los PPAR; este efecto es importante ya que algunos estudios revelan que la activación de los PPARs (PPAR α y PPAR γ) genera efectos antiinflamatorios. Dicha activación suprime la migración de macrófagos, reduce la actividad del NF κ B y suprime la expresión de moléculas de adhesión mediada por citocinas (Ivashchenko *et al.*, 2007; Busik *et al.*, 2005; Moller y Berger, 2003).

2.7.7. Efecto de la granada sobre GSH

El efecto de una maceración de cáscara de granada (200 mg/kg) sobre los niveles de GSH en ratones con diabetes inducida con aloxana fue reportado por Parmar y Kar (2007). Ellos encontraron que la administración del extracto aumentó significativamente los niveles de GSH en hígado, corazón y riñón, en comparación con el grupo diabético sin tratamiento. Se ha reportado que un extracto metanólico de cáscara de granada elevó los niveles de GSH y GPx en animales con úlcera gástrica (Ajaikumar *et al.*, 2005).

Por otro lado, la administración oral de un EFG acuoso (250 y 500 mg/kg) durante 21 días en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina aumentó los niveles pancreáticos de GSH, GPx y GR en comparación con el grupo diabético (Bagri *et al.*, 2009). Roseblant *et al.* (2006) investigaron el efecto del consumo de jugo de granada (50 mL/día por tres meses) sobre los niveles de GSH y peróxidos en macrófagos y suero de pacientes con DM2 y encontraron que el jugo de granada redujo el contenido de peróxidos e incrementó los niveles de GSH en el suero y macrófagos de pacientes diabéticos.

2.7.8. Efecto de la granada sobre lipoperoxidación

Una maceración de cáscara de granada redujo los niveles de lipoperoxidación (LPO) en hígado, corazón y riñón en ratones que recibieron aloxana (Parmar y Kar, 2007). La administración de un extracto metanólico de cáscara de granada aminoró los niveles de LPO en animales con úlcera gástrica

(Ajaikumar *et al.*, 2005). También se encontró que el pretratamiento durante 14 días con un extracto acuoso de cáscara de granada disminuyó los niveles hepáticos de MDA en ratas tratadas con tetra cloruro de carbono (CCl₄) (Murthy *et al.*, 2002).

Singh *et al.*, (2002) observaron que un extracto metanólico de cáscara de granada (100 ppm) mostró un alto porcentaje de inhibición en la formación de MDA en hígado de rata y la oxidación de LDL en plasma de humanos voluntarios. La administración oral de un EFG acuoso (250 y 500 mg/kg durante 21 días) redujo los niveles séricos de LPO en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina (Bagri *et al.*, 2009). El consumo de jugo de granada (50 mL/día durante tres meses) disminuyó la captura de Ox-LDL en los macrófagos de pacientes con DM2 (Roseblant *et al.*, 2006). En otro estudio se encontró que el consumo de granada disminuyó la susceptibilidad de oxidación de LDL e incrementó la actividad de la paraoxonasa, una esterasa que puede proteger contra la LPO, en el suero de humanos sanos; además se demostró que el jugo de granada disminuyó la oxidación y captura de Ox-LDL en macrófagos peritoneales de ratones (Aviram *et al.*, 2000). Zhou *et al.* (2006) evidenciaron el efecto hepatoprotector de la granada contra la LPO en hígado de rata.

2.7.9. Efecto de la granada sobre SOD, CAT, GPx

La granada presenta efecto sobre algunas enzimas antioxidantes alteradas en la DM, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la GPx. La SOD dismuta el $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 , mientras que la CAT convierte el H_2O_2 en oxígeno molecular y agua.

La administración oral de un extracto acuoso de flores de granada (250 y 500 mg/kg) durante 21 días aumentó los niveles pancreáticos de SOD y CAT en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina (Bagri *et al.*, 2009). Por otro lado, se encontró que un pretratamiento durante 14 días de un extracto acuoso de cáscara de granada (50 mg/kg, en términos de equivalentes de catequina), preservó los niveles de CAT, GPx y SOD en hígado de ratas tratadas con CCl_4 (Murthy *et al.*, 2002). Los niveles de CAT y SOD fueron incrementados por efecto de la administración de un extracto metanólico de cáscara de granada en animales con úlcera gástrica inducida por aspirina y etanol (Ajaikumar *et al.*, 2005).

2.7.10. Efecto de la granada sobre el ONOO^-

El ONOO^- , se forma de la reacción entre $\cdot\text{O}_2^-$ y el $\cdot\text{NO}$. Las fuentes de producción de $\cdot\text{O}_2^-$ pueden ser no enzimática y enzimáticas, como NADH/NADPH oxidasa, xantina oxidasa (XO), lipooxigenasa (LOX), ciclooxigenasa (COX), sintasa del óxido nítrico (NOS) desacoplada, P450 oxidasa y citocromo b5. Por su parte el $\cdot\text{NO}$ es sintetizado por la NOS a partir de L-arginina, $\cdot\text{O}_2^-$ y NADPH. Existen tres isoformas de esta enzima, la tipo 1 o neuronal (nNOS), la tipo 2 o

inducible (iNOs) y la tipo 3 o endotelial (eNOS) (Sigaud-Roussel *et al.*, 2008; Chirino *et al.*, 2006; Pacher y Szabo, 2006).

La hiperglucemia favorece un incremento en la expresión de la iNOS y eNOS a través de la activación del NF κ B, lo cual lleva a un incremento de \cdot NO; este último puede convertirse en ONOO $^-$, lo que reduce la actividad del \cdot NO como vasodilatador en el endotelio (Spitaler y Graier, 2002; Consentino *et al.*, 1997).

El ONOO $^-$ genera disfunción cardiovascular a través de diversos mecanismos. El ONOO $^-$ rompe la cadena de ADN y activa a la poli (ADP-Ribosa) polimerasa-1, la cual induce la poli-ADP-ribosilación del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Esto provoca alteraciones metabólicas, activando las vías del NF κ B y la ruta de los polioles (Pacher y Szabo, 2006). También puede generar oxidaciones en las bases nitrogenadas (8-nitroguanina) y sobre las desoxirribosas, generando la ruptura de la cadena de ADN (Pacher *et al.*, 2007; Niles *et al.*, 2006; Burney *et al.*, 1999).

El ONOO $^-$ puede reaccionar de manera directa e indirecta con las proteínas. Tal es el caso de la hemoglobina, miohemoglobina y citromo C, en las cuales el Fe $^{2+}$ del grupo hemo es oxidado Fe $^{3+}$. También puede inactivar a la iNOS al modificar su grupo hemo presente en el extremo amino terminal (Pacher *et al.*, 2007). Además puede oxidar y nitrar algunos aminoácidos presentes en las proteínas. La oxidación del grupo tiol de la cisteína por el ONOO $^-$ puede inactivar

una gran cantidad de enzimas, entre éstas se encuentra la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Buchczyk *et al.*, 2003; Souza y Radi, 1998) y algunas enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial (Pacher *et al.*, 2007). Además, los tioles pueden reaccionar con el ONOO^- para formar $\cdot\text{RS}$. Por otro lado, ONOO^- puede oxidar de manera directa a la metionina, el triptófano y la histidina. La 3-nitrotirosina (3-NT) proviene de la nitración de la tirosina con $\cdot\text{NO}_2$ (puede provenir de ONOO^-), por tal razón la 3-NT se emplea como marcador de EOX. Ceriello *et al.* (2001), detectaron un incremento en los niveles de 3-NT en el plasma de pacientes con DM2. Por su parte, Tannous *et al.* (1999) encontraron una sobreproducción de ONOO^- dependiente de la iNOS en plaquetas de pacientes diabéticos. Del mismo modo se ha encontrado que en la hiperglucemia aumenta los niveles de 3-NT (Pacher y Zcabo, 2006).

El ONOO^- tiene la capacidad de oxidar los lípidos de las membranas, liposomas y lipoproteínas, tomando un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados. También es un potente oxidante de las LDL (Pacher *et al.*, 2007).

El efecto antioxidante del jugo de granada y de otras frutas fue reportado por Ignarro *et al.* (2006), quienes encontraron que el jugo de granada posee mayor capacidad de protección contra $\cdot\text{NO}$ que el jugo de uva y de mora. Por otro lado, Shukla *et al.* (2008), encontraron que el plasma de conejo obtenido 2 h después de la ingesta de un extracto de granada rico en polifenoles, inhibió la producción de óxido nítrico inducida por $\text{IL-1}\beta$ en condrocitos humanos.

El ácido gálico, catequina, epicatequina y epigallocatequina 3-galato (Nakagawa y Yokozawa, 2002; Pannala *et al.*, 1997) son algunos ejemplos de los fitoquímicos encontrados en la granada que tienen la capacidad de secuestrar al ONOO^- , previniendo la nitración de tirosinas. El ácido elágico fue encontrado como un potente inhibidor de oxidación de la dicloro-dihidro-fluoresceína inducida por 3-morfolinosidnonimina, un generador de ONOO^- (Ippoushi *et al.*, 2009). La rutina y ácido ursólico previenen la ruptura de la cadena de ADN inducida por 3-morfolinosidnonimina (Moon *et al.*, 2006). En un extracto de ginseng se encontró que los ácidos *p*-coumárico y ferúlico son compuestos secuestradores de ONOO^- (Kang *et al.*, 2009), estos compuestos también se encuentran en la granada.

3. Justificación

Los estudios científicos relacionados con las propiedades antidiabéticas de la granada están basados en el empleo de extractos hidroalcohólicos de las flores del árbol de granada, por otro lado son pocos los ensayos que muestran cuáles son los fitoquímicos (compuestos) que se encuentran en dichos extractos. Otro punto que destaca es el tipo de animales de experimentación y el origen de las especies vegetales, puesto que la granada ha sido empleada desde tiempos ancestrales en la herbolaría de la India, la mayoría de los reportes publicados sobre la actividad antidiabética de la granada han sido realizados usando el jugo y las flores del granado provenientes de la india y ratas como animales de experimentación. Actualmente no existe ningún documento que muestre la actividad antidiabética de la cáscara de granada cultivada en el país.

La cáscara de granada contiene una gran variedad de compuestos polifenólicos, en especial elagitaninos, siendo el más abundante la punicalagina, de la cual no hay estándar comercial a la venta. El ácido elágico es un monofenol que resulta de la hidrólisis de los elagitaninos y representa un producto con relevancia económica.

Por otro lado, considerando que la DM es la principal causa de mortalidad, que tiene una alta prevalencia en el país, los altos gastos que se generan para su control y tomando en cuenta que el padecimiento en cuestión no es curable sino controlable, se justifica la investigación y desarrollo de nuevas alternativas de

tratamiento.

En particular, los pocos estudios antidiabéticos realizados con la cáscara de granada y el alto contenido de compuestos fenólicos que contiene la cáscara de la granada mexicana, permiten proponerla para el desarrollo de fitomedicamentos, nutraceúticos o alimentos funcionales, que ayuden a regular los altos niveles de glucosa en sangre y aminoren las complicaciones que afectan a las personas diabéticas. Además, se estaría evaluando el potencial de un subproducto de la fruta ya que en México la cáscara de granada se considera un desperdicio y no tiene aplicación importante, lo que la hace económicamente rentable.

En esta propuesta se plantea el diseño y la elaboración de un producto alimenticio adicionado con fitoquímicos antioxidantes de cáscara de granada mexicana que ayude a controlar algunos marcadores bioquímicos alterados en la DM.

4. Hipótesis

Si la cáscara de granada (*Punica granatum* L.) tiene compuestos con actividad hipoglucemiante, antioxidante y antiinflamatoria, entonces es posible desarrollar de ella un alimento funcional para el control de la DM.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Diseñar y elaborar un alimento funcional de granada adicionado con fitoquímicos de cáscara de granada roja (*Punica granatum* L.) con posible utilidad para el control de la DM.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Analizar bromatológicamente la cáscara de granada y obtener su extracto acuoso.

5.2.2. Evaluar el efecto hipoglucémico y seleccionar la dosis efectiva del extracto obtenido.

5.2.3. Determinar la dosis letal media de dicho extracto para las vías oral e intraperitoneal en ratones sanos.

5.2.4. Diseñar, elaborar y analizar una jalea de jugo de granada reducida en azúcar y adicionada con el extracto estudiado.

5.2.5. Determinar el efecto de la jalea sobre la glucemia y algunos marcadores de estrés oxidante e inflamación en la DM.

6. Material y Métodos

6.1. Preparación de la cáscara de granada y obtención del extracto

6.1.1. Obtención de la materia prima

Para esta investigación se emplearon cáscaras de granada roja (*Punica granatum* L.) como materia prima para la obtención de extracto vegetal. Las cáscaras de granada fueron recolectadas de una granja local en la región de Arteaga, Coahuila, México, en septiembre del 2008. La identificación botánica del material vegetal fue realizada en el Departamento de Botánica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila, México.

6.1.2. Análisis bromatológico de las cáscaras de granada

Las cáscaras fueron lavadas con agua potable en dos ocasiones para eliminar la tierra presente, posteriormente fueron secadas a temperatura ambiente, molidas en un molino manual y almacenadas en un recipiente de vidrio de cierre hermético, forrado para evitar la exposición directa a la luz. El porcentaje de materia seca, ceniza, grasa cruda, proteína total y fibra cruda fue determinado siguiendo los procedimientos oficiales de la AOAC (1992). Los azúcares totales fueron determinados por el método espectrofotométrico fenol-ácido sulfúrico reportado por Dubois *et al.* (1956). El contenido de azúcares reductores fue evaluado con la reducción del ácido dinitrosalicílico reportada por Miller (1989).

Los fenoles totales fueron determinados con el método de Folin-Ciocalteu reportado por Ventura *et al.* (2008). La separación y cuantificación de ácido gálico, ácido elágico y catequina fue realizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) en el Departamento de Investigación en Alimentos (DIA), en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila en Saltillo, Coahuila, México.

6.1.3. Obtención del extracto acuoso de la cáscara de granada

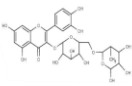
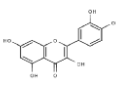
Se preparó una decocción acuosa a partir de las cáscaras. Brevemente, 40 g de cáscara molida y seca fueron hervidos durante 10 minutos con 300 mL de agua desionizada, es decir en una proporción 4:30 (p/v). Después de la extracción, todo el material fue filtrado con tela de tul, el líquido fue reservado y la cáscara fue extraída dos ocasiones más. Posteriormente todo el extracto fue centrifugado a 1360 x g por 10 min a 4 °C y el sobrenadante fue liofilizado. El extracto en polvo fue guardado en recipientes con cierre hermético y almacenado protegido de la luz.


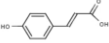

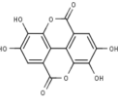
6.1.4. Análisis de monómeros fenólicos en el extracto por HPLC

El análisis de monómeros fenólicos fue realizado en un equipo de HPLC Waters® compuesto por un módulo de separación modelo e2695 y un detector con dispositivo de diodos modelo Waters 2998. En las condiciones analíticas, se

utilizó una columna de fase reversa Altima® HP C18 HL (53 x 7 mm, 3 µm; Grace Alltech, Deerfield, IL, USA), un volumen de inyección de 20 µL y un sistema de binario de solventes en gradiente, formado por un solvente polar (ácido en agua) y un solvente menos polar (metanol o CH₃CN). El extracto de granada fue solubilizado en agua grado ultra pura en una concentración de 2000 a 4000 ppm. Los estándares fenólicos se trabajaron en un rango de concentración de 0 a 500 ppm, las condiciones comatográficas de los mismos se encuentran resumidas en la Tabla 2. Todos los análisis fueron realizados por duplicado. La longitud de onda para determinación del área del pico fue seleccionada de acuerdo al tipo de compuesto fenólico. La integración de los cromatogramas fue realizada con ayuda del programa Empower de Waters®. Por otro lado, también el contenido de fenoles totales fue determinado.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para la determinación de estándares fenólicos.

Estructura	Monómeros fenólicos	Tiempo de Retención (min)	de Velocidad de flujo (mL/min)	Fase móvil	UV λ _{max} (nm)	UV λ _{anal} (nm)
	Hidrato de rutina (R)	7.36	1	A: CF ₃ COOH en agua, 5%, v/v. B: CH ₃ CN/CH ₃ OH, 1:1, v/v.	256.3, 385.1	300
	Hidrato de quercetina (Q)	16.7	1	A: CF ₃ COOH in en agua, 5%, v/v. B: CH ₃ CN/CH ₃ OH, 1:1, v/v.	255.1, 364.4	300

	Catequina (C)	10.9	0.1	A: CH ₃ CN B: CH ₃ OH	278.8	280
	Ácido p-cumárico (AC)	7.6	1	A: CF ₃ COOH en agua, 5%, v/v B: CH ₃ CN/CH ₃ OH, 1:1, v/v.	226.7, 309.7	300
	Ácido gálico (AG)	3.7	0.3	A: CH ₃ CN B: CH ₃ OH	215.1, 271.7	280
	Ácido elágico (AE)	11.3	0.3	A: CH ₃ OH B: HCOOH en agua, 5%, v/v.	253.9,364.4	255

6.2. Selección del extracto de cáscara de granada

6.2.1. Animales y protocolos de investigación

Para todos los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones macho cepa CD1 de 20-40 gramos de peso corporal, de seis a ocho semanas de edad. Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I) y de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), quienes se apegan a los lineamientos contemplados en la NOM-062-ZOO-1999. El suministro de agua y alimento a los animales fue *ad libitum*, excepto cuando se requirieron condiciones de ayuno.

6.2.2. Efecto agudo del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia de ratones sanos

Para el ensayo agudo se probaron diferentes dosis del extracto de cáscara de granada (62.5, 125, 250 y 500 mg/kg). Los extractos fueron disueltos al momento de la administración con agua desionizada que fue usada como vehículo. Se realizó una sola administración intraperitoneal (i.p.) del extracto o del vehículo en ratones sanos con 12 h de ayuno. La glucemia fue determinada con un glucómetro (Accu- Chek®, Roche), tomando una muestra de sangre de la vena caudal, mediante punción con efracción de la epidermis de la cola del animal, antes y 120, 240, y 360 min después de la administración de los tratamientos. Cada grupo estuvo integrado por seis ratones.

6.2.3. Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia en ratones sanos

Ratones sin ayuno fueron divididos en tres grupos (n=5). Grupo 1 o control recibió agua, el grupo 2 recibió una dosis de 1 mg/kg extracto de cáscara de granada y el grupo 3 recibió extracto en una dosis de 10 mg/kg. Los tratamientos fueron administrados por vía intragástrica diariamente durante tres semanas. Los niveles de glucemia en animales sin ayuno fueron medidos cada semana.

6.2.4. Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre la curva de tolerancia a la glucosa en ratones sanos

Se formaron cinco grupos con ratones sanos no ayunados (n=6). Grupo 1 recibió agua, los grupo 2, 3, y 4 recibieron extracto de cáscara de granada en las dosis 10, 25 y 50 mg/kg respectivamente y el grupo 5 recibió pioglitazona a una dosis de 0.6 mg/kg. Los tratamientos fueron administrados por vía intragástrica diariamente durante 3 semanas. Las curvas de tolerancia a la glucosa fueron realizadas a los 7 y 21 días después de la administración de los tratamientos. Brevemente, ratones con ayuno de 12 h, fueron pesados y posteriormente se les administró por vía intragástrica una solución de glucosa (5 g en 10 mL agua) preparada en el momento en una dosis de 2 g/kg. Las glucemias fueron medidas antes y 30, 60, 90 y 120 min después de la administración de la glucosa. El área bajo la curva y la concentración media de glucosa durante la misma fue calculada con la ayuda del programa estadístico NCSS.

6.2.5. Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia en ratones diabéticos

6.2.5.1. Inducción de diabetes con STZ

Animales sanos (n=50) con acceso libre a agua y alimento fueron separados en cinco grupos de diez animales para cada tratamiento. Los grupos 2 a 5 con animales sin ayuno, recibieron una sola administración intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) a una dosis de 137 mg/kg disuelta en buffer de citratos estéril (0.1 M, pH 4.5), preparada justo antes de su administración. El grupo 1

recibió el mismo volumen de buffer de citratos. Se trabajó con una solución de 13.7 mg STZ/mL y se administraron 0.1 mL por cada 10 g de peso. El desarrollo de diabetes fue confirmado hiperglucemia (≥ 250 mg/dL) y pérdida de peso en ratones sin ayuno, dos semanas después de la administración de la STZ. La STZ fue administrada en un lapso no mayor a 15 min después de su resuspensión con buffer de citratos.

6.2.5.2. Administración de tratamientos

Los grupos 1 y 2 recibieron agua, sano (S) y diabético (D), respectivamente. Los grupos 3 y 4 recibieron extracto de granada a las dosis 10 y 25 mg/kg, respectivamente, y el grupo 5 recibió pioglitazona (0.6 mg/kg). Los tratamientos fueron administrados diariamente por vía intragástrica durante 30 días. El peso de los animales fue registrado una vez por semana desde el principio hasta el final de los tratamientos.

6.2.5.3. Determinación de glucemias

Al concluir los tratamientos, se determinaron las glucemias en ayuno (12 h) y posprandiales. Para determinar las glucemias posprandiales, los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 h y posteriormente se les dejó con libre acceso al alimento durante dos horas. Debido a que la sangre de los animales diabéticos

es más espesa de lo normal, para medir la glucemia se tomó una muestra de la vena caudal, cortando la punta de la cola con tijeras.

6.2.5.4. Obtención de suero y determinación de insulina

Después de medir las glucemias, los animales fueron anestesiados con pentobarbital. La sangre fue recolectada del seno orbital, después fue centrifugada a 1000 x g por 10 min a 4 °C, finalmente el suero fue separado y almacenado a -70°C. La insulina sérica fue determinada siguiendo las instrucciones del fabricante mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) adquirido de Millipore® (EZRM1-13K).

6.3. Determinación de la dosis letal media (DL₅₀)

6.3.1. Determinación de la DL₅₀ para la vía oral e intraperitoneal

Las curvas dosis-respuesta cuantales fueron determinadas usando ratones macho CD1 proporcionados por el bioterio de la facultad de Medicina de la UNAM. Para ambas vías se formaron diferentes grupo con ocho animales sin ayuno cada uno; todos recibieron una sola administración del extracto en un volumen de 10 mL/Kg. Brevemente, diferentes dosis espaciadas logarítmicamente de extracto de cáscara de granada (500, 792.5, 1256, 1990.5 y 3155 mg/kg) fueron administradas por vía intragástrica con ayuda de una cánula, mientras que para la vía intraperitoneal se inyectó en la cavidad peritoneal (50, 71.5, 102, 147 y 210

mg/kg). Los grupos control recibieron el mismo volumen de agua. Después de las administraciones, durante las siguientes 4 h se observaron los signos de toxicidad y mortalidad. En todos los casos la temperatura rectal fue registrada antes y 30, 60, 120 y 240 min después de las administración del extracto con un termómetro rectal (Tele-Thermometer YSI-44TA ®).

6.4. Diseño, elaboración y análisis de la jalea de jugo de granada

Esto experimentos fueron realizados en el DIA, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, en Saltillo, Coahuila, México.

6.4.1. Componentes de la jalea

Jugo de granada (del Valle®), sucralosa (Splenda®), benzoato de sodio, agua potable, gomas guar (G), xantana (X) y tragacanto (T) grado comercial fueron comprados en un negocio de materias primas local. Las características relevantes del jugo fueron: pH 3.63, sólidos solubles 14%, carbohidratos 12.5 % y sodio 0.02%. Nota: Este jugo contenía jugo de granada y manzana. Todos los ingredientes son reconocidos como seguros o GRAS (por sus siglas en inglés). La cantidad de benzoato de sodio y sucralosa fue adicionada de acuerdo a los especificado en la normas internacionales del Codex Alimentario las normas CODEX STAN 296-2009 y CODEX STAN 192-195 y a las normas mexicanas NOM-130-SSA1-1995 y NOM-086-SSA1-1994.

6.4.2. Diseño y selección de la jalea base

La concentración final de goma (1%) fue determinada mediante un ensayo preliminar no mostrado, la concentración de extracto de cáscara de granada (PE) correspondió a la dosis 25 mg/kg, dosis con efecto sobre la glucemia de ratones sanos y diabéticos. Se elaboraron diferentes jaleas empleando las gomas de manera individual y en combinaciones: G (1), X(1), T(1), XG(1:1), XT (1:1), TG (1:1) y XGT (1:1:1). El pH, °Brix, A_w y las propiedades reológicas fueron determinados para cada jalea. Mediante el comportamiento reológico se decidió trabajar con las jaleas preparadas con la combinación de gomas (XGT).

6.4.3. Preparación de las jaleas

Las jaleas fueron preparadas mezclando en agua caliente jugo de granada, sucralosa, benzoato de sodio y extracto de cáscara de granada. Esta combinación se mantuvo en constante agitación sobre una parrilla de calentamiento y agitación, mientras que las gomas fueron agregadas lentamente para evitar la formación de grumos, finalmente los recipientes fueron tapados y hervidos durante 1 min. Las jaleas en forma de líquido viscoso, fueron inmediatamente vaciadas dentro de envases de vidrio con cierre hermético y posteriormente fueron cerrados. Los envases fueron sumergidos completamente en agua hirviendo por 5 min, después se dejó que las jaleas tomaran la temperatura ambiente y por último fueron

almacenadas a 4 °C. Como blanco se empleó una dispersión coloidal integrada por la combinación de gomas (XGT), sucralosa, benzoato de sodio y agua, es decir, sin jugo ni extracto. Dos muestras de jalea sin extracto (J), jalea con extracto (JE) y blanco fueron mantenidas a temperatura ambiente antes de cada análisis. Los análisis físicos, químicos y antioxidantes se realizaron en la semana 0 y 8. El análisis microbiológico fue llevado a cabo una vez por semana durante 8 semanas. La evaluación sensorial se realizó con muestras recientes, es decir muestras preparadas un día antes de su evaluación.

6.4.4. Análisis físico de las jaleas

El pH de las muestras fue determinado usando un potenciómetro (Thermo Orion 420®). Los sólidos totales expresados como °Brix, fueron medidos con un refractómetro (Atago®). La actividad de agua (A_w) analizada en un aparato Aqualab® series 3 (Decagon Devices, Inc.) El color fue medido en términos del CIELab (L^* , a^* y b^*) usando un colorímetro Eye XTS®. L^* representa luminosidad, a^* representa el eje de rojo (+) a verde (-) y b^* representa el eje de amarillo (+) a azul (-). Las mediciones reológicas se realizaron en un reómetro (Paar Physica® modelos 200 y 300), con geometrías de plato y velocidades de corte de 10^{-2} a 10^3 s para la selección y 10^{-3} a 10^3 para la vida de anaquel.

6.4.5. Análisis químico de las jaleas

Para la información nutrimental se analizó el contenido de azúcares totales (Dubois *et al.*, 1956), proteína y grasas totales (AOAC, 1992), en el departamento de Ciencias de los Alimentos y Nutrición de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila, México. Las jaleas fueron diluidas con agua destilada (1/5, v/v), para su posterior análisis. Los fenoles totales fueron reportados como equivalentes de ácido gálico (EAG). Las proantocianidinas o taninos condensados se midieron mediante el ensayo de HCl-butanol (Ventura *et al.*, 2008) y reportados como equivalentes de catequina (EC). Los tioles totales fueron reportados como equivalentes de glutathion (EGSH), con el reactivo de Ellman mediante una modificación al método reportado por Hu *et al.* (1998).

6.4.6. Análisis antioxidante de las jaleas

Las jaleas fueron diluidas con agua destilada (1/10, v/v) y el extracto de cáscara de granada (E) fue preparado a 500 ppm en agua destilada. Se emplearon dos métodos de atrapamiento o reducción de radicales sintéticos para evaluar la capacidad de la muestra para inhibir los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•]. El método del ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6- ácido sulfónico] se realizó según lo reportado por Re *et al.* (1999) y el método del DPPH [2,2-difenil-1-picril-hidracilo] citado por Brand-Williams *et al.* (1995). El tercer método empleado fue el reportado por Starzyńska-Janiszewska *et al.* (2008) que consiste en inhibir la autoxidación del ácido linoléico.

6.4.7. Análisis microbiológico de las jaleas

Para evaluar la calidad microbiológica de los productos, dos muestras de jalea fueron analizadas una vez por semana durante ocho semanas. Las jaleas fueron preparadas y diluidas de acuerdo con la NOM-110-SSA1-1994. Se realizó la cuenta en placa de coliformes totales (NOM-113-SSA1-1994), bacterias aerobias (NOM-092-SSA1-1994), mohos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994) y patógenos que incluyó la presencia de *Salmonella* (NOM-114-SSA1-1994) y *Staphylococcus aureus* (NOM-115-SSA1-1994).

6.4.8. Análisis sensorial de las jaleas

El nivel de agrado se realizó con un panel de 60 estudiantes (22 hombres y 38 mujeres) de la Facultad de Ciencias Químicas, en el laboratorio de Análisis sensorial del DIA, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad, Autónoma de Coahuila. El sabor a granada, dulce y amargo, astringencia, acidez, apariencia, consistencia, color, olor y nivel de agrado general de las jaleas fueron evaluados usando una escala hedónica de siete puntos (1= Me disgusta muchísimo y 7= me gusta muchísimo). Adicionalmente, las preguntas ¿Es usted diabético? y ¿Tienes familiares diabéticos? fueron incluidas en la hoja de respuesta. Cada estudiante probó la J, JE y jugos con aditivos (sin aditivos). Las muestras fueron preparadas un días antes y dejadas a temperatura ambiente antes de ser servidas. Las jaleas y el jugo fueron servidos sobre cucharas (5 g) y

en envases de plástico (10 mL) respectivamente, a las muestras se le asignó un código de tres números al azar. Antes de comenzar la prueba a los panelistas se le dio la instrucción de que se enjuagaran la boca con agua potable antes de probar cada muestra para minimizar los efectos de sabores residuales.

6.5. Actividad biológica *in vivo* de la jalea con extracto

Esta parte se dividió en dos experimentos *in vivo*, el primero fue determinar el efecto subagudo de la JE sobre la glucemia, algunos marcadores de inflamación y estrés oxidante en animales diabéticos. El segundo fue determinar el efecto subagudo de la JE sobre la glucemia y algunos marcadores de estrés oxidante e inflamación en animales sanos.

6.5.1. Efecto de la jalea con extracto en animales diabéticos

6.5.1.1. Inducción de diabetes con múltiples dosis bajas de STZ

Ratones sanos con acceso libre al agua y alimento fueron separados en tres grupos de cinco animales cada uno. Los grupos 2 y 3 sin ayuno recibieron diariamente una administración de 40 mg/kg STZ disuelta en buffer de citratos (0.1 M, pH 4.5) durante cuatro días consecutivos. El grupo 1 o sano recibió el mismo volumen de vehículo, en este caso buffer de citratos. El volumen de administración en todos los casos fue 10 mL/kg. Las glucemias fueron determinadas 4 semanas después de la primera administración de la STZ en sin ayuno.

6.5.1.2. Administración de los tratamientos

Los grupos 1 y 2, sano (S) y diabético (D), respectivamente, recibieron agua y el grupo 3 recibió 25 mg/kg de JE. Los tratamientos fueron administrados por vía intragástrica durante 4 semanas. En el caso de la JE, este fluido de comportamiento reológico pseudoplástico, fluyó libremente a través de las cánula.

6.5.1.3. Determinación de glucemias

Al concluir los tratamientos se determinaron las glucemias en ayuno y posprandiales. Los animales fueron mantuvieron en ayunas durante 12 h y posteriormente se les dió libre acceso al alimento durante dos horas.

6.5.1.4. Obtención del suero y determinación de $TNF\alpha$ e IL-6

Después de medir las glucemias, los animales fueron anestesiados con pentobarbital. La sangre fue recolectada del seno orbital, después fue centrifugada a 1000 x g por 10 min a 4 °C, finalmente el suero fue separado y almacenado a -70 °C. $TNF\alpha$ e IL-6 fueron determinada mediante ensayos de ELISA de la marca Thermo Scientific®, EMTNFa y EM216, respectivamente.

6.5.1.5. Obtención de tejidos y análisis de estrés oxidante

Después de obtener la sangre, el hígado, riñón, corazón y páncreas fueron extirpados rápidamente para evitar su degeneración. Los tejidos fueron lavados con solución salina fría, limpiados, cortados y almacenados a -70 °C. Los biomarcadores de estrés oxidante (EOx) seleccionados fueron malondialdehído y catalasa. La lipoperoxidación, expresada como nmol MDA/g proteína, fue determinada por la reacción de 2 moléculas 1-Metil-2-fenilindol (indol) con el malondialdehído (aldehído), un producto final de lipoperoxidación (Gérad-Monier *et al.*, 1998). La actividad catalasa, expresada en U/mg de proteína, fue determinada midiendo la disminución de absorbancia debida a la degradación del H₂O₂ a 240 nm (Aebi, 1984). Una unidad de catalasa es definida como la cantidad de enzima necesaria para descomponer 1 μmol de H₂O₂ por minuto. Los resultados fueron normalizados por cantidad de proteína determinada con el reactivo de Bradford (Biorad®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.5.2. Efecto de la jalea con extracto en animales sanos

Los ratones fueron separados en cuatro grupos de seis animales cada uno. Grupo 1 o control recibió agua; grupo 2 recibió 25 mg/kg de E; grupo 3 recibió 25 mg/kg de JE y grupo 4 recibió 25 mg/kg de J. Los tratamientos fueron administrados por vía intragástrica durante 3 semanas. Después de dos semanas de tratamiento se realizó una curva de tolerancia a la glucosa, de la manera antes descrita. Al terminar los tratamientos se removió el hígado y el páncreas de los

animales de la manera antes descrita. Los marcadores de estrés oxidante seleccionados fueron MDA, actividad catalasa y relación glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG). La relación GSH/GSSG (glutatión reducido/glutatión oxidado) se midió con un kit comercial marca Calbiochem®. Los niveles de IL1- β y TNF- α en homogenizados de proteína de páncreas fueron determinados con dos kits comerciales (Prepotech®).

6.6. Análisis estadístico

Los datos representan la media \pm el error estándar (E.S.). El programa computacional NCSS versión 2001 fue usado para el análisis estadístico. Las comparaciones estadísticas dentro del mismo grupo fueron realizadas con un análisis de varianza (ANOVA) de medias repetidas. Para las comparaciones entre grupos se empleó un ANOVA de una sola vía, seguidas de Tukey y Kramer como prueba complementaria. En el caso de la comparación de dos grupos, ésta fue realizada con la prueba de t de Student de dos muestras.

7. Resultados

7.1. Preparación de la cáscara de granada y obtención del extracto

7.1.1. Análisis bromatológico de la cáscara de granada

La composición bromatológica y el contenido de ácido gálico, ácido elágico y catequina de la cáscara de granada se muestran en la Tabla 3. La cantidad de azúcares totales y fibra cruda fue mayor al contenido de grasa cruda y proteína total. Por otro lado, se encontró un elevado porcentaje de fenoles totales expresados en gramos de equivalentes de ácido gálico (g EAG/ 100 g de cáscara seca). El contenido de compuestos fenólicos monoméricos se detectó en el siguiente orden decreciente ácido gálico > catequina > ácido elágico.

Tabla 3. Análisis bromatológico de la cáscara de granada expresado en g por 100 g de materia seca.

Parámetro	(%)
Materia seca	95.0 ± 1.3
Humedad	5.5 ± 1.5
Ceniza	3.6 ± 0.08
Grasa Cruda	3.6 ± 0.38
Proteína total	1.3 ± 0.17
Fibra cruda	17.8 ± 1.61
Azúcares totales	16.1 ± 0.61
Azúcares reductores	4.4 ± 0.01
Fenoles totales	6.1 ± 1.83
Ácido elágico	0.26 ± 0.08
Acido gálico	4.32 ± 0.00
Catequina	1.9 ± 0.00

Los resultados expresan la media de dos experimentos ± la desviación estándar.

7.1.2. Análisis de monómeros fenólicos en el extracto acuoso de la cáscara de granada por HPLC

Para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto acuoso (Tabla 4) se realizó un análisis por HPLC. Se compararon los picos cromatográficos, espectro UV y tiempos de retención con los estándares. Se detectó la presencia de ácido elágico en una concentración de 14.22 mg/g de extracto, mientras que el cálculo por gramo de cáscara fue de 7.11 ± 0.1 mg AE. Los hidratos de rutina y quercetina, la catequina, el ácido *p*-cumárico y el ácido elágico no fueron identificados en el extracto. Con el proceso de extracción se incrementó un 82% en contenido de EAG en la cáscara, mientras que en la decocción en polvo se detectó un aumento de más de 280%, en comparación con los fenoles totales presentes en la cáscara de granada seca sin procesar.

Tabla 4. Cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto de cáscara de granada.

Tipo de compuesto	Nombre común	mg/g E
Flavonol	Rutina	N.D.
	Quercetina	N.D.
Flavan-3-ol	Catequina	N.D.
Ácido hidroxicinámico	Ácido <i>p</i> -cumárico	N.D.
Ácido hidroxibenzóico	Ácido gálico	N.D.
	Ácido elágico	14.22 ± 0.21
Fenoles totales	g EAG/ 100 g cascara (%)	g EAG/ 100 g extracto (%)
	11.11 ± 0.19	22.23 ± 0.38

**Los valores representan la media de dos experimentos ± la desviación estándar.
N.D. = No detectado g EAG= gramos de equivalentes de ácido gálico.**

7.2. Selección del extracto de cáscara de granada

7.2.1. Efecto agudo del extracto sobre la glucemia en ratones sanos en ayunas

Los valores basales de glucemia en ratones sanos se observan en la figura 1 A y B. Después de 2 h de la administración intraperitoneal de diferentes dosis de cáscara de granada se observa un incremento en la glucemia dependiente de la dosis, con respecto al grupo control. No se detectó efecto hipoglucémico para ninguna dosis (Figura 1A). Sin embargo, a dosis menores (62.5 mg/kg) la decocción de cáscara de granada produjo disminución significativa ($P \leq 0.05$) de la glucemia comparado con sus niveles basales a los 360 min (Figura 1B). Por otro lado, se observó un 100% de letalidad en los animales que recibieron las dosis más grandes (250 y 500 mg/kg) por vía oral después de 14 días de la administración.

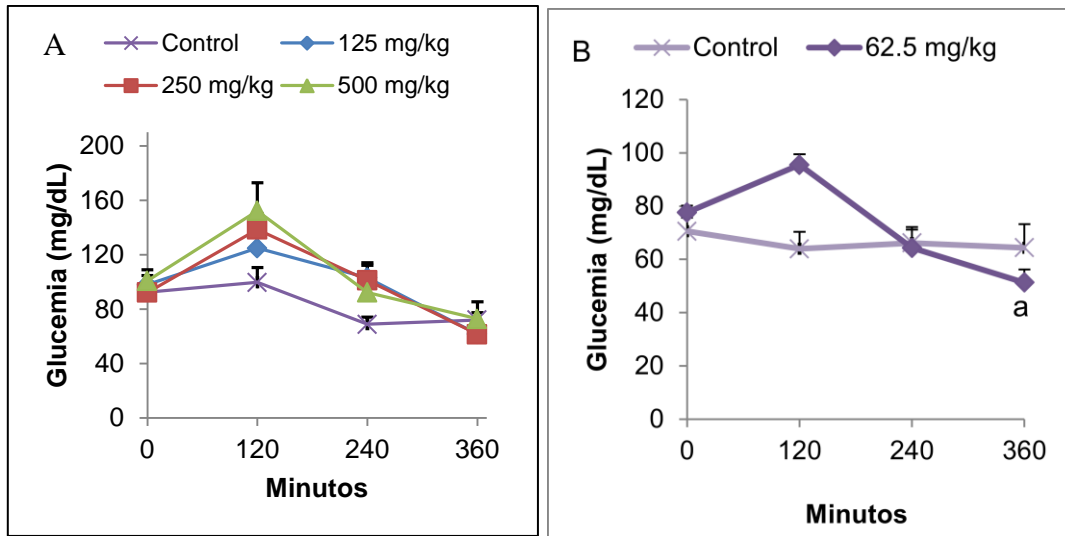


Figura 1. Efecto de la administración aguda intraperitoneal de diferentes dosis del extracto de granada sobre la glucemia en ratones ayunados sanos. Los datos representan la media \pm E.S. (n=6). * $P \leq 0.05$ comparados con el grupo control y ^a $P \leq 0.05$ comparado con los niveles basales.

7.2.2. Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia de ratones sanos

Desde la primera hasta la tercera semana de administración oral de 10 mg/kg de extracto de cáscara de granada se observó una disminución significativa ($P \leq 0.01$ y 0.05) en las glucemias en comparación con el grupo control (Figura 2A). No se presentó efecto hipoglucémico con la dosis menor del extracto de cáscara de granada (1 mg/kg) durante todo el tratamiento. El peso de los animales no fue alterado por la administración del extracto de granada (Figura 2B).

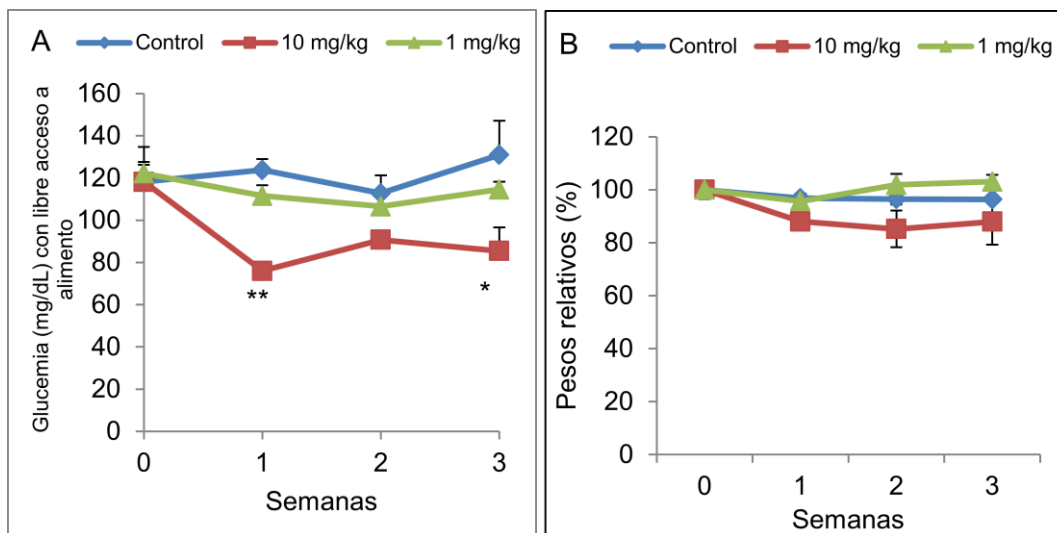


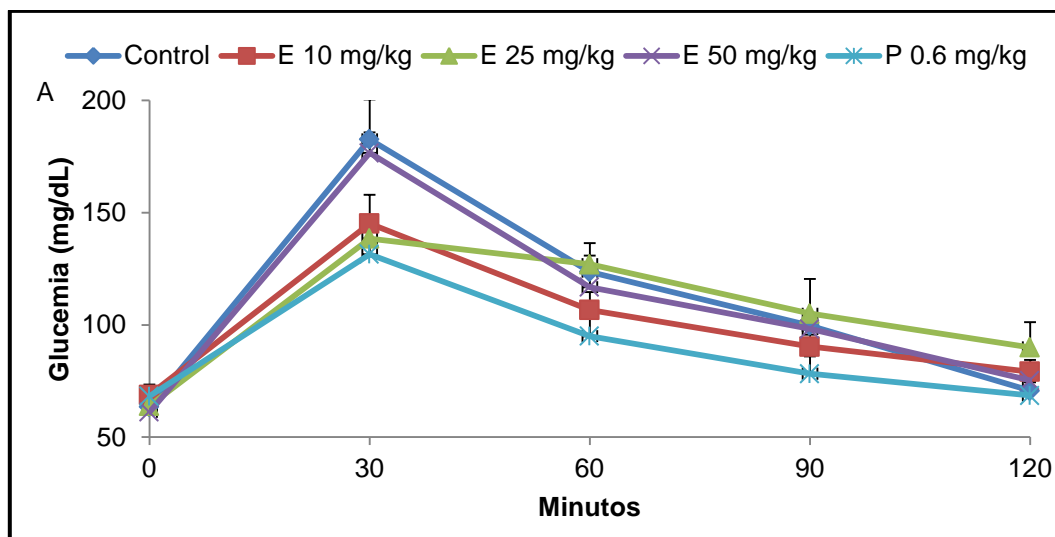
Figura 2. Efecto de la administración oral subaguda de dos dosis del extracto de granada (10 y 1 mg/kg) sobre la glucemia (A) y el peso corporal en ratones sanos sin ayuno (B). Los datos representan la media \pm E.S. (n=5). ** $P \leq 0.01$ y * $P \leq 0.05$ comparados con el grupo control.

7.2.3. Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre la curva de tolerancia a la glucosa en ratones sanos

Después de 30 min de la administración de glucosa, las glucemias de los animales presentaron al menos el doble de su valor comparado con las glucemias basales, después de este tiempo las glucemias decayeron gradualmente, quedando unos valores ligeramente elevados comparados con los niveles basales al final de los experimentos. En la primera semana (Figura 3A), ninguno de los tratamientos disminuyó significativamente el pico de glucemia a los 30 min; sin embargo, los animales tratados con las dosis menores del extracto de granada (10 y 25 mg/kg) y los tratados con pioglitazona (0.6 mg/kg) presentaron valores de glucemia menores. Después de tres semanas (Figura 3B) de administración todos

los tratamientos mostraron picos hiperglucémicos a los 30 min similares al grupo control.

Respecto a la concentración media de glucosa calculada (CMG) a partir del área bajo la curva (Figura 4 A y B), en la primera semana de tratamiento la pioglitazona mostró una disminución altamente significativa ($P \leq 0.01$) con respecto al grupo control, mientras que la dosis de 10 mg/kg del extracto presentó una reducción, sin embargo no fue significativa. Para la tercera semana, ninguno de los tratamientos logró disminuir la CMG, sin embargo con las dosis de 10 y 25 mg/kg se observaron áreas menores.



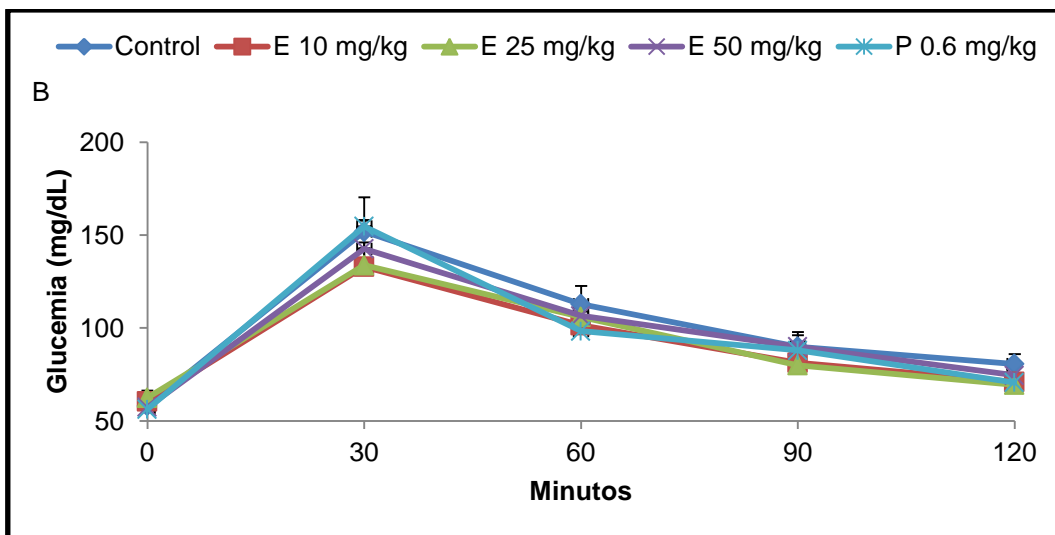


Figura 3. Efecto de la administración oral de diferentes dosis de extracto de cáscara de granada y pioglitazona sobre la curva de tolerancia a la glucosa en ratones macho sanos. (A) Después de 1 semana de tratamiento. (B) Después de 3 semanas de tratamiento. Los datos representan la media \pm E.S. (n=6).

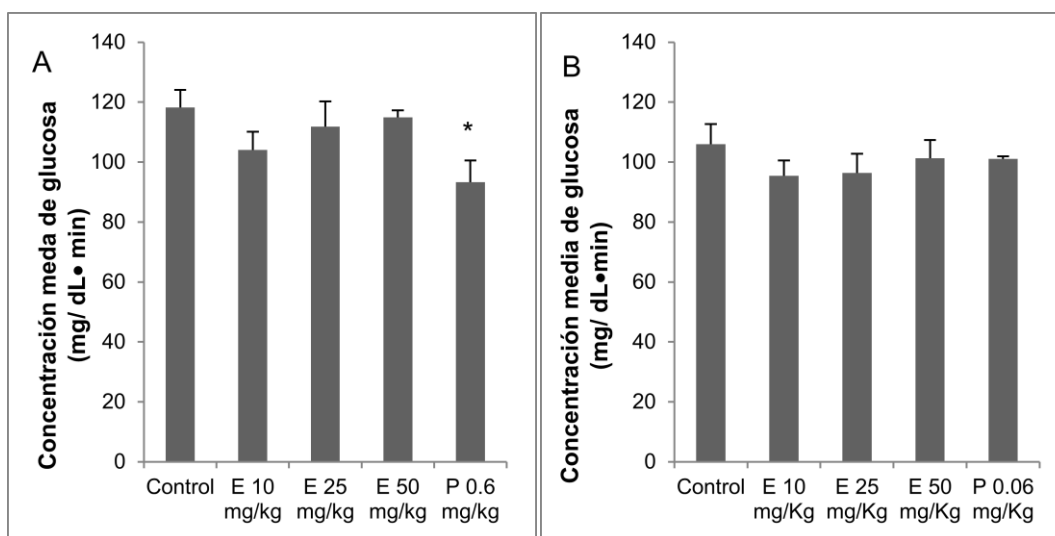


Figura 4. Efecto de la administración oral de diferentes dosis de extracto de cáscara de granada y pioglitazona sobre la concentración media de glucosa en la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones macho sanos. (A) Después de 1 semana de tratamiento. (B) Después de 3 semanas de tratamiento. Los datos representan la media \pm E.S. (n= 6). *P \leq 0.05 comparados con el grupo control.

7.2.4. Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre el peso, glucemia e insulina de ratones diabéticos

7.2.4.1. Efecto de la STZ sobre las glucemias y pesos de ratones no tratados

Dos semanas después de la administración de STZ, las glucemias en animales sin ayuno que recibieron el diabetógeno presentaron incremento altamente significativo ($P \leq 0.001$) en comparación el grupo sano (más del triple), por otro lado, no se detectaron diferencias en las glucemias basales de los grupos que recibieron STZ (Figura 5A). Respecto al peso, los animales que recibieron STZ tuvieron un peso corporal significativamente menor ($P \leq 0.001$) en comparación con el grupo sano. Entre los grupos que recibieron STZ no se encontraron diferencia en el peso corporal (Figura 5B). Otros signos mostrados en los animales hiperglucémicos fueron polidipsia, polifagia y poliuria.

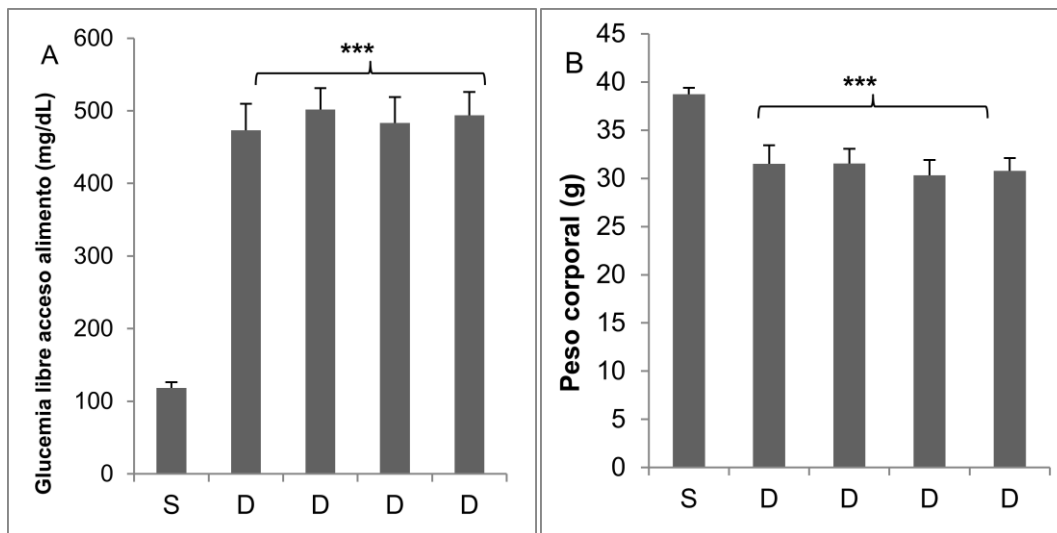


Figura 5. Efecto de la estreptozotocina (137 mg/kg) sobre la glucemia (A) y el peso corporal (B) de ratones macho sin ayuno. Los datos representan la media \pm E.S. ($n = 10$). * $P \leq 0.001$ comparados con el grupo sin tratamiento con STZ (S).**

7.2.4.2. Efecto subagudo del extracto de cáscara de granada sobre el peso de ratones diabéticos

La STZ provocó una disminución en el peso corporal de los animales. Por su parte, ni la administración de extracto de cáscara de granada (10 y 25 mg/kg) ni la pioglitazona (0.6 mg/kg) lograron recuperar el peso corporal durante las primeras 2 semanas de tratamiento ($P \leq 0.05$); sin embargo, el grupo diabético no tratado (D) presentó los menores valores de peso corporal (Fig 6). En la semana 3, todos los grupos de animales diabéticos tratados (con extracto y pioglitazona) presentaron un peso estadísticamente similar al grupo sano, mientras que el grupo diabético permaneció con un peso significativamente menor ($P \leq 0.05$). En la semana 4, se presentó nuevamente la baja de peso en los grupos D, D+P y D+10 mg/kg, sin embargo no se encontraron diferencias entre del grupo D+25 mg/kg y el grupo sano, es decir, el peso del grupo que recibió 25 mg/kg de extracto fue estadísticamente similar al del grupo sano.

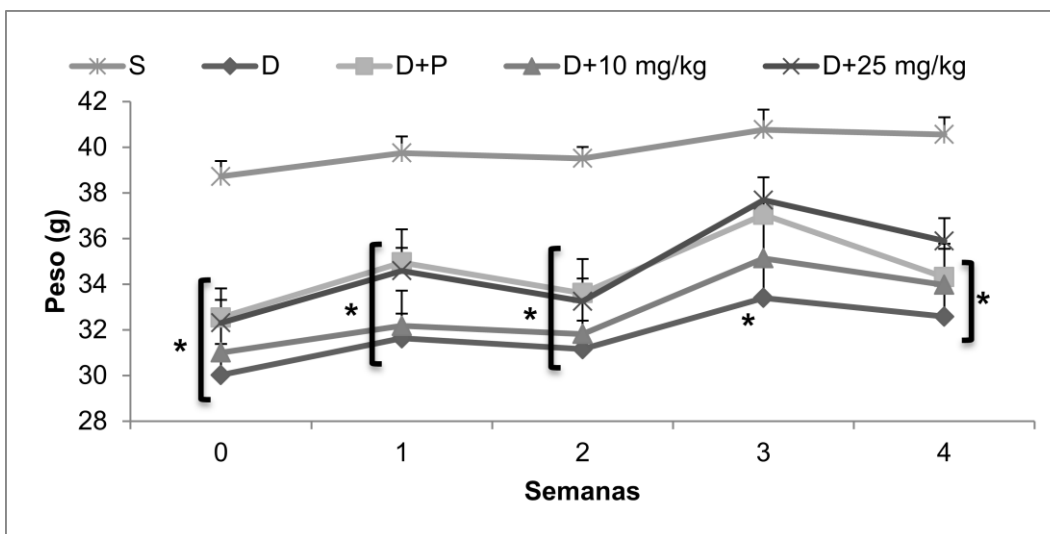


Figura 6. Efecto de la administración oral de diferentes dosis de extracto de cáscara de granada y pioglitazona sobre el peso corporal de ratones diabéticos. Los datos representan la media \pm E.S. (n=5). * $P \leq 0.05$ comparados con el grupo sin tratamiento con STZ (S).

7.2.4.3. Efecto subagudo (30 días) del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia y la insulina sérica de ratones diabéticos

Las glucemias en los animales en ayuno fueron menores a las posprandiales. Todos los grupos diabéticos presentaron glucemias significativamente mayores ($P \leq 0.05$, 0.01 y 0.001) que las observadas en el grupo sano. Dentro de los grupo diabéticos no se detectaron diferencias significativas para las glucemias en ayuno y posprandiales, sin embargo, el promedio de las glucemias en ayuno de los grupos D+10 y D+25 mg/kg, estuvieron por debajo de los 200 mg/dL ($P \leq 0.13$ y 0.08, respectivamente). En relación con la insulina, los animales diabéticos presentaron niveles significativamente menores al grupo sano ($P \leq 0.05$). Entre los animales diabéticos, el tratamiento con pioglitazona y el extracto de cáscara de granada aumentaron los niveles de insulina sérica con respecto al grupo diabético no tratado (Tabla 5). El efecto de los tratamientos se presentó en el siguiente orden creciente $D+P < D+10 < D+25$ ($P \leq 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente). Por otro lado, todos los grupos diabéticos presentaron una mortalidad entre el 20-40% al final del tratamiento.

Tabla 5. Efecto de la administración oral del extracto de cáscara de granada (10 y 25 mg/kg) y pioglitazona (0.6 mg/kg) durante 30 días sobre la glucemia e insulina sérica de ratones diabéticos.

Grupo	Glucemia en ayuno (mg/dL)		Glucemia posprandial (mg/dL)		Insulina sérica (ng/mL)	
S	74.50±	5.90	97.40±	6.34	1.447±	0.554
D	243.00±	57.18**	486.50±	58.83***	0.049±	0.011*
D+P	232.67±	53.28**	512.78±	42.02***	0.149±	0.038* ^a
D+10 mg/kg	153.75±	36.77**	480.50±	41.99***	0.121±	0.021* ^b
D+25 mg/kg	147.29±	27.74**	454.00±	38.01***	0.152±	0.017* ^c

Los datos representan la media \pm E.S. (n=5). *P \leq 0.05, **P \leq 0.01 y ***P \leq 0.001 comparados con el grupo sano (sin STZ). ^aP \leq 0.05, ^bP \leq 0.01 y ^cP \leq 0.001 comparados con el grupo diabético.

7.3. Dosis letal media (DL₅₀) del extracto de cáscara de granada oral e intraperitoneal

7.3.1. DL₅₀ para la vía oral

Los porcentajes de letalidad para la vía oral están resumidos en la Tabla 6. Durante las primeras 4 horas no se presentó letalidad, a las 24 h con la dosis de 792.5 mg/kg se detectó un 12.5% de letalidad. Después de 15 días no hubo incremento en la letalidad ni diferencias a partir de la dosis 1990 mg/kg, la máxima letalidad observada fue de 37.5%. No se probaron dosis mayores a 3155 mg/kg, dado que la gran viscosidad del preparado no permitió su flujo por el interior de la cánula. Las manifestaciones de toxicidad observadas durante las primeras horas después de la administración fueron distensión abdominal y diarrea. Con los datos obtenidos se calculó el margen de seguridad (MS) para la vía oral.

$$MS_{12.5/100} = \frac{DL_{12.5}}{DE_{100}} = \frac{500 \text{ mg/kg}}{25 \text{ mg/kg}} = 20$$

Tabla 6. Efecto de la administración aguda oral del extracto de cáscara de granada sobre la letalidad (%) de ratones.

mg/kg	4 h	1 días	15 días	30 días
Control	0	0	0	0
500	0	0	12.5	12.5
792.5	0	12.5	12.5	12.5
1256	0	0	12.5	12.5
1990.5	0	0	37.5	37.5

3155 0 0 37.5 37.5

7.3.2. DL₅₀ para la vía intraperitoneal

Los porcentajes de letalidad para la vía intraperitoneal se observan en la Tabla 7. En las primeras 4 horas se observó letalidad a partir de la dosis 71.5 mg/kg. A partir de los 15 días no se observaron cambios en la letalidad. La DL₅₀ para esta vía fue de 147 mg/kg, mientras el 100% de letalidad se obtuvo con 210 mg/kg. Las manifestaciones de toxicidad observadas fueron distensión abdominal, diarrea, inmovilidad, disminución de tono muscular, exoftalmus, hipotermia y cianosis.

Tabla 7. Efecto de la administración aguda i.p. de extracto de cáscara de granada sobre la letalidad (%) de ratones.

mg/kg	4 h	1 día	15 días	30 días
Control	0	0	0	0
50	0	12.5	12.5	12.5
71.5	12.5	12.5	25	25
102	37.5	37.5	37.5	37.5
147	37.5	50	50	50
210	37.5	62.5	100	100

7.3.3. Efecto sobre la temperatura rectal

La administración oral de extracto de cáscara de granada no modificó la temperatura rectal en comparación con el grupo control. Por otro lado, todas las dosis usadas para la vía intraperitoneal redujeron significativamente ($P < 0.05$ y

0.01) la temperatura rectal entre los 60 y 240 min después de la administración del extracto, en comparación con el grupo control (Figura 7 A y B).

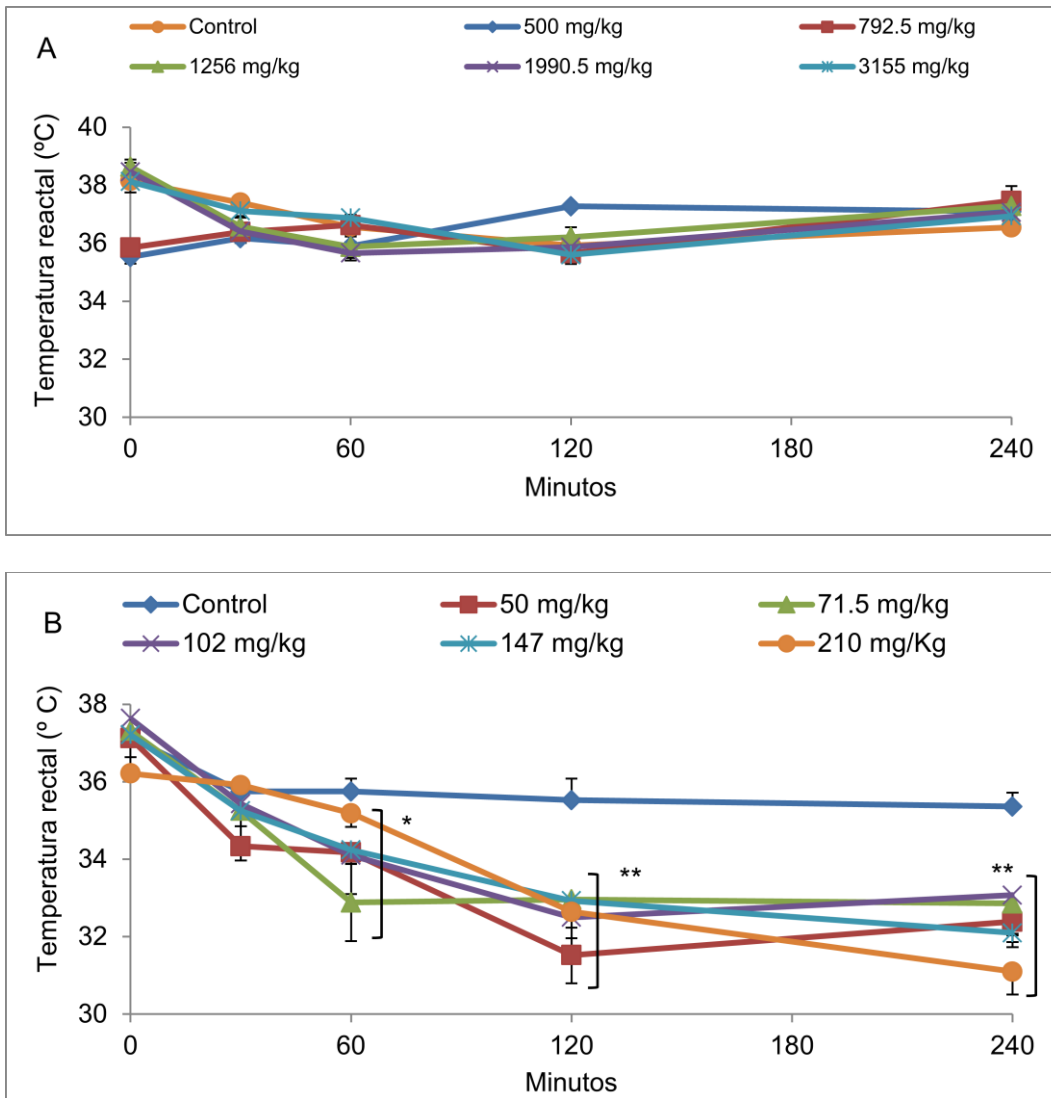


Figura 7. Efecto de la administración oral (A) e intraperitoneal (B) del extracto de cáscara de granada sobre la temperatura rectal en ratones. Los datos representan la media \pm E.S. (n=8). * $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.01$ comparados con el grupo control.

7.4. Diseño, elaboración y análisis de la jalea de jugo de granada

7.4.1. Selección de la jalea base

El pH, ° Brix y Aw de las jaleas con y sin extracto se muestra en la Tabla 8. Los valores ° Brix y Aw de ambas jaleas fueron similares a las obtenidas con la jalea comercial. El pH y la Aw de las JE fueron significativamente menores ($P < 0.05$) a los de las J, en contraste con los ° Brix. Sin embargo los efectos del extracto no fueron relevantes para la selección. Por otro lado, las propiedades reológicas fueron influenciadas por las gomas pero no por la adicción del extracto (Figura 8). Las jaleas T con y sin extracto presentaron las menores viscosidades, en contraste con las jaleas X y XE. Solo las jaleas T y TE exhibieron un comportamiento Newtoniano, el resto de las jaleas mostró un comportamiento pseudoplástico. Los reogramas obtenidos con XGT y XGTE presentaron una mayor similitud a los obtenidos con la jalea comercial. Por tal razón, este parámetro fue usado como criterio de selección. Finalmente la formulación de la jalea base se muestra en la Tabla (9).

Tabla 8. Efecto de la goma y el extracto sobre los parámetros físicos.

	pH	° Brix	Aw
Comercial	3.890	48.50	0.892
G	4.270 ±0.028	10.00 ±0.00	0.986 ±0.001
GE	3.850 ±0.010	11.40 ±0.56	0.984 ±0.000
X	4.275 ±0.120	9.75 ±0.35	0.986 ±0.001
XE	3.951 ±0.001	11.20 ±0.28	0.982 ±0.003
T	4.100 ±0.127	10.00 ±0.00	0.984 ±0.000
TE	3.650 ±0.014	11.20 ±0.00	0.984 ±0.000
XG	4.285 ±0.021	11.00 ±0.00	0.988 ±0.001
XGE	3.800 ±0.000	11.90 ±0.14	0.982 ±0.001
XT	4.125 ±0.021	10.00 ±0.00	0.986 ±0.001
XTE	3.735 ±0.035*	11.60 ±0.84	0.984 ±0.002
TG	4.065 ±0.021	10.500 ±0.70	0.984 ±0.000
TGE	3.650 ±0.028	12.100 ±0.14	0.984 ±0.000
XGT	4.140 ±0.014	11.000 ±0.00	0.987 ±0.001
XGTE	3.660 ±0.028	13.300 ±0.42	0.982 ±0.001

Los datos representan la media \pm D.E. * $P \leq 0.05$ comparando las jaleas sin extracto con las jaleas con extracto, mediante t-student no pareada. Goma guar (G), xantana (X) y tragacanto (T).

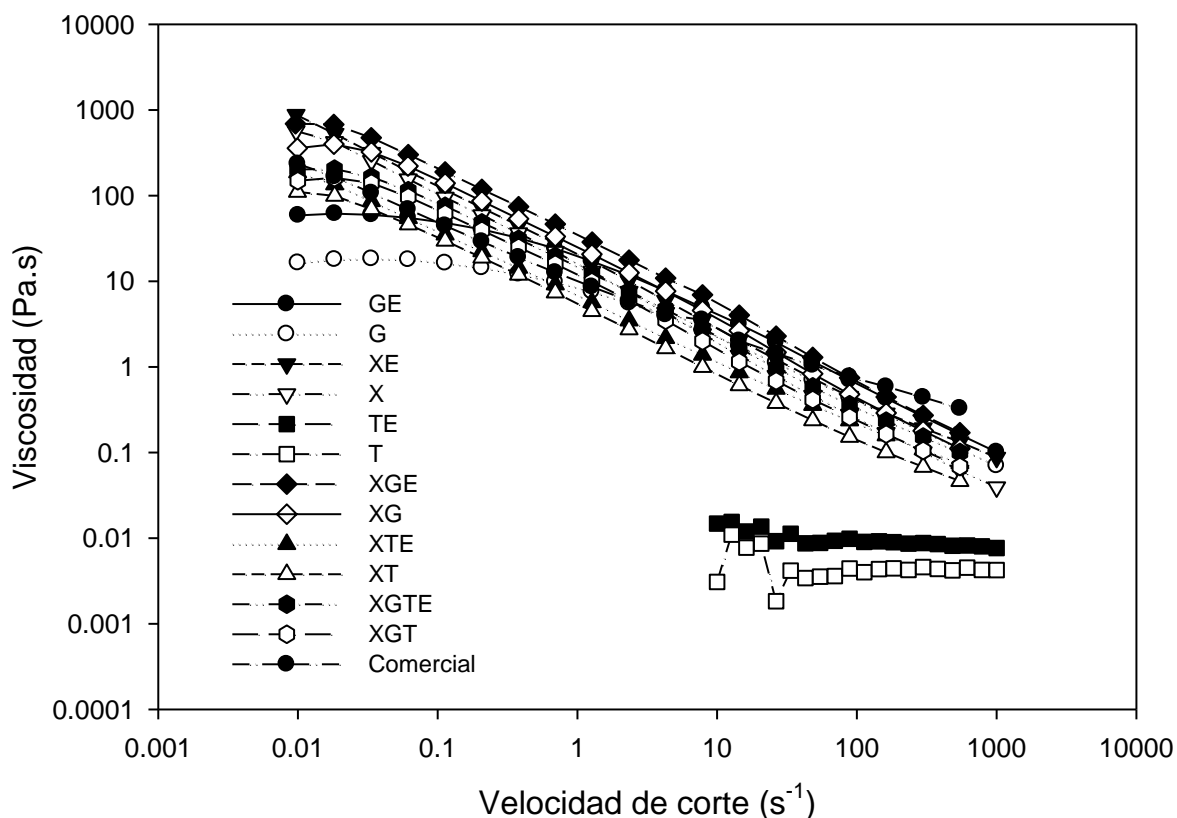


Figura 8. Efecto de las gomas sobre el comportamiento reológico de las jaleas con y sin extracto.

Tabla 9. Diseño de la formulación de la jalea base.

Ingrediente	%
Jugo de granada	52
Agua purificada	48
Sucralosa*	0.024
Benzoato de sodio*	0.1
Gomas	1
Extracto de cáscara de granada**	0.25

* De acuerdo a los reportado por las normas nacionales e internacionales.

** De acuerdo a las dosis seleccionada en ratones.

7.4.2. Análisis físicos de las jaleas

La Tabla 10 muestra el efecto del extracto sobre el tiempo de almacenamiento sobre el pH, Aw y color. La adición del E disminuyó el pH (ácido eláxico presente), pero no hubo diferencias en los sólidos totales, Aw o color en la semana 8. El color cambio después de 8 semanas de almacenamiento, una reducción en la luminosidad fue encontrada en ambas jaleas. Un incremento significativo ($P \leq 0.05$) en a^* fue detectado para J (77.61 %) y JE (41.81 %). Las propiedades reológicas de ambas muestras fueron similares en la semana 0 y 8 (Figura 9).

Tabla 10. Efecto del extracto y el tiempo de almacenamiento sobre los parámetros físicos.

	Semana	pH	° Brix	L^*	a^*	b^*	Aw
B	0	6.230 ±0.042	0.250 ±0.071	25.415 ±0.177	0.295 ±0.092	1.030 ±0.523	0.995 ±0.001
J	0	3.885 ±0.007	10.333 ±0.577	18.507 ±1.438	4.427 ±0.258	-0.320 ±0.113	0.987 ±0.003
	8	3.750 ±0.028	10.067 ±0.115	15.177 ±0.869	7.600 ±0.394 ^a	0.383 ±0.140	0.994 ±0.002
JE	0	3.790 ±0.017 ^{**}	10.667 ±0.577	19.303 ±1.127	3.933 ±0.490	0.345 ±0.318	0.990 ±0.001
	8	3.415 ±0.304	10.367 ±0.153	15.637 ±0.117 ^a	5.617 ±0.206 ^a	0.457 ±0.214	0.994 ±0.000

Los datos representan la media ± D.E. Diferencias significativas con t de Student, comparando J y JE en la semana 0. ^{**} $P \leq 0.01$. Diferencias significativas con t de Student pareada, comparando la misma muestra en la semana 0 y 8. ^a $P \leq 0.05$.

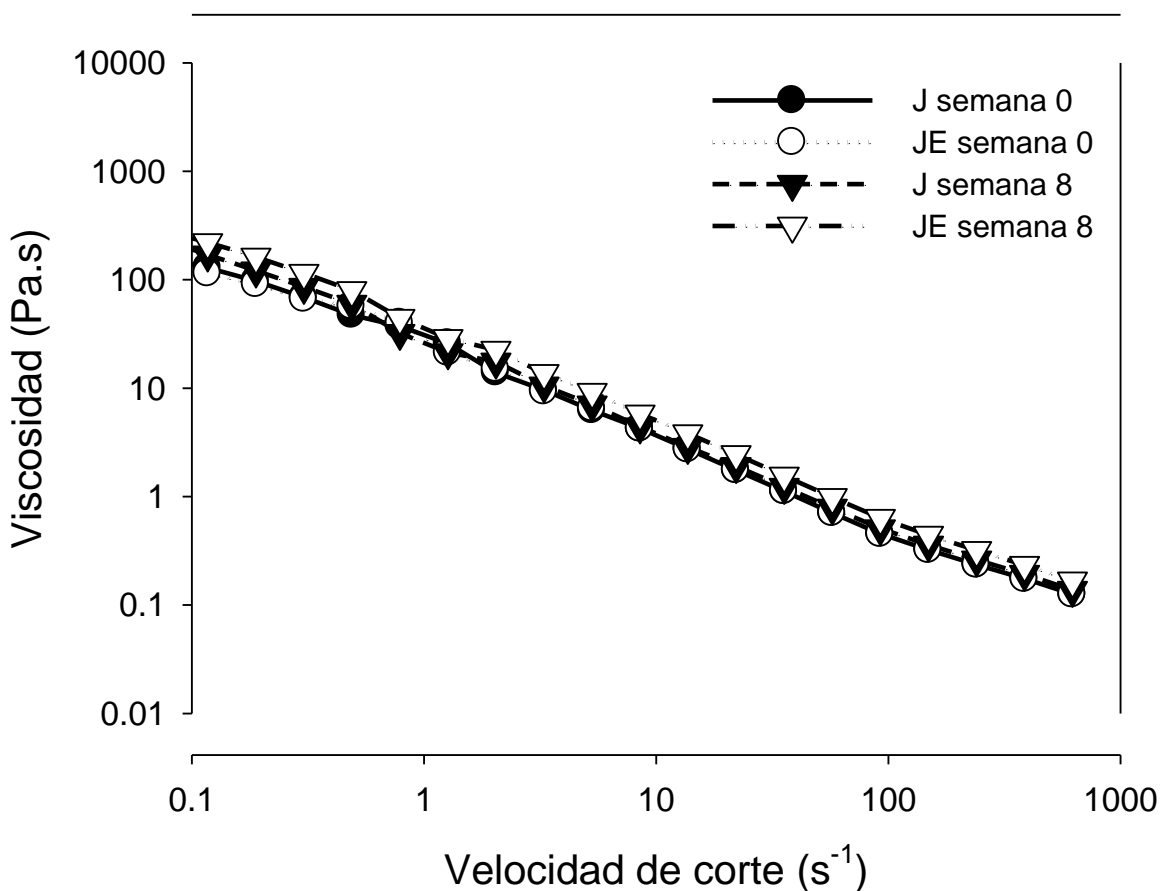


Figura 9. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el comportamiento reológico de las J y JE.

7.4.3. Análisis químico de las jaleas

La información nutrimental de la jaleas (J y JE) se muestra en la Tabla 11. No se detectó la presencia de proteínas y grasas, mientras que la cantidad de azúcares totales fue similar. El contenido inicial de tioles totales fue significativamente mayor ($P \leq 0.01$) en JE que en J (0.130 ± 0.001 y 0.061 ± 0.018 g EGS/ L jalea, respectivamente), mientras que los equivalentes de catequina en ambas muestras fueron similares y los equivalentes de ácido gálico sólo fueron

detectados en JE (0.544 ± 0.077 g EAG/ L jalea). El tiempo de almacenamiento tuvo influencia sobre todos los antioxidantes medidos. Comparando las muestras en la semana en la semana 0 y 8, encontramos que el contenido de EGSB se redujo cerca de 61.53 % en las muestra de JE, pero no cambiaron en la J. Para ambas jaleas, los EC fueron más altos en la semana 8 que en la semana 0 ($P \leq 0.01$) y un incremento en los EAG cercano al 34% fue observado en la JE al mismo tiempo (Tabla 12). El blanco no mostró interferencia en ningún análisis. El extracto fue preparado 500 ppm y las JE contenían 2 500 ppm; en teoría los EGSB y EAG del E + J deberían ser similares a los de JE. Es decir, que en las muestras en la semana 0:

$$\text{g EAG/ L: } 0.555 \pm 0.01 \text{ (E) + } 0.000 \pm 0.000 \text{ (J) = } 0.555 \pm 0.01 \text{ (PE +J),}$$

$$\text{g EGSB/ L: } 0.075 \pm 0.005 \text{ (PE) + } 0.061 \pm 0.001 \text{ (J) = } 0.136 \pm 0.006 \text{ (PE+J).}$$

Tabla 11. Información nutrimental de las jaleas.

	%		
	Azúcares totales	Proteína	Grasa Total
J	18.2	0	0
JE	17.5	0	0

Tabla 12. Efecto de extracto y el tiempo de almacenamiento sobre los parámetros químicos.

	Semana	g EGSB/ L jalea	g EC/ L jalea	g EAG/ L jalea
B	0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
J	0	0.061 ± 0.001	0.693 ± 0.044	0.000 ± 0.000
	8	0.061 ± 0.003	0.974 ± 0.049^b	0.000 ± 0.000
JE	0	$0.130 \pm 0.018^{**}$	0.692 ± 0.139	0.544 ± 0.077
	8	0.080 ± 0.002^a	1.059 ± 0.002^b	0.729 ± 0.063^b
		g EGSB/ g E	g EC/ g E	g EAG/ g E
E	0	0.030 ± 0.002	0.000 ± 0.000	0.222 ± 0.004

Los datos representan la media \pm D.E. Diferencias significativas con t de Student, comparando J y JE en la semana 0. **** $P \leq 0.01$** . Diferencias significativas con t de Student pareada, comparando la misma muestra en la semana 0 y 8. ^a $P \leq 0.05$. y ^b $P \leq 0.01$. Equivalentes de glutatión (EGSB), equivalentes de Catequina (EC) y equivalentes de ácido gálico (EAG).

7.4.4. Análisis antioxidante de las jaleas

Las tres actividades antioxidantes analizadas fueron significativamente aumentadas ($P \leq 0.01$) por la adición del extracto en la semana cero (Tabla 13). La habilidad de las muestras para atrapar los radicales $ABTS^{\cdot+}$ and $DPPH^{\cdot}$ fue similar. La actividad antirradicalaria de las muestras JE fue casi 2 veces mayor que las muestras de J. Después de 8 semanas de almacenamiento, la actividad antirradicalaria fue disminuida en ambas jaleas. La capacidad inicial (semana 0) para inhibir la autooxidación del ácido linoléico fue mayor en el siguiente orden $E > JE > J$. Después de 8 semanas de almacenamiento, se detectó un incremento significativo ($P \leq 0.05$) en las JE.

Tabla 13. Efecto del extracto y del tiempo de almacenamiento sobre la actividad antioxidante.

		Semana % Inhibición		
		ABTS ^{·+}	DPPH [·]	Ácido linoléico
B	0	0.000 ±0.00	4.150 ±1.03	-
J	0	41.87 ±5.91	44.81 ±1.80	53.04 ±7.93
	8	26.75 ±0.58 ^b	36.34 ±3.12 ^b	54.10 ±13.9
JE	0	98.22 ±0.39 ^{**}	90.75 ±0.17 ^{**}	71.60 ±4.02 ^{**}
	8	87.40 ±2.43 ^a	84.62 ±6.71	82.12 ±4.45 ^b
E	0	92.90 ±4.23	96.66 ±0.11	92.28 ±7.54

Los datos representan la media ± D.E. Diferencias significativas con t de Student, comparando J y JE en la semana 0. ** $P \leq 0.01$. Diferencias significativas con t de Student pareada, comparando la misma muestra en la semana 0 y 8. ^a $P \leq 0.05$. y ^b $P \leq 0.01$.

7.4.5. Análisis microbiológico de las jaleas

No fue detectada la presencia de microorganismos en ninguna de las muestras almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración. Esto indica que se siguieron buenas prácticas de manufactura en la preparación, pasteurización y envasado de las jaleas.

7.4.6. Análisis sensorial de las jaleas

Se realizó una prueba de nivel de agrado con las muestras de J, JE y jugo de granada con aditivos (sucralosa y benzoato de sodio). Las muestras de J y JE fueron mejor puntuadas en sabor a granada y sabor dulce comparándolas con el jugo. Las medias de los puntos obtenidos de 60 evaluaciones para nivel de agrado general estuvieron dentro de un margen de 4.63–5.50 y fueron significativamente superiores en las jaleas en comparación con el jugo ($P \leq 0.05$). En apariencia y color, el jugo presentó un mejor nivel de agrado ($P \leq 0.05$). No se encontraron diferencias estadísticas entre ambas jaleas y el jugo para sabor amargo, acidez, consistencia y olor (Tabla 14). Los estudiantes fueron cuestionados sobre si ellos o algún familiar padecen DM. Ningún estudiante tiene DM, sin embargo la mayoría de ellos (70%) tiene familiares con diabetes.

Tabla 14. Análisis sensorial de las jaleas.

	Sabor granada	Sabor dulce	Sabor amargo	Astringencia	Acidez	Apariencia	Consistencia	Color	Olor	Agrado general
J	5.22 ^a	5.37 ^a	3.85 ^a	4.07 ^a	3.83 ^a	5.23 ^a	4.98 ^a	5.32 ^b	5.17 ^a	5.50 ^a
JE	4.95 ^a	4.90 ^a	3.63 ^a	3.75 ^a	3.63 ^a	4.63 ^b	5.13 ^a	4.92 ^b	5.15 ^a	5.42 ^a
Jugo	4.50 ^b	3.88 ^b	3.35 ^a	3.88 ^a	3.72 ^a	5.70 ^a	5.20 ^a	6.12 ^a	4.90 ^a	4.63 ^b

Las medias en la columna con la misma letra no son significativas ($P \leq 0.05$), con la prueba de Duncan. Escala hedónica: 1= Me disgusta mucho, 4= ni me gusta ni me disgusta y 7= me gusta muchísimo.

7.5. Actividad biológica de la jalea con extracto

7.5.1. Efecto subagudo de la administración de jalea con extracto (JE) sobre la curva de tolerancia a la glucosa de ratones sanos

Después de 2 semanas de tratamiento, las glucemias en ayuno de los grupos tratados con 25 mg/kg de E, JE y J fueron significativamente menores en comparación con el grupo control (Fig. 10). Ninguno de los tratamientos modificó la curva de tolerancia a la glucosa (Fig. 11) ni la concentración media de glucosa (Fig. 12).

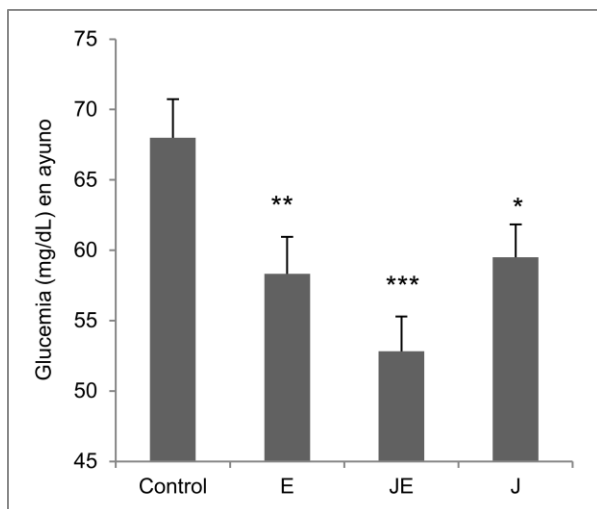


Figura 10. Efecto de la administración oral de E, JE y J sobre las glucemias en ayuno de ratones después de dos semanas de tratamiento. Los datos representan la media \pm ES (n=6). Diferencias significativas con t de Student. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$ comparados con el grupo control.

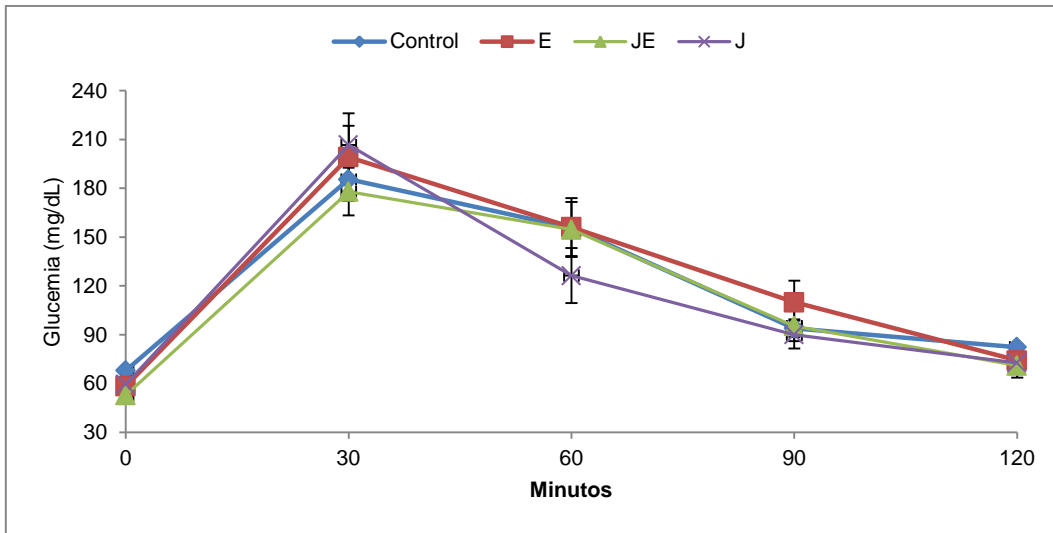


Figura 11. Efecto de la administración oral de E, JE y J sobre la curva de tolerancia a la glucosa en ratones machos después 2 semanas de tratamiento. Los valores representan la media \pm E.S. (n=6).

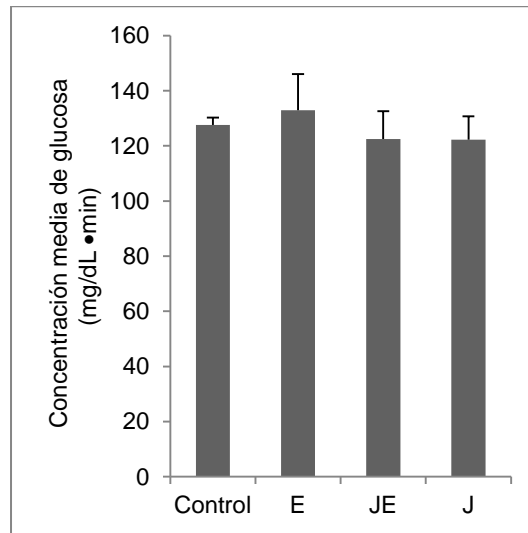


Figura 12. Efecto de la administración oral de E, JE y J la concentración meida de glucosa en la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones machos después dos semanas de tratamiento. Los valores representan la media \pm E.S. (n=6).

7.5.2. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la lipoperoxidación en ratones sanos

En hígado de ratón, los tratamientos orales con E, JE y J durante tres semanas, redujeron los niveles de lipoperoxidación hepática expresados como malondialdehído (MDA) en comparación con el grupo control, pero sólo en los grupos tratados con E y JE la disminución fue significativa ($P \leq 0.05$) (Fig. 13A). Por otro lado, sólo el grupo E presentó menor cantidad de MDA pancreática en comparación con el grupo control ($P \leq 0.05$), aunque los tratamientos con J y JE también disminuyeron los niveles de MDA, estos cambios no fueron estadísticamente importantes (Fig. 13B).

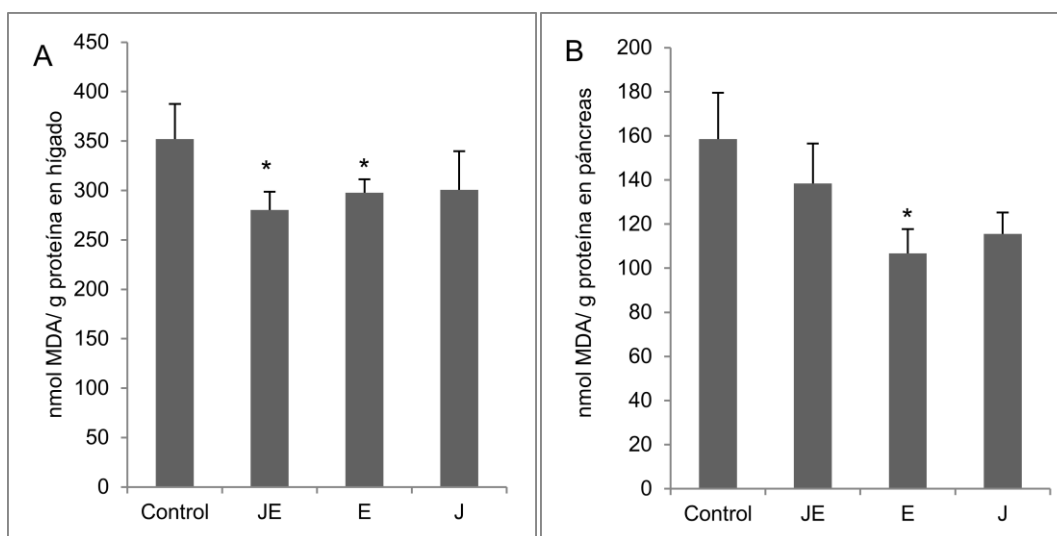


Figura 13. Efecto de la administración oral de E, JE y J sobre la lipoperoxidación (nmol MDA/g proteína) en hígado (A) y páncreas (B) de ratones sanos después de tres semanas de tratamiento. Los datos representan la media \pm E.S. (n=6). Diferencias significativas con t de Student. * $P \leq 0.05$ comparados con el grupo control.

7.5.3. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la relación GSH/GSSG de ratones sanos

La relación de GSH/GSSG en hígado fue estadísticamente superior en los grupos E ($P \leq 0.001$) y J ($P \leq 0.05$) que en el grupo control (Fig. 14A). El mismo comportamiento fue observado en páncreas (Fig. 14B). Los incrementos (más del doble) fueron encontrados en los grupos E. Por otro lado, el grupo JE mostró relaciones de GSH/GSSG similares al grupo control en ambos tejidos.

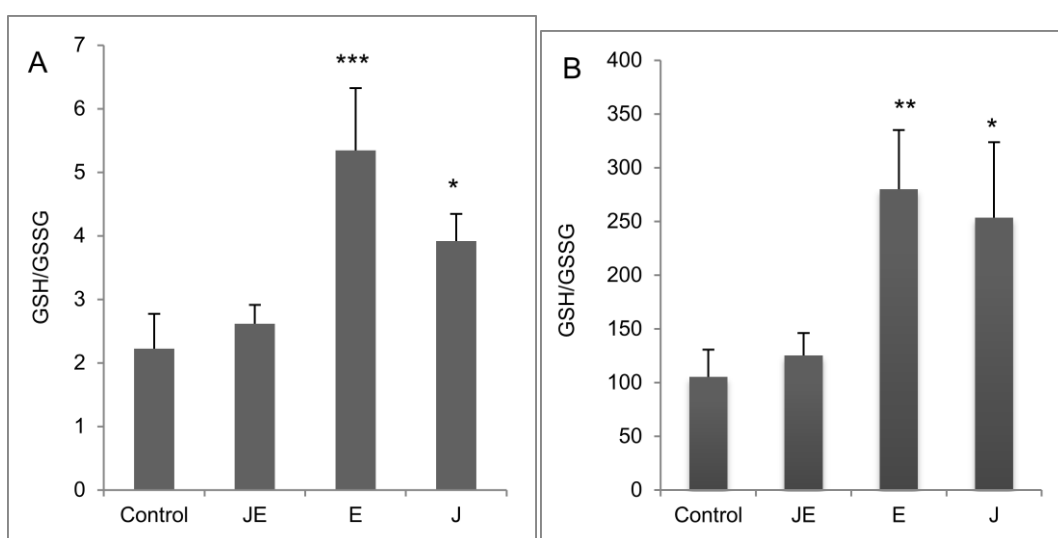


Figura 14. Efecto de la administración oral de E, JE y J sobre la relación GSH/GSSG en hígado (A) y páncreas (B) de ratones sanos después de tres semanas de tratamiento. Los datos representan la media \pm E.S. ($n=6$). Diferencias significativas con t de Student. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$ comparados con el grupo control.

7.5.4. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la actividad catalasa de ratones sanos

Los grupos E y J mostraron mayor actividad catalasa hepática ($P \leq 0.01$) que el grupo control, mientras que el grupo tratado con JE no fue alterado (Fig. 15A).

En páncreas, se observó que todos los tratamientos (JE, E y J) aumentaron la actividad catalasa ($P \leq 0.001$ y $P \leq 0.01$) con respecto al grupo control (Fig. 15B).

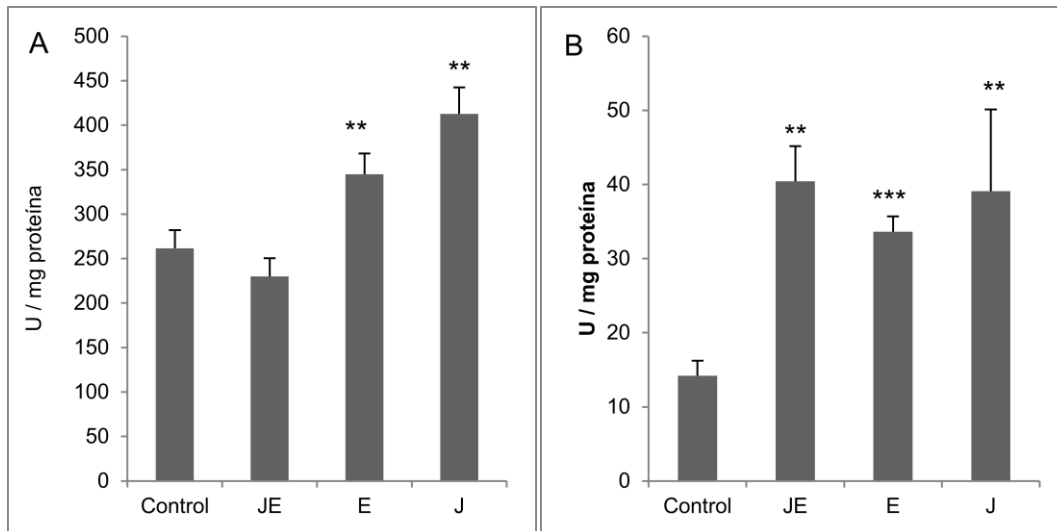


Figura 15. Efecto de la administración oral de E, JE y J sobre la actividad catalasa (U/ mg proteína) en hígado (A) y páncreas (B) de ratones sanos después de tres semanas de tratamiento. Los datos representan la media \pm E.S. Diferencias significativas con t de Student. ** $P \leq 0.01$ y * $P \leq 0.001$ comparados con el grupo control (n=6).**

7.5.5. Efecto subagudo de la administración de JE sobre $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ en páncreas de ratón sano

La administración oral durante tres semanas de ninguno de los tratamientos (JE, E y J) modificó los niveles pancreáticos de $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ en comparación con el grupo control (Fig. 16 A y B).

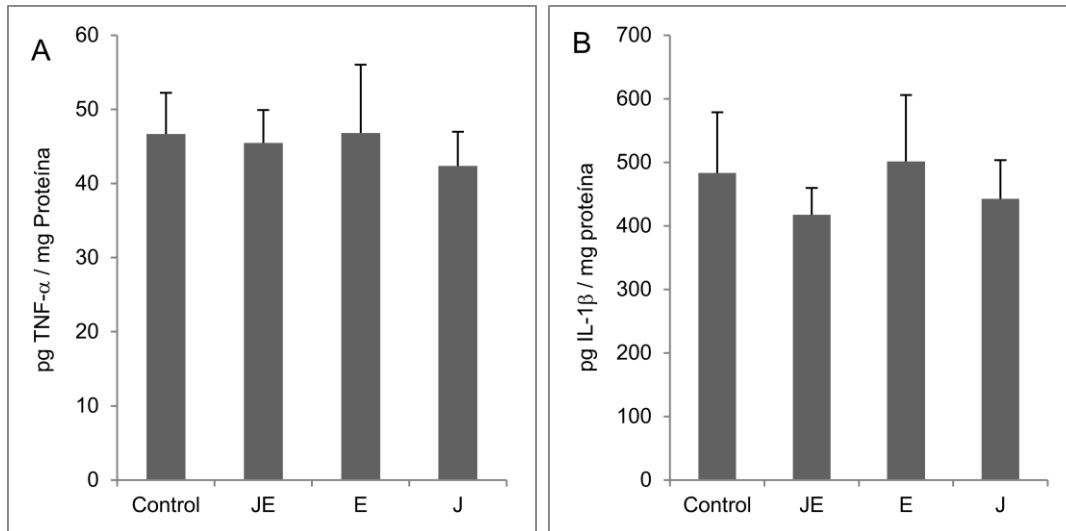


Figura 16. Efecto de la administración oral de E, JE y J sobre los niveles pancreáticos de TNF- α (A) y IL-1 β (B) de ratones sanos después de tres semanas de tratamiento. Los datos representan la media \pm E.S (n=6).

7.5.6. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la glucemia en animales diabéticos

Aunque las glucemias iniciales en los animales que recibieron STZ fueron mayores a las presentadas por el grupo sano, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Además la administración i.p. del agente inductor de diabetes en una dosis de 40 mg/kg, durante 4 días consecutivos, no provocó pérdida de peso o poliuria, polidipsia y polifagia severa.

En la Tabla 15 se muestran las glucemias en ayuno y posprandiales de los ratones diabéticos tratados durante 4 semanas. Las glucemias en ayuno fueron menores a las posprandiales. Las glucemias en ayuno y posprandiales de los dos grupos diabéticos fueron significativamente mayores ($P \leq 0.01$ y 0.001). No

se detectaron diferencias entre las glucemias posprandiales de D y D+JE, sin embargo el tratamiento con JE aumentó las glucemias en ayuno ($P \leq 0.01$), en comparación con el grupo D. Por otro lado, no se presentó letalidad en los grupos diabéticos después de 4 semanas de tratamiento, es decir 8 semanas después de la administración de STZ.

Tabla 15. Efecto de la administración oral de la JE sobre la glucemia de ratones diabéticos después de 4 semanas de tratamiento.

Grupo	Glucemia en ayuno (mg/dL)	Glucemia posprandial (mg/dL)
S	66.40± 5.58	158.20± 3.41
D	132.8± 22.25**	>600± 0.0***
D+JE	329.25± 31.20***,b	>600± 0.0***

Los datos representan la media ± E.S. (n=5). Diferencias significativas con t de Student. ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$ comparados con el grupo sano (sin STZ). ^b $P \leq 0.01$ comparados con el grupo diabético.

7.5.7. Efecto subagudo de la administración de JE sobre $TNF\alpha$ e IL-6 en ratones diabéticos

No se detectaron cambios en los niveles séricos de $TNF\alpha$ e IL-6 entre ninguno de los grupos. Todos los grupos presentaron niveles de citocinas inferiores al límite de detección del kit.

7.5.8. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la lipoperoxidación tisular en ratones diabéticos

No se detectaron cambios en la lipoperoxidación entre los ratones sanos y diabéticos (D y D+JE) en hígado y riñón (Tabla 16). En corazón, los animales que

recibieron STZ presentaron los valores de MDA mayores comparados con el grupo sano, sin embargo esta diferencia fue significativa ($P \leq 0.01$) sólo en el grupo D+JE.

Tabla 16. Efecto de la administración oral de la JE sobre la niveles tisulares de lipoperoxidación (nmol MDA/ g proteína) de ratones diabéticos.

	Hígado		Riñón		Corazón	
S	442.61±	38.22	271.20±	21.66	345.83±	19.66
D	445.32±	27.28	247.78±	31.20	392.46±	39.15
D+JE	433.73±	26.83	232.02±	27.72	428.08±	4.33**

Los datos representan la media \pm E.S. (n=5). Diferencias significativas con t de Student. ** $P \leq 0.01$ y comparados con el grupo sano (sin STZ).

7.5.9. Efecto subagudo de la administración de JE sobre la actividad catalasa tisular en ratones diabéticos

La administración de STZ disminuyó ($P \leq 0.01$) los niveles de catalasa en hígado y riñón en comparación con el grupo sano, sin embargo no afectó el corazón, páncreas y músculo. El tratamiento con JE, restauró la actividad catalasa hepática, aunque los valores encontrados en JE fueron menores al S, no fueron significativamente diferentes. Por otro lado, se encontró que el valor de la actividad catalasa renal del grupo JE fue mayor al del grupo D, sin embargo esta diferencia no fue significativa. En corazón, de los tres grupos, el grupo JE presentó el valor de actividad catalasa más alto, pero este ligero incremento no fue significativo al compararlo con los grupos S y D (Tabla 17).

Tabla 17. Efecto de la administración oral de la JE sobre los niveles tisulares de catalasa (U/mg proteína) de ratones diabéticos.

	Hígado		Riñón		Corazón		Páncreas	Músculo	
S	288.83±	35.06	150.13±	1.97	19.28±	2.42	NM	6.17±	1.09
D	211.39±	19.23**	103.20±	8.91**	19.88±	3.01	NM	5.15±	1.01
D+JE	239.78±	24.55	112.33±	6.34**	23.28±	2.70	NM	5.13±	0.67

Los datos representan la media \pm E.S. (n=5). Diferencias significativas con t de Student.
**P \leq 0.01 y comparados con el grupo sano (sin STZ).

8. Discusión

8.1. Obtención y selección del extracto

Las cáscaras de las frutas se componen principalmente de polisacáridos y fibras, tales como pectinas, hidrocoloides, almidones resistentes, entre otros; en contraste, son pobres en grasas y proteínas. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos en la caracterización química de las cáscaras secas. El análisis bromatológico de la cáscara de granada de este trabajo coincide con la reportada por Robledo *et al.* (2008), quienes encontraron 0.26% de ácido elágico en cáscaras de granada mexicana de Sabinas, Coahuila, México. Del mismo modo, la cantidad del ácido elágico concuerda con la reportada por este mismo autor. Actualmente no existen más reportes publicados sobre cáscaras de granada mexicana.

El contenido de monómeros fenólicos en el extracto y la cáscara completa es diferente. La catequina y el ácido gálico fueron detectados únicamente en la cáscara. Por otro lado el AE fue detectado en ambos, sin embargo, la cantidad presente en el extracto fue mayor a la detectada en la cáscara, 0.7 y 0.26 %, respectivamente. Aguilera-Carbo *et al.* (2008), desarrollaron un método de extracción de hidrólisis térmica-ácida-etanólica y un método de análisis por HPLC para la detección de AE en cáscara de granada mexicana maduras y en maduración provenientes del Sabinas Coahuila, México. En las cáscaras en maduración se detectó una mayor cantidad de AE que en las cáscaras maduras,

33±7.42 y 12.8±5.8 mg AE/g planta. En la presente investigación se emplearon cáscaras de granada madura y los resultados (7.11 mg AE/g planta) coinciden con lo previamente reportado para las cáscara de granada mexicana.

Los polifenoles son metabolitos secundarios propios de las plantas superiores, es decir, no están asociados al crecimiento y desarrollo de las plantas, más bien se relacionan con mecanismos de defensa al estrés ambiental. Los compuestos fenólicos pueden encontrarse libres (monómeros) o formando polímeros. Los monómeros fenólicos son un grupo de compuestos heterogéneos y pueden dividirse de acuerdo con sus características químicas en: ácidos benzóicos, ácido hidroxicinámicos, flavonoides (que se dividen en diversos subtipos), cumarinas, xantonas, estilbenos, chalconas, quinonas, etc. (Croizer *et al.*, 2009; Spáçil *et al.*, 2008). En esta investigación tratamos de identificar algunos de los ácidos benzóicos, ácidos hidroxicinámicos y flavanoides más comunes citados en la literatura.

8.2. Efecto del extracto de cáscara de granada sobre la glucemia

La Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés), define a la diabetes mellitus como un grupo de enfermedades caracterizado por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción y/o acción de la insulina (ADA, 2011). La hiperglucemia crónica se asocia con el daño a largo plazo en diferentes órganos, especialmente en riñón, nervios, ojos, corazón y vasos

sanguíneos y con diferentes signos y síntomas que incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia y visión borrosa. En la diabetes inducida por STZ, los animales presentaron tanto hiperglucemia como poliuria, polidipsia, pérdida de peso y polifagia.

La OMS (WHO, 2011), establece que la diabetes es un problema de salud pública serio, por su alta prevalencia (≥ 346 millones de personas en el mundo); mortalidad (80% en países con bajos y medianos ingresos) asociada a enfermedades cardiovasculares (50%) y daño renal (10-20 %) e impacto económico en las familias y sistemas de salud públicos.

Tanto la ADA como la OMS, establecen diversos criterios para detectar el riesgo y diagnóstico al desarrollo de diabetes. Entre estos se encuentran: glucosa en ayuno, curva de tolerancia a la glucosa y hemoglobina glucosilada (Tabla 18).

En relación con el efecto agudo del extracto de granada (62.5 mg/kg) sobre los niveles basales de glucemia en animales sanos, se observó que redujo la glucemia desde la primera semana de tratamiento oral en ratones sanos (10 mg/kg) y en la curva de tolerancia a la glucosa los animales tratados con extracto (10 y 25 mg/kg) mantuvieron menores valores glucémicos y concentración media de glucosa en comparación con el grupo control, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

El efecto de la granada sobre los niveles de glucemia en roedores ha sido previamente reportado, sin embargo en la mayoría de los estudios se emplearon extractos hidroalcohólicos de las flores con dosis entre 200 y 500 mg/kg (Viuda-Martos *et al.*, 2010; Jurenka, 2008; Katz *et al.*, 2007). Entre estos efectos se encuentran: disminución aguda de la glucemia en la curva de tolerancia a la glucosa y reducción de las glucemias en ratas macho Wistar (Jafri *et al.*, 2000). Disminución aguda de las glucemias en la curva de tolerancia a la sacarosa, sin alteraciones el curva de tolerancia en la glucosa en ratones ddY (Li *et al.*, 2005) e inhibición de la α -glucosidasa *in vitro*. Inhibición de la aldosa reductasa en cristalino de ratas Sprague-Dawley (Jung *et al.*, 2003). Aumento en la expresión del factor de transcripción PPAR- γ y el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT 4) en corazón de ratas diabéticas y obesas Zucker (ZDF). Reducción de las glucemias con libre acceso a alimento en ratas ZDF (Li *et al.*, 2008).

Por otro lado, Parmar y Kar (2007) determinaron que la administración oral de extracto de cáscara de granada (India) en las dosis de 200 y 300 mg/kg durante 10 días, disminuyeron la glucemia en ayunas de ratones Swiss albino no diabéticos. Además determinaron que el contenido de fenoles en el extracto era de 1.8 g EAG/100 g de extracto. En comparación con la las dosis de nuestro extracto, nosotros usamos una concentración casi 10 veces menor, sin embargo la cantidad de fenoles de nuestro extracto fue casi 10 veces superior. Es decir, convertido a mg EAG/kg, el rango de concentración fue similar, de 3.6-5.4 mg

EAG/kg para las dosis de 200 y 300 mg extracto/Kg y 2.2 a 5.5 mg EAG/kg para las dosis de 10 y 25 mg de extracto/ Kg, respectivamente.

En el caso de animales diabéticos, Althunibat *et al.* (2010), no detectaron disminuciones en la glucemia de ratas Wistar con diabetes inducida con STZ tratadas por vía oral durante 4 semanas con un extracto metanólico de cáscara de granada (Jordania) en las dosis de 10 y 20 mg/kg.

Tabla 18. Criterios para el riesgo y diagnóstico de la diabetes mellitus en humanos.

Parámetro	Diagnóstico		
	ADA, 2011	OMS, 2011	NOM-015-SSA2-2010
Glucosa plasmática en ayuno	≥126 mg/dL (7 mmol/L)	≥126 mg/dL (7 mmol/L)	≥126 mg/dL (7 mmol/L)
Prueba de tolerancia a la glucosa (2 h después de la carga de glucosa, 75 g)	≥200 mg/dL (11.1 mmol/L)	≥200 mg/dL (11.1 mmol/L)	≥200 mg/dL (11.1 mmol/L)
Hemoglobina glucosilada en ayuno (HbAc1)	≥ 6.5 %	≥ 6.5 %	N.D.
Glucosa plasmática cuando el paciente presenta síntomas de hiperglucemia.	≥200 mg/dL (11.1 mmol/L)		≥200 mg/dL (11.1 mmol/L)
	Riesgo		
Glucosa plasmática en ayuno	100 a 125 mg/dL (5.6 a 6.9 mmol/L)	110 a 125 mg/dL (6.1-6.9 mmol/L)	125 a 199 mg/dL (6.1-6.9 mmol/L)
Prueba de tolerancia a la glucosa (2 h después de la carga de glucosa, 75 g)	140 a 199 mg/dL (7.8 a 11.0 mmol/L)	140 a 200 mg/dL (7.8 a 11.1 mmol/L)	199 a 200 mg/dL (11.0 a 11.1 mmol/L)
Hemoglobina glucosilada en ayuno	5.7 a 6.4 %	N.D.	N.D.

(HbAc1)

Etiológicamente la diabetes ha sido dividida en 4 grupos: tipo 1, tipo 2, gestacional y otros tipos específicos (ADA, 2011). La diabetes inducida por STZ se clasifica dentro del grupo de “Otros tipos”, en el subgrupo inducido por fármacos. Sin embargo, algunos investigadores sugieren que la STZ produce hiperglucemias cercanas parecidas a las presentes en la DM1 o DM2.

La STZ (2-dexoi-2-(3 metil-3-nitrosurea)-1-*D*-glucopiranososa) es un antibiótico de amplio espectro producido por *Streptomyces achromogenes*. El efecto diabético de la STZ fue reportado por primera vez en 1963. La STZ tiene una estructura similar a la glucosa y la N-acetilglucosamina (NAcGlc) y es transportada al interior de las células β -pancreáticas por el transportador de glucosa 2 (GLUT 2), causando muerte celular. Son tres los pasos asociados con la muerte celular: (i) metilación del ADN por la formación del CH_3^+ , causando la activación de la enzima nuclear poli-ADP-ribosa sintasa dependiente de NAD^+ ; (ii) generación anión superóxido y (iii) óxido nítrico (Ventura-Sobrevilla *et al.*, 2011).

La STZ incrementa la glicosilación de proteínas en las células β , generando apoptosis, pues es un inhibidor de O-N-acetil- β -*D*-glucosaminidasa, que remueve los residuos de NAcGlc de las proteínas.

Las células β de los islote pancreáticos son las encargadas de producir insulina, hormona necesaria para mover el GLUT 4 del citosol a la membrana de

algunas células, tales como cardiomiocitos, miocitos, hepatocitos y adipocitos y, de esta manera, introducir a la glucosa extracelular al citoplasma donde es metabolizada (Castrejón *et al.*, 2007).

En los resultados obtenidos observamos que la administración de la STZ (una dosis de 137 mg/kg) indujo manifestaciones típicas de la diabetes, incluyendo la hipoinsulinemia característica de esta patología. Los tratamientos con extracto de cáscara de granada y pioglitazona elevaron los niveles de insulina, sin llegar a los valores normales

8.3. DL₅₀ oral e intraperitoneal del extracto de cáscara de granada

En la medicina tradicional la cantidad de las preparaciones herbolarias administradas a los pacientes no es exacta, ésta depende desde la materia prima hasta la elaboración de los extractos. Sin embargo, en este estudio los animales fueron administrados en un rango de dosis definidas, seleccionadas a partir de estudios preliminares (efecto agudo sobre la glucemia). Las manifestaciones tóxicas y mortalidad de la administración oral fueron menores a la administración i.p. Patel *et al.* (2008) demostraron que la DL₅₀ oral e intraperitoneal de un extracto del fruto de granada completo (POMELLA®) estandarizado a 70% de fenoles totales y 5% de ácido elálgico libre, en ratones Swiss albino de ambos sexos fue >5000 mg/kg para la vía oral y 187.5 mg/kg para la vía i.p.

Son pocos los estudios que evidencian la toxicidad de los elagitaninos, Cerda *et al.* (2003) demostraron que el consumo de 4.8 mg/kg de punicalagina (uno de los principales elagitaninos presentes en el jugo y cáscara de granada) en la dieta por 5 semanas, no causó efectos tóxicos en rata Sprague-Dawley; además estimaron que extrapolando las dosis en humanos equivaldría a 350 g/kg de punicalagina para una persona de 70 kg. Por otro lado, Falsaperla *et al.* (2005), no encontraron efectos colaterales ni mejorías en pacientes humanos con cáncer de próstata avanzado que consumieron 180 mg AE por día durante 6 semanas. Además de las altas concentraciones de compuestos fenólicos, la toxicidad de la granada parece estar asociada al contenido de alcaloides (Vidal *et al.*, 2003). El extracto de cáscara de granada empleado en el presente estudio, tiene un contenido elevado de ácido elágico (≈ 14 mg AE/ g extracto) y de fenoles totales (≈ 22 mg EAG/ 100 g extracto), que incluyen tanto a monómeros libres, por ejemplo ácido elágico, como a polímeros glucosilados, por ejemplo taninos hidrolizables como galos y elagitaninos.

Cuando el AE es ingerido por vía oral se absorbe entre 30-90 min después de su ingesta, lo que sugiere que la absorción se da directamente en el estómago o en la parte proximal del intestino delgado a través del transportador de glucosa SGLT 1 cuando están glucosilados y por difusión pasiva cuando están libres. Sin embargo, el ácido elágico puede unirse a las células intestinales epiteliales, alterando su absorción. Una vez que los elagitaninos y el AE alcanzan la parte distal del intestino delgado y el colon, son ampliamente metabolizados por la

microflora, generando compuestos como las urolitinas y glucurónidos. Estos derivados del ácido elágico pueden ser absorbidos y/o excretados, de manera que pueden ser detectados en el plasma, orina y heces, lo que sugiere que pueden entrar a la circulación enterohepática. Por otro lado, el AE libre, glucurónidos y compuestos metilados de AE han sido detectados en orina y plasma, lo que indica que el AE puede ser biotransformados por las enzimas de fase 2 o de conjugación (Crozier *et al.*, 2009; Espin *et al.*, 2007). Después de absorbido el AE es rápidamente esterificado con grupos CH_3O^- por acción de la enzima catecol-O-metil transferasa (COMT), enzima que sustituye los grupos hidroxilo por uno o dos grupos metoxilo de cada molécula de AE. El 93% del AE celular se une irreversiblemente a macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos (Larrosa *et al.*, 2010).

Es bien conocido que los compuesto fenólicos administrados por vía oral están sujetos al efecto del primer paso, en el cual los compuestos son biotransformados a compuestos menos tóxicos al ser más hidrosolubles, con lo que se favorece su excreción. Por el contrario, se considera que el metabolismo hepático de los compuestos fenólicos administrados por vía i.p. es despreciable. Esto puede explicar la diferencia en rango de dosis para ambas vías.

Los ratones son animales homeotermos es decir, son animales cuya temperatura corporal se mantiene constante ($37\text{ }^\circ\text{C}$ para los mamíferos). El mantenimiento de esta temperatura corporal es el resultado de un balance entre

los mecanismos reguladores de calor y la pérdida de calor. Es posible que la hipotermia presentada en los animales se deba a una vasoconstricción generalizada, con lo que se reduce el flujo de sanguíneo en los tejidos periféricos, sufriendo así pérdida de calor, la cianosis es la manifestación tóxica que explica este fenómeno. En los animales que murieron dentro de las primeras 4 horas, recibieron las mayores dosis de extracto y presentaron una cianosis marcada en las orejas.

8.4. Diseño, elaboración y análisis de la jalea de jugo de granada

El incremento en la prevalencia de la DM y la obesidad ha sido un factor importante en la producción de alimentos reducidos en calorías, azúcares y grasas, y alimentos funcionales. Los alimentos funcionales son aquellos que al ser consumidos regularmente, además de sus propiedades nutritivas, ejercen un efecto benéfico a la salud (mejoran el estado de salud o reducen el riesgo de alguna enfermedad), y este efecto puede ser científicamente comprobado (Espín *et al.*, 2007). No se debe confundir con el término nutraceutico, que son suplementos alimenticios concentrados de agentes bioactivos o fitoquímicos presentes en los alimentos normalmente entregados en matrices no alimenticias, como comprimidos o cápsulas. Tradicionalmente, en la industria de los alimentos, las pectinas de alto metoxilo son utilizadas para la elaboración de jaleas y mermeladas. Las pectinas de alto metoxilo requieren temperaturas de ebullición, pH bajos (3-5) y altas concentraciones de azúcar (> 55 % de sacarosa) para

gelificar y obtener jaleas aceptables. Por otro lado, las pectinas de bajo metoxilo producen geles en presencia de calcio sin requerir grandes cantidades de azúcares (Acosta *et al.*, 2008). En el presente estudio sustituimos el uso de las pectinas por hidrocoloides o gomas (guar, xantana y tragacanto) para producir dispersiones semisólidas y eliminar la adición de azúcar y calcio. Las gomas utilizadas son consideradas fibras hidrosolubles.

En el campo de los alimentos, el término jalea se define como un producto preparado con el jugo o extractos acuosos de una o más frutas, mezclados con productos alimentarios que confieren un sabor dulce, con o sin la adición de agua y elaborado hasta adquirir una consistencia semisólida (CODEX STAN 296-2009).

De acuerdo con la NOM-086-SSA1-1994, una porción de jalea equivale a 15 mL y un producto reducido en azúcar debe contener menos del 25% de azúcar en comparación con el producto original. Por lo tanto, nosotros elaboramos una jalea de jugo de granada reducido en azúcar. La norma internacional CODEX STAN 296-2009 de Codex Alimentarius establece que las conservas de frutas normales deben contener $\geq 60\%$ de sólidos solubles. Las jaleas normales tienen un alto contenido de azúcar, pH ácido y A_w cercana a 0.86, por lo tanto estos productos son muy estables y pueden ser conservados a temperatura ambiente con un mínimo riesgo de que su calidad sensorial se degrade por el crecimiento de microorganismos o por cambios químicos y físicos generados por las reacciones de sus componentes. Nuestros resultados mostraron que las J y JE presentaron A_w

en un rango de 0.984-0.995 y aproximadamente 10% de sólidos solubles; esto se traduce en jaleas con un alto contenido de humedad.

Se ha documentado el uso de gomas o pectinas de bajo metoxilo en la producción de jaleas reducidas en calorías (Acosta *et al.*, 2008; Khouryieh *et al.*, 2005; Gaspar *et al.*, 1998). Sin embargo, no hay reportes sobre la producción de jaleas funcionales por la adición de antioxidantes de un subproducto de fruta (cáscara de granada).

En los alimentos los ingredientes están en constante contacto, así que el color, pH, sólidos solubles totales y A_w son parámetros importantes relacionados con la estabilidad química y física, los aspectos nutricionales y la actividad antioxidante.

Los compuestos antioxidantes son inestables durante su almacenamiento porque son sensibles a factores como temperatura, luz, pH, oxígeno y A_w . Se ha demostrado que algunos polisacáridos como las maltodextrinas, pectinas y gomas pueden proteger la degradación de antioxidantes presentes en jugos de frutas y mejorar su estabilidad por la tecnología de microencapsulación. En este caso, los jugos son mezclados con un agente acarreadores y después son deshidratados, de esta manera se produce un jugo deshidratado con A_w reducida, por lo que la estabilidad y la vida de anaquel aumenta. Righetto y Netto (2006) estudiaron la degradación de la vitamina C y el oscurecimiento no enzimático de jugo de cereza

India y ácido ascórbico encapsulados en maltodextrina DE20 y goma arábiga, y encontraron que hay una mayor degradación de la vitamina C y oscurecimiento en temperaturas de almacenamiento más altas (15, 25, 35 y 45 °C). Tonon *et al.* (2010) encontraron que en jugos de açai deshidratados producidos con maltodextrina, goma arábiga y almidón de tapioca, hubo una mayor degradación de antocianidinas y una menor actividad antioxidante conforme aumentaron las Aw y temperaturas de almacenamiento.

En relación con los preparados evaluados en el presente estudio, tanto el J y como el JE mostraron un incremento en la coloración roja y EC después de 8 semanas de almacenamiento; es posible que estos cambios sean causados por copigmentación. La catequina y la epicatequina son consideradas proantocianidinas porque pueden ser convertidas a cianidinas en medio ácido y presencia de metales de transición. Las antocianidinas son pigmentos azules-rojos encontrados en las plantas, altamente reactivas y sufren generalmente degradación durante su almacenamiento. Es sugerido que la copigmentación de las antocianidinas es el primer paso hacia la formación de pigmentos poliméricos más estables (Lorenzo *et al.*, 2005). La copigmentación es un fenómeno en el cual los pigmentos u otros compuestos conocidos como cofactores o copigmentos forman complejos moleculares (interacciones π - π), generando cambio en la intensidad del color. Ácidos fenólicos, antocianidinas, alcaloides, amino ácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos y también iones metálicos son algunos ejemplos de copigmentos (Pacheco-Palencia y Talcott, 2010; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

La copigmentación puede ser detectada por fenómenos hipercrómicos (donde ocurre mayor intensidad de absorbancia en la misma longitud de onda) y fenómenos batocrómicos (donde la absorbancia se mueve hacia longitudes de onda mayores). La magnitud de la copigmentación es mayor en pH bajos. Los copigmentos son ricos en electrones y son capaces de asociarse con antocianidinas iónicas formadas bajo condiciones ácidas (pH 1-6), por ejemplo con el catión rojo flavilium que está presente en pH cercanos a 1 y es pobre en electrones. Algunos investigadores han observado reacciones similares entre los taninos y los flavan-3-ols, como la catequina (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Tanto el jugo como el extracto son matrices complejas con diferentes compuestos como fenoles, tioles, vitaminas y azúcares que pueden mostrar actividad antioxidante. Además, la actividad antioxidante está influenciada por el pH, Aw, composición química (tipo y concentración de antioxidantes), luz, temperatura y solventes. En este estudio, usamos tres métodos para medir la actividad antioxidante. Los ensayos de DPPH y ABTS fueron usados para medir la capacidad de las muestras para secuestrar radicales libres sintéticos, es decir, actividad antiradicalaria (AAR). La prueba de oxidación del ácido linoléico permitió medir la interacción entre las muestras con los peróxidos derivados del lípido. El reactivo de Folin-Ciocalteu fue usado para la determinación de compuestos fenólicos. Este método es el más usado en por los investigadores a nivel mundial, sin embargo, el reactivo de Folin también puede ser reducido por otros

compuestos reductores (Everette, *et al.*, 2010; Starzyńska-Janiszewska *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2005).

El extracto de cáscara de granada presentó aproximadamente 22 y 3% de antioxidantes tipo fenol y tiol respectivamente y la adición de E al J aumentó en contenido antioxidante y la actividad antioxidante, pero disminuyó el pH. La actividad química y antioxidante está directamente afectada por el pH. El AE es un antioxidante que presentó AAR contra el ABTS y DPPH; además, el AE fue detectado en el extracto, esto puede explicar el aumento en la acidez en el JE.

En general los compuestos fenólicos son absorbidos a 280 nm y tienen más actividad antioxidante en pH ácidos. Polewski *et al.* (2002) observaron que el ácido gálico en pH básico muestra una menor absorbancia a 280 nm, dado que el pH puede afectar el grado de ionización. Amendola *et al.* (2010) mostraron que a pH 3 y 5, una solución de AG a 500 ppm y un extracto de residuos de uva almacenados en la oscuridad a 4 °C, mantuvieron su habilidad para reaccionar con los ABTS^{•+} y reducir el reactivo de Folin por entre 60 y 400 días, respectivamente. En contraste, en pH 7 y 9 se generó una gran pérdida de actividad antioxidante, cerca de 80 y 50% para el ácido gálico y el extracto de uva respectivamente.

Por otro lado, en las muestras de JE se observó un incremento en el porcentaje de autoxidación del ácido linoléico a las 8 semanas. Muchos compuestos orgánicos tales como el catecol e hidroquinona, pueden reaccionar

con los radicales peroxilos para formar quininas, que absorben a 234 nm (Huang *et al.*, 2005).

8.5. Actividad biológica *in vivo* de la JE

El grado de hiperglucemia y severidad de la diabetes, depende de una serie de factores, entres los cuales destacan, la especie, cepa, edad, sexo, vía de administración y dosis administrada.

Durante el estudio del efecto de extracto de cáscara de granada sobre la glucemia en ratones diabéticos (una dosis 137 mg STZ/kg), observamos que los animales presentan hiperglucemias severas (>600 mg/dL), poco estables y heterogéneas, significativa pérdida de peso, polidipsia, poligafia y polidipsia, además los animales se encontraban continuamente alterados y finalmente observamos una alta letalidad. Por tal razón, se decidió estandarizar el modelo para inducir una diabetes menos severa y homogénea.

Como se mencionó anteriormente, la severidad del daño producido por la STZ depende de diversos factores entre los que destacan la dosis y el número de dosis. Se puede considerar que hay dos modelos para inducir diabetes con STZ en ratones: el modelo de una dosis alta o UDA (70-250 mg/kg) y el de múltiples dosis bajas o MDB (de 3 a 5 administraciones de 40 ó 30 mg/kg). El modelo de MDB genera glucemias estables, menor mortalidad y daño menos severos

comparado con el modelo UDA (Ventura-Sobrevilla *et al.*, 2011; Tesch y Allen, 2007; Takamura *et al.*, 1999).

Basados en la literatura y buscando un modelo más estable y con menor letalidad, decidimos evaluar el efecto de diferentes dosis de STZ sobre la glucemia en ratones macho cepa CD1. Para cual usamos ambos modelos UDA y MDB. Para el UDA se realizó una sola administración de STZ en dos dosis (130 y 150 mg/kg) y para el MDB, se administró durante 2, 3, 4 y 5 días consecutivos una dosis de (40 mg/kg), los animales fueron observados duran 28 días. Para el modelo de UDA, encontramos que al tercer día de la administración de la STZ, los animales presentaron hiperglucemias severas (>600 mg/dL) y poco estables y pérdida de para ambas dosis; y para el día 21 observamos hasta un 50 % de letalidad para la dosis de 150 mg/kg. Respecto al modelo de MDB, hiperglucemias moderadas (250-450mg/dL) y estables, pérdida de peso y 0 % de letalidad fue observado a los 28 días con tres o más administraciones de STZ. De esta manera comprobamos que el grado de hiperglucemia es dependiente de la dosis de STZ empleada. Estos resultados sirvieron para la publicación de un artículo científico en una revista indizada (Ventura-Sobrevilla *et al.*, 2011).

Además de la hiperglucemia, la DM se está asociada a estrés oxidante e inflamación crónica. Estrés oxidante se puede definir como un desbalance de los antioxidantes del tipo no enzimático (ejemplo GSH) y enzimático (catalasa) y los sistemas oxidantes (ejemplo, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, ERO

y ERN, respectivamente) a favor de los segundos. Es decir, cuando la producción de moléculas oxidantes es superior a la capacidad antioxidante del organismo.

La STZ es generadora de ERO, como el $O_2^{\bullet-}$. Este radical, al reaccionar con el NO genera anión o radical peroxinitrito (ONOO), un potente agente de lipoperoxidación (Szkudelski, 2001). Por otro lado la enzima superóxido dismutasa (SOD), cataliza la conversión del $O_2^{\bullet-}$ a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 puede atravesar las membranas y difundir por el citosol que, presencia de Fe^{+2} genera $\bullet OH$. El $O_2^{\bullet-}$ puede reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} . El $\bullet OH$ puede oxidar los lípidos y empezar una reacción en cadena, dañando estructura y función de las membranas celulares. La catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) son dos enzimas que convierten el H_2O_2 o los lípidos peroxidados (ROOH) a H_2O o RH (Roberts y Sindhu, 2009).

La CAT (EC 1.11.1.6.) es sintetizada por dos familias de genes, una familia relacionada con catalasa de grupo hemo que está altamente conservada en células procariontas y eucariontas, mientras que la otra familia se encuentra relacionada con las catalasa dependientes de Mg sin grupo hemo presente sólo en bacterias (Vlasits *et al.*, 2010). La CAT es una enzima no michaeliana, excepto en bajas concentraciones de sustrato (Nicholls *et al.*, 2001).

En enfermedades crónicas degenerativas como la DM, la relación GSH/GSSG y las actividades de las enzimas antioxidantes se ve reducida, este

decremento se asocia con hiperglucemia e aumento de formación de ERO, ERN y lipoperoxidación (Forman *et al.*, 2009; Iwasaki *et al.*, 2009; Giustarini *et al.*, 2003).

La peroxidación de lípidos guía a un aumento en el número de productos secundarios, la mayoría de estos productos son del tipo aldehído (CHO) (Uchida, 2000). El MDA es uno de los principales biomarcadores de lipoperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados conjugados. En estados fisiológicos normales y pH neutro, el MDA se encuentra en forma de ion enolato, el cual es poco reactivo, sin embargo, esta molécula es capaz de reaccionar con el nitrógeno de las bases de los ácidos nucleicos y con el grupo aminos de las proteínas produciendo diferentes aductos (Marnett, 1999; Estebauer *et al.*, 1991).

El ácido elálgico, los ácidos hidroxibenzóicos y el GSH son donadores de H⁺ (Roberts y Sindhu, 2009), estos donadores facilitan la actividad de la CAT y GPx para reducir el H₂O₂ y ROOH. En el extracto y jaleas encontramos antioxidantes fenólicos y tioles que pueden estar aumentando la actividad catalasa, la relación de GSH/GSSG y disminuyendo los niveles de LPO en ratones sanos. En los animales diabéticos no se observaron cambios en los marcadores de estrés oxidante seleccionados, probablemente debido al daño moderado de que produjo la STZ y se requiera de mayor tiempo de análisis para ver los efectos.

Es difícil hacer la comparación de nuestros resultados con lo obtenido por otros autores, pues la mayoría de los trabajos realizados con granada (diversas

partes) usan ratas como animales de experimentación. Con respecto a los ratones, en pocos trabajos se ha usado la cepa CD1. Es decir, se requiere de la misma especie, cepa y modelos, métodos de medición y tejido analizado. En la Tabla 19 se observan los valores hepáticos de ratón para algunos marcadores.

Respecto a la granada, Kaur *et al.* (2006), mostraron que las dosis de 100 y 150 mg/kg de un extracto etanólico de flores redujeron los niveles hepáticos de MDA y aumentaron los valores de GSH y CAT, en ratones Swiss albino con hepatotoxicidad inducida con nitriloacetato férrico (Fe-NTA). En ratas Sprague-Dawley tratadas con ácido tricloroacético durante 52 días, una decocción de cáscara de granada no afectó los niveles de MDA y GSH (Celik *et al.*, 2009). En ratones Swiss albino con diabetes inducida con alloxana tratados oralmente con extracto cáscara de granada, disminuyó los niveles de LPO hepática, cardíaca y renal, aumentó los niveles de GSH y no modificó la actividad CAT, en comparación al grupo diabético (Parmar y Kar, 2007). La administración de STZ en ratas Wistar, disminuyó la actividad CAT y aumentó los niveles de MDA de hígado y riñón, la administración oral de un extracto de cáscara de granada (20 mg/kg) durante 4 semanas redujo los daños ocasionados por la STZ (Althunibat *et al.*, 2010).

Tabla 19. Niveles hepáticos de GSH, MDA y CAT de ratones.

Especie (cepa)	Modelo	Parámetro	Valor	Unidades	Autor
Ratón cepa	Control	GSH	28.7	μ mol/ g proteína	Bansal <i>et al.</i> 2011

Swiss albino			CAT	130.9	U/ mg proteína	
			MDA	270	n mol/ g proteína	
Ratón	Control					Badole y Bodhankar, 2010
Swiss albino			GSH	82.01	μ mol/ g proteína	
			MDA	2501	n mol/ g proteína	
	Diabético					
	STZ 200 mg/kg		GSH	50.26	μ mol/ g proteína	
	pretratado con nicotinamida (12 h) i.p.		MDA	4900	n mol/ g proteína	

La STZ induce la infiltración de macrófagos en los islotes del páncreas. Estas células activas producen óxido nítrico (NO) y citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6. Por otro lado, la STZ por sí misma es donadora de NO, al ser metabolizada dentro de la célula; sin embargo, esta liberación de NO es independiente al mecanismo antes descrito. Algunos antioxidantes previenen la producción de NO y citocinas al aumentar la expresión del factor de transcripción de PPAR γ presente en macrófagos activados. Como se mencionó, la pioglitazona y la granada (ácido gálico) tienen efectos sobre estos factores de transcripción. En nuestros resultados no observamos cambios en los niveles pancreáticos de IL-1 β y TNF- α , lo cual se puede explicar por los niveles que se midieron en ratones sanos sin STZ, por lo tanto no se presentó la infiltración de macrófagos, además se trabajó con homogenizados de páncreas completo, en lugar de usar los islotes pancreáticos o los macrófagos presentes en el páncreas.

Varios factores influyen sobre la absorción del compuestos fenólicos:

(i) la influencia de la matriz alimentaria, (ii) la concentración y tipo de compuesto,

(iii) grado y tipo de polimerización y esterificación y (iv) la variabilidad individual. Como se mencionó, el ácido elágico y sus polímeros pueden ser absorbidos en el estómago y duodeno dependiendo de la cantidad y tipo de esterificación o absorbidos después de que son metabolizados por la microflora de intestino grueso. Sin embargo, el jugo de granada comercial contiene una mezcla de jugo de granada y manzana, ambos tienen una gran cantidad de compuestos fenólicos, por otro lado en la jaleas se agregan hidrocoloides o gomas alimentarias que son fibras hidrosolubles. Es decir, la complejidad de la matriz alimentaria de las jaleas (con y sin extracto) es mayor a la obtenida en el extracto solo. En el análisis químico, antioxidante y físico observamos que los fenómenos de copigmentación y la alteración en el color y actividad antioxidante afectaron las jaleas. Esto puede explicar el diferente comportamiento biológico entre las JE, J y E.

9. Conclusiones

La cáscara de granada tiene un alto contenido de fenoles totales.

La decocción de cáscara de granada permite la extracción de un mayor contenido de polifenoles.

La dosis efectiva del extracto de granada para reducir la glucemia en estudio subagudo fue de 25 mg/kg.

La DL_{50} intraperitoneal del extracto en ratones fue de 147 mg/kg, mientras que la DL_{50} oral fue mayor a 3155 mg/kg.

Se elaboró una jalea de jugo de granada reducida en azúcar adicionada con extracto de cáscara de granada. Dicha jalea mostró efecto sobre la glucemia y actividad antioxidante en ratones sanos.

Existe un gran potencial terapéutico en un subproducto agrícola considerado un desperdicio, como lo es la cáscara de granada.

10. Bibliografía

- Aasum, E., Belke, D. D., Severson, D. L., Riemersma, R. A., Cooper, M., Andreassen, M., Larsen, T. S. (2002). Cardiac function and metabolism in type 2 diabetic mice after treatment with BM 17.0744, a novel PPAR-alpha activator. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 283: H949-H957.
- Abd El Wahab, S. M., El Fiki, N. M., Mostafa, S. F., Hassan, A. E. B. (1998). Characterization of certain steroids hormones in *Punica granatum* L. seeds. *Bulletin on the Faculty of Pharmacy. Cairo University*. 36: 11-15.
- Acosta, O., Vázquez, F., Cubero, E. (2008). Optimization of low calorie mixed fruit jelly by response surface methodology. *Food Quality and Preference*. 19: 79-85.
- ADA. (2011). American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 34: S62-S69.
- Aebi, H. E. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 105: 121-126.
- Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C. G., Reed, J. D., Mukhtar, H. (2005). Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF κ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD1 mice. *International Journal of Cancer*. 113: 423-433.
- Aguilera-Carbo, A. F., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Aguilar, C. N., Favela-Torres, E. (2008). Extraction and analysis of ellagic acid from novel sources. *Chemical Papers*. 62: 440-444.

- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., White, M. F. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *Biological Chemistry*. 275: 9047-9054.
- Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., White, M. F. (2002). Phosphorylation on Ser³⁰⁷ in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *Biological Chemistry*. 277: 1531-1537.
- Ahmed, S., Naizhen, W., Hafeez, B. B., Cheruvu, V. K., Haqqi, T. M. (2005). *Punica granatum* extract inhibits IL-B-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF- κ B in human chondrocytes *in vitro*. *Journal of Nutrition*. 135: 2096-2102.
- Ajaikumar, K. B., Asheef, M., Babu, B. H., Padikkala, J. (2005). The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 96: 171-176.
- Alighourchi, H., Barzergar, M., Abbasi, S. (2008). Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology*. 227: 881-887.
- Al-Maiman, S. A., Ahmad, D. (2002). Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chemistry*. 76: 437-441.

- Althunibat, O. Y., Al-mustafa, A. H., Tarawneh, K., Khleifat, K., Ridzwan, B. H., Qaralleh, H. M. (2010). Protective role of *Punica granatum* L. peel extract against oxidative damage in experimental diabetic rats. *Process Biochemistry*. 45: 581-585.
- Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. (2000). Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*. 891:183-188.
- Amendola, D., De Faveri, D. M., Spigno, G. (2010). Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *Journal of Food Engineering*. 97: 384-392.
- Amjad, H. (2005). Pomegrante. ISBN-10 1411662780.
- Amorin, A. (1995). Test of mutagenesis in mice treated with aqueous extracts from *Punica granatum* L. *Revista Brasileira de Farmacia*. 74: 110-111.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 325-348.
- AOAC. (1992). Official methods of analysis of AOAC international. Ed. William Horwitz, México.
- Arner, P. (2003). The adipocyte in insulin resistance: Key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 14: 137-145.

- Arseculeratne, S. N., Gunatilaka, A. A. L., Panabokke, R. G. (1985). Studies on medicinal plants of Sri Lanka. Part 14. Toxicity of some traditional medicinal herbs. *Journal of Ethnopharmacology*. 13: 323-335.
- Artik, N. (1998). Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Processing*. 8: 492-499.
- Asdule, R. N and Patil, N. B. (1995). Pomegranate. In *Handbook of fruit science technology production, composition, storage and processing*. Salunke, D. K. and Kadam, S. S. (Eds). Editorial Marcel Dekker. New York, USA. ISBN0-8247-9643-8.
- Aviram, M., Dornfeld, L. (2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 158:195-198.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Klapan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic, modification to LDL, and platelet aggregation: studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71: 1062-1076.
- Azadzo, K. M., Schulman, R. N., Aviram, M., Siroky, M. B. (2005). Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *Journal of Urology*. 174:386-393.
- Badole, S. I., Bodhankar, S. L. (2010). Antidiabetic activity of cycloart-23-ene-3 β , 25 diol (B2) isolated from *Pongamia pinnata* (L. Pierre) in streptozotocin-

- nicotinamide induced diabetic mice. *European Journal of pharmacology*. 632: 103-109.
- Badria, F A. (2002). Melatonin, serotonin and tryptamine in some Egyptian food and medicinal plants. *Journal of Medicinal Food*. 5: 153-157.
- Bagri, P., Ali, M., Bhowmik, M. Sultana S. (2009). Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 50-54.
- Bahtiyar, G., Shin, J. J., Aytaman, A., Sowers, J. R., McFarlane, S. I. (2004). Association of diabetes and hepatitis C infection: epidemiologic evidence and pathophysiologic insights. *Current Diabetes Reports*. 4: 194-198.
- Bansal, P., Paul, P., Mudgal, J., Nayak, P. G., Pannakal, S. T. (2011). Antidiabetic, antihyperlipidemic of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes. *Experimental and Toxicology pathology*. En prensa.
- Bastarrachea, R. A., López-Alvarenga, J. C., Bolado-García, V. E., Téllez-Mendoza, J., Laviada-Molina, H., Comuzzie, A. G. (2007). Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gaceta Médica de México*. 143: 505-512.
- Baynes, W. J., Thorpe, R. S. (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes*. 48: 1-9.
- Ben Nasr, C., Ayed, N., Metche, M. (1996). Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forshung*. 203: 374-378.

- Berg, J., Stryer, L., Tymoczko, J. (2008). In *Biochemistry*, 6th.
Editorial REVERTÉ. Barcelona, España. ISBN 978-84-291-7600-1.
- Berger, J., Moller, D. E. (2002). The mechanism of action of PPARs. *Annual Review of Medicine*. 53: 409-435.
- Berger, J., Tanen, M., Elbrecht A., Hermanowski-Vosatka, A., Moller, D. E., Wright, S. D., Thieringer, R. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit adipocyte 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 12629-12635.
- Bishop-Bailey, D., Wray, J. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor: critical review on endogenous pathways for ligands generation. *Prostaglandins & Other Lipids Mediators*. 71: 1-22.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology*. 28: 25-30.
- Buchczyk, D. P. Grune, T., Sies, H., Klotz, L. O. (2003). Modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by increasing concentration of peroxynitrite: early recognition by 20S proteasome. *Biochemical Chemistry*. 384: 237-241.
- Burney, S., Caulfield, J. L., Niles, J. C., Wishnok, J. S. Tannenbaum, S. R. (1999). The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutation Research*. 424: 37-49.

- Busik, J. V., Chen, W., Jump, D. B., Grant, M. B., Esselman, W. J. (2005). Anti-inflammatory effect of PPAR α in human retinal vascular endothelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 46: E4708.
- Caceres, A., Giron, L. M., Alvarado, S. R., Torres, M. F. (1987). Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 20: 223-237.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. L., Paéz-Hernández, M. A., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 113: 859-871.
- Castrejón, V., Carbo, R., Martínez, M. (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Revista de Educación Bioquímica*. 26: 49-57.
- Celik, I., Temur, A., Isik, I. (2009). Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against tricholoacetic acid exposed in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 145-149.
- Cerda, B., Cerón, J. J., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A. (2003). Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *Journal of Agricultural food chemistry*. 51: 3493-3501.
- Ceriello, A., Motz, E. (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 24: 816-823.

- Chauhan, D., Chauhan, J.S. (2001). Flavonoid diglycoside from *Punica granatum*. *Pharmaceutical Biology*. 39: 155-157.
- Chen, S., Mukherjee, S., Chakrabarti, C. (2003). High glucose-induced, endothelin-dependent fibronectin synthesis is mediated via NF- κ B and AP-1. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 284: C263-C272.
- Chirino, Y., Orozco-Ibarra, M., Pedraza-Chaverrí, J. (2006). Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Revista de Investigación Clínica*. 58: 350-358.
- CODEX STAN 192-1995. (1995). Codex Standard for food additives.
- CODEX STAN 296-2009. (2009). Codex Standard for jam, jellies and mermelades.
- Consentino, F., Hishikawa, K., Katusic, Z. S., Luscher, T. F. (1997). High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human cells. *Circulation*. 96: 25-28.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Products Reports*. 26: 1001-1043.
- Dalimov, D. N., Dalimova, G. N., Bhatt, M. (2003). Chemical composition and lignins of tomato and pomegranate seeds. *Chemistry of Natural Compounds*. 39: 37-40.
- Dandona, P., Aljada, A., Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in immunology*. 25: 4-7.
- De Candolle, A. 1967. *Origin of Cultivated Plants*. Hafner Publishing Co., New York.

- De la Fuente, J. A., Manzanaro, S. (2003). Aldose reductase inhibitors from natural sources. *Natural Products Reports*. 20: 243-251.
- De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 5331-5337.
- Desta, B. (1995). Ethiopian traditional herbal drugs. Part I: studies on the toxicity and therapeutic activity of local taenicidal medication. *Journal of Ethnopharmacology*. 45: 27-33.
- Du, C.T., Wang, P.L., Francis, F.J. (1975). Anthocyanins of pomegranate, *Punica granatum*. *J. Food Sciences*. 40: 417-418.
- Dubois, M., Guiles, K. A., Haminton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*. 21: 145-149.
- Duncan, B. B., Schmidt, M. I., Pankow, J. S., Ballantyne, C. M., Couper, D., Vigo A., Hoogeveen, R., Folsom, A. R., Heiss, G. (2003). Low-grade systematic inflammation and the development of type 2 diabetes. *Diabetes*. 52: 1799-1805.
- Dutta, A. C. 1982. *Botany for Degree Students*. Oxford University Press, New Delhi, India.
- Elgamal, M.H.A., Fayez, M.B.E. (1964). Thin-layer chromatography of triterpenoid acids. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 211: 190-194.

- El-Kabbani, O., Ruiz, F., Darmanin, C., Chung, R. P. T. (2004). Aldose reductase structure: implications for mechanism and inhibition. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61: 750-762.
- El-Toumy, S. A. A., Marzouk, M. S., Rauwald, H. W. (2001). Ellagi- and gallotannins from *Punica granatum* heartwood. *Pharmazie*. 56: 823-824.
- Ercisli, S., Orhan, E., Hizarci, Y. (2008). Fatty acids composition of some pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties grown in Southeastern Anatolia region in Turkey. *Asian Journal of Chemistry*. 20: 2441-2444.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*. 68: 2986-3008.
- Espinosa, I. O. (2007). Tesis nivel doctorado. Estrés oxidativo y expresión de proteínas relacionadas en enfermedades de alto riesgo cardiovascular: estudio especial de la hipertensión arterial. Universitat de València. España. ISBN. 978-84-370-6937-1.
- Estebauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and medicine*. 11: 81-128.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58: 8139-8144.
- Evreinoff, V.A. 1949. The pomegranate. *Fruits Outre. Mer*. 4, 161-170 (French).

- Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, M. H., Bayat, M. (2005). Note. Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Science and Technology International*. 11: 113-119.
- Falsaperla, M., Morgia, G., Tartarote, A., Ardito, R., Romano, G. (2005). Support to ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and stramustine phosphate. *European Urology*. 47: 449-455.
- FDM. Federación Mexicana de Diabetes (2010). Página Web http://www.fmdiabetes.org/v2/paginas/d_numeros.php. (Acceso en Febrero, 2010).
- Fengchun, H., Liu, X., Chen, H. 1997. Medicine for treatment of infectious oral diseases. Chinese Patent 1145793A.
- Ferrara, L., Schettino, O., Forgione, P., Rullo, V., Di Gennaro, S. (1989). Identification of the root *Punica granatum* in galleonic preparations using TLC. *Bolletino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*. 65: 385-390.
- Forman, H. J., Zhang, H., Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles measurement and biosynthesis. *Molecular Aspect of Medicine*. 30: 1-12.
- Friedman, E. A. (1992). Advanced glycosylated end products and hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*. 22: B65-B71.
- Fuentes, V., Rodríguez, N., Poucheaux, M., Cabrera, L., Lara, B. (1985). Estudios en la medicina tradicional en Cuba II. *Revista Plantas Medicinales*. 5: 13-40.

- Gabbasova, L. B., Abdurazakova, S. K. (1969). Chemical composition of pomegranate juice. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Pischevaya Tekhnologiya: Nauchno-Tekhnicheskii Zhurnal.* 4: 30-31.
- Gao, Z., Zhang, X., Zuberi, A., Hwang, D., Quon, M. J., Lefevre, M., Ye, J. (2004). Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acid requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology.* 18: 2024-2034.
- Gaspar, C., Laureano, O., Sousa, I. (1998). Production of reduced-calorie grape juice jelly with gellan, xanthan and locust bean gums:sensory of texture. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A.* 206: 169-174.
- Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J-C., Chaudière, J. (1998). Reaction of 1-Methyl-2-Phenilindole with malondialdehyde and 4-hydroxialkenals. Analytical application to colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxico.* 11: 1176-1183.
- Gil, M. I., Tomas-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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 48:4581-4589.
- Gisutarini, D., Dalle-Done, I., Colombo, R., Milzani, A., Rossi, R. (2003). An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free radical biology and medicine.* 35: 1365-1372.

- Glugliucci, A. (2000). Glycation as the glucose link to diabetic complication. J. American Osteopathic Association. 100: 621-633.
- Graça, M., Dandle, S., Antunes, D., Neves, A., Martins, D. (2004). The effect of two methods of pomegranate (*Punica granatum* L) juice extraction on quality during storage at 4 °C. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 5: 332-337.
- Guarda, E., Katwa, L. C., Mayers, P. R. (1993). Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblast. Cardiovascular Research. 27: 2130-2134.
- Guerre-Millo, M., Gervois, P., Raspe, E., Madsen, L., Poulain P., Derudas, D., Herbert, J., Winegar, D., Willson T., Fruchart, J., Staels, B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor α activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. Journal of Biological Chemistry. 275: 16638-16642.
- Hartman, R.E., Shah, A., Fagan, A. M., Schwetye, K. E., Parsadanian, M., Schulman, N. R., Holtzman, D. M. (2006). Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiology of Disease. 24:506-515.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C. S., Uyzal, K. T., Maeda, K., Karin, M., Hotamisligil, G. S. (2002). A role central for JNK in obesity and insulin resistance. Nature. 420: 333-336.
- Hornung, E., Pernstich, C., Feussner, I. (2002). Formation of conjugated Δ 11, Δ 13-double bonds by Δ 12-linoleic acid (1,4)-acyl-lipid desaturase in pomegranate seeds. European Journal of Biochemistry. 269: 4852-4859.

- Houstis, N., Rosen E. D., Lander, E. S. (2006). Reactive species have a casual role in multipl forms of insulin resistance. *Nature*. 440: 944-948.
- Hu, M. L., Dillard, C. J., Tappel, A. I, (1998). In vivo effects of aurothioglucose and sodium thioglucose on rat tissue sulfhydryl levels and plasma sulfhydryl reactivity. *Agents Action*. 25: 132-138.
- Hu, W. (1997). Skin health inflammatory inucta and producing process thereof. Chinese Patent 1156617A.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Food Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- Huang, T. H., Peng, G., Kota, B. P., Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D., Li, Y. (2005a). Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR- γ and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 207: 160-169.
- Huang, T. H., Peng, G., Kota, B. P., Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D., Li, Y. (2005b). Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model: role of lowering circulating lipids. *British Journal of Pharmacology*. 145: 767-774.
- Huang, T. H., Yang, Q., Harada, M. (2005c). Pomegranate flowers extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin and nuclear factor-kappa B pathways. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 46: 856-862.
- Hussein, S. A. M., Barakat, S. H., Merfort, I., Nawwar, M. A. M. (1997). Tannins from the leaves of *Punica granatum*. *Phytochemistry*. 45: 819-823.

- Iglarz, M., Touyz, R. M., Veil, E. C. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and receptor activators prevent cardiac fibrosis in mineralocorticoid-dependent hypertension. *Hypertension*. 42: 737-743.
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., de Nigris, F., Napoli, C. (2006). Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric Oxide*. 15: 93-102.
- Ippoushi, K., Takeuchi, A., Azuma, K. (2009). Prevention of peroxynitrite-induced oxidation and nitration by ellagic acid. *Food Chemistry*. 112: 185-188.
- Ivashchenko, C. Y., Duan, S. Z., Usher, M. G., Mortensen, R. M. (2007). PPAR-gamma knockout in pancreatic epithelial cells abolishes the inhibitory effect of rosiglitazone on caerulein-induced acute pancreatitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 293:319-326.
- Iwasaki, Y., Saito, Y., Nakano, Y., Mochizuki, K., Sakata, O., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H. (2009). Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J. of chromatography B*. 877: 3309-3317.
- Jafri, M. A., Aslam, M., Javed, K., Singh, S. (2000). Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 70: 309-314.
- Jung, S. H., Lim, S. S., Lee, S., Lee, Y. S., Shin, K. H., Kim Y. S. (2003). Aldose reductase inhibitory activity of methanol extract from the Korean plants. *Natural Products Sciences*. 9: 34-37.
- Jurenka, J. (2008). Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. *Alternative Medicine Review*. 13: 128-143.

- Kang, K. S., Tanaka, T., Cho, E. J., Yokozawa, T. (2009). Evaluation of peroxynitrite of heat-processed ginseng. *Journal of Medicinal Food*. 12: 124-130.
- Katz, S. R., Newman R. A., Lansky, E. P. (2007). *Punica granatum*: Heuristic treatment for diabetes mellitus. *Journal of Medicinal Food*. 10: 213-217.
- Kaur, G. Jabbar, Z., Athar, M., Alam, M. S. (2006) *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and chemical toxicology*. 44: 984-993.
- Khalil, E. A. M. (2004). Antidiabetic effect of an aqueous extract of pomegranate (*Punica granatum* L) peels in normal and alloxan diabetic rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 16:92-99.
- Khouryieh, H. A., Aramouni, F. M., Herald, T. J. (2005). Physical, chemical and sensory properties of sugar-free jelly. *Journal of Food Quality*. 28: 179-190.
- Kim, N. D., Mehta, R., Yu, W., Newman, I., Linyey, T. A., Proirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R., Ramachandran, C., Rabi, T., Kaplan, B., Lansky, E. (2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 71: 203-217.
- King, G. L., Loeken, M. R. (2004). Hyperglycemia-induced stress oxidative in diabetic complications. *Histochemistry and Cell Biology*. 122: 333-338.
- Knobler, H., Zhornicky, T., Sandler, A., Haran N., Ashur, Y., Schattner, A. (2003). Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance may mediate the

- hepatitis C virus-diabetes association. *American Journal Gastroenterology*. 98: 2751-2756.
- Kota, B. P., Huang, T. H-W., Roufogalis, B. D. (2005). An overview on biological mechanism of PPARS. *Pharmacological Research*. 51: 85-94.
- Kubaszek, A., Pihlajamäki, J., Komarovski, V., Lindi, V., Lindstrom, J., Eriksson, J., Valle T. T., Hämäläinen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Tuomilehto, J., Uusitupa, M., Laakso, M. (2003). Promoter polymorphisms of the TNF- α and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes. The Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes*. 52: 1872-1876.
- Lad, V., Frawley, D. 1986. *The Yoga of Herbs*. Lotus Press, Santa Fe, NM, pp. 135-136.
- Langley, P. 2000. Why a pomegranate? *British Medical Journal*. 321: 1153-1154.
- Lansky E. P., Newman R. A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 177-206.
- Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A. (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular Aspects of Medicine*. 31: 513-539.
- Latha, M., Pari, L. (2004). Effect of an aqueous extract of *Scoparia dulcis* on blood glucose, plasma insulin and some polyol enzymes in experimental rat diabetes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 37:577-586.

- Lei, F., Xing, D. M., Xiang, L., Zhao, Y. N., Wang, W., Zhang, L. J., Du, L. J. (2003). Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. *J. of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 796: 189-194.
- Lemieux, I., Pascot, A., Prud'homme D., Alméras, N., Bogaty, P., Nadeau A., Bergeron, J., Després, J. (2001). Elevated C-reactive protein another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 21: 961-967.
- Li, Y., Peng, G., Li, G. Q., (2004). *Salacia oblonga* improves cardiac fibrosis and inhibits postprandial hyperglycemia in obese Zucker rats. *Life Science*. 75: 1735-1746.
- Li, Y., Qi, Y., Huang, T. H. W., Yamahara, J., Roufogalis, B. (2008). Pomegranate flower: a unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR- α / γ activator properties. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 10: 10-17.
- Li, Y., Wen, S., Kota, B. P., Peng, G, Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D. (2005). *Punica granatum* flowers extract, a potent α -glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 239-244.
- Lisbeth, A., Noratto, G., Hingorani, L., Talcott, S. T., Mertens-Tacott, S. U. (2008). Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 8434-8441.

- Liu, J. (2005). Oleonolic and ursolic acid: research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 92-95.
- López, B. L. N. (2004). Papel de las isoformas de la proteína inhibidora I κ B en la activación del factor de transcripción NF κ B. *Revista Española de Biología*. 23: 140-148.
- Lorenzo, C., Pardo, F., Zalacain, A., Alonso, G. L., Salinas, M. R. (2005). Effect of red grapes co-winemaking in polyphenols and color of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7609-7616.
- Lorenzo, M., Fernández-Veledo, S., Vila-Bedmar, R., Garcia-Guerra, L., De Alvarado, C., Nieto-Vazquez, I. (2007). Insulin resistance induced by tumor necrosis factor alpha in myocytes and brown adipocytes. *Animal Science*. 86: E94-E104.
- Malaguarnera, M., Vacante, M., Avitabile, T., Malaguarnera, M., Cammalleri, L., Motta, M. (2009). L-carnitine supplementation reduces oxidized LDL cholesterol in patients with diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*. 89: 71-76.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., Watkins, J. B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Biochemical Molecular Toxicology*. 17: 25-38.
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*. 424: 83-95.
- Martin, F. W., Campbell, C. W., Ruberte, R. M. (1987). Perennial edible fruits of the tropics: An inventory. *USDA-ARS Agric. Hdbk*. 642.

- Meigs, S. B., Larson, M. G., Fox, C. S., Keaney, J. F. J., Vasan, R. S., Benjamin, E. J. (2007). Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. 30: 2529-2535.
- Melgarejo, P., Salazar, D. M., Artes, F. (2000). Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *European Food Research and Technology*. 211: 185-190.
- Menezes, S. M., Cordeiro, L. N., Viana, G. S. (2006). *Punica granatum* (pomegranate) extract is active against dental plaque. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*. 6:79-92.
- Miller, G. L. (1989). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 246-428.
- Miranda-Garduño, L. M., Reza-Albarrán, A. (2008). Obesidad, inflamación y diabetes. *Gaceta Médica de Méxicio*. 144: 39-46.
- Mirdehghan, S. H., Rahemi, M. (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*. 111: 120-127.
- Moayadi, A. (2004). Mixtures of pomegranate seed oils for cosmetics. Japanese Patent, JP 2004083544 A2 20040318.
- Mohan Kumar, G. N. (1990). Pomegranate. In *Fruits of tropical and Subtropical origin*. Nagy, S and Shaw, P. E. (Eds). Florida Sciences source. Florida USA. ISBN 0-944961-00-2.

- Moller, D. E., Berger, J. P. (2003). Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation. *International Journal of Obesity*. 27: S17-S21.
- Moon, H. K., Yang, E. S., Park, J. W. (2006). Protection of peroxynitrite-induced DNA damage by dietary antioxidants. *Archives of Pharmacology Research*. 29: 213-217.
- Moras, D., Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain-structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*. 10: 384-391.
- Moreno Aliaga, M. J., Lorente-Cebrián, S., Pérez-Echarri, N., Hernández, J. A. M. (2008). Vistafina, Apelina y nuevas moléculas del síndrome metabólico. *Revista Española de la Obesidad*. 6: 205-214.
- Murthy, K. N. C., Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P. (2002). Studies on Antioxidant Activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4791-4795.
- Murthy, K. N. C., Jayaprakasha, G. K., Singh, R.P. (2002). Studies on Antioxidant Activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4791-4795.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G. A., Chen, H., Evans, R. M. (1998). Oxidized LDL regulated macrophage gene expression through activation of PPAR- γ . *Cell*. 93: 229-240.
- Nakagawa, T., Yokozawa, T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology*. 40: 1745-1750.

- Nakamori, Y., Emoto, M., Fakuda, N., Taguchi, A., Okuya, S., Tajiri, M., Miyagishi, M., Taira, K., Wada, Y., Tanizawa, Y. (2006). Myosin motor Myo 1 c and its receptor NEMO/IKK γ promote TNF- α -induce serine³⁰⁷ phosphorylation of IRS-1. *J. Cell Biology*. 173: 665-671.
- Naovi, S.A. H., Khan, M.S. Y., Vohora, S.B. 1991. Antibacterial, anti-fungal and anthelmintic investigations on Indian medicinal plants. *Phytoteraphy*. 62: 221-228.
- Nasr, C. B., Ayed, N., Metche, M. (1996). Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. *Z Lebensm Unters Forsch*. 203: 374-378.
- Nawwar MA, Hussein SA, Merfort I. (1994). NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry*. 36:793-798.
- Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., Jena, B. S. (2003). *Food Chemistry*. 80:393-397.
- Neuhofer, H., Witte, L., Gorunovic, M., Czygan, F. C. (1993). Alkaloids in the bark of *Punica granatum* L. (pomegranate) from Yugoslavia. *Pharmazie*;48:389-391.
- Nicholls, P., Fita, I., Loewen, P. C. (2001). Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*. 51: 51-106.
- Niles, J. C., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. (2006). Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanism of product formation. *Nitric Oxide*. 14:109-121.

Noda, Y., Kaneyuka, T., Mori, A., Packer, L. (2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 166-171.

NOM-015-SSA2-2010. Norma oficial mexicana para la prevención, tratamiento y control de la diabetes.

NOM-062-ZOO-1999. (1999). Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.

NOM-086-SSA1-1994. (1994). Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.

NOM-092-SSA1-1994. (1994). Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

NOM-110-SSA1-1994. (1994). Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-111-SSA1-1994. (1994). Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

NOM-113-SSA1-1994. (1994). Bienes y Servicios. Métodos para la Cuenta de microorganismos coliformes Totales en Placa.

NOM-114-SSA1-1994. (1994). Bienes y Servicios. Método para la Determinación de Salmonella en Alimentos.

NOM-115-SSA1-1994. (1994). Bienes y Servicios. Método para la Determinación de Staphylococcus aureus en Alimentos.

NOM-130-SSA1-1995. (1995). Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

Ogata, T., Moyauchi, T., Sakai, S., Irukayama-Tomobe, T., Goto, K., Yamaguchi, I. (2002). Stimulation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha [PPAR α] attenuates cardiac fibrosis and endothelin production in pressure-overload rat hearts. *Clinical Science (London, England)*. 103: 284S-288S.

Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S., Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruits peels. *Food Chemistry*. 103: 839-846.

Osuna, T., Tapia, P. M. E., Aguilar, C. A. (2005). In *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar las afecciones gastrointestinales*, 1th. Editorial Universitat de Barcelona. España. ISBN 84-475-2986-X.

Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Özdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H., Hotamisligil G. S. (2004). Endoplasmic reticulum stress link obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Sciences*. 306: 457-461.

Pacheco-Palencia, L. A., Talcott, S. T. (2010). Chemical stability of açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems. *Food Chemistry*. 118: 17-25.

Pacher, P., Beckman, S., Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*. 87: 315-424.

- Pacher, P., Szabó C. (2006). Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Current Opinion in Pharmacology*. 6: 136-141.
- Pannala, A. S., Rice-Evans, C. A., Halliwell, B., Singh, S. (1997). Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 232:164-168.
- Parmar, H. S., Kar, A. (2007). Antidiabetical potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan treated male mice. *BioFactors*. 31: 17-24.
- Patel, C., Dadhaniya, P., Hingorani, L., Soni, M. G. (2008). Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 2728-2735.
- Polewski, K., Kniant, S., Slawinska, D. (2002). Gallic acid, a natural antioxidant in aqueous and micellar environmental: spectroscopic studies. *Current topics and Biophysics*. 26: 217-222.
- Poyrazoglu, E., Goekmen, V., Artik, N. (2002). Organic acid and phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*. 15: 567-575.
- Purseglove, J.W. 1981. *Tropical Crops-Dicotyledons*. The English Language Book Society and Longman, London.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology y Medicine*. 26: 1231-1237.

- Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., Ferreira, D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica*. 73: 461-467.
- Righetto, A. M., Netto, F. M. (2006). Vitamin C stability in encapsulated green West Indian cherry juice and on encapsulated synthetic ascorbic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 1202-1208.
- Roberts, C. K., Sindhu, K. K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*. 84: 705-712.
- Robertson, P. R., Harmon, J., Tran, O. P., Poitout, V. (2004). β -cell glucose toxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*. 53: S119-124.
- Robertson, P. R., Harmon, J., Tran, O. P., Tanaka, Y., Takahashi, H. (2003). Glucose toxicity in β -cells: type 2 Diabetes, good radicals gone bad, end the glutathione connection. *Diabetes*. 52: 581-587.
- Robledo, A., Aguilera-Carbo, A., Rodríguez, R., Martínez, J. L., Garza, Y., Aguilar C.N. (2008). Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 507-513.
- Rosado-Pérez, J., Mendoza-Nuñez, V. M. (2007). Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*. 32: 58-69.
- Rosenblat, M., Hayek, T., Aviram, M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetics on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*. 187, 363-371.

- Sánchez-Lamar, A., Fonseca, G., Fuentes, J. L., Cozzi, R., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Perticone, P., Degrassi, F., De Salvia, R. (2008) Assesment, of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruits extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 115: 416-422.
- Sastravaha, G., Gassmann, G., Sangtherapitikul, P., Grimm, W. D. (2005) Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts in supportive periodontal therapy. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 7: 70-79.
- Satoh, H., Tsukamoto, K., Hashimoto Y., Hashimoto, N., Togo, M., Hara, M., Maekawa, H., Isoo, N., Kimura, S., Watanabe, T. (1999). Thiazolidinediones suppress endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: a new possible role of PPAR γ on vascular endothelial function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254: 757-763.
- Satomi, H., Umemura, K., Uneno, A., Hatano, T., Okuda, T., Noro, T. (1993). Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 16, 787-790.
- Saxena, A., Vikram, N.K. (2004). Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 10: 369-378.
- Schaffer, J. E. (2003). Lipotoxicity: when tissue overeats. *Current Opinion in Lipidology*. 14:281-287.

- Schmitz-Peiffer, C. (2002). Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 967: 146-147.
- Schubert, S. Y., Lansky, E. P., Newman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Ethnopharmacology*. 66: 11-17.
- Schubert, S. Y., Neeman, I., Resnick, N. (2002). A novel mechanism for the inhibition of NFkB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants. *The FASEB Journal*. 16: 1931-1933.
- Seeram, N. P., Henning, S. M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., Heber, D. (2006). Pomegranate juice ellagitannins metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *Journal of Nutrition*. 136: 2481-2485.
- Seppi Ak Franciosi, A. (1980). Chemical composition of pomegranate juice (*Punica granatum*): amino acid contents. *La Revista della Societa Italiana de Scienza dell'Alimentazione*. 9: 211-212.
- Settheetham, W., Ishida T. (1995). Study and genotoxic effect of antidiarrheal medicinal herbs on human cell in vitro. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicin and Public Health*. 26: 306-310.
- Shao, D. L., Rangwala, S. M., Bailey, S. T., Krakow, S. L., Reginato, M. J., Lazar, M. (1998). Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR- γ . *Nature*. 396: 377-380.

- Sharaf, A., Fayez, M. B. E., Negm S. A. R. (1967). Pharmacological properties of *Punica granatum* L. Plant Food for Human Nutrition. 14: 331-336.
- Shukla, M., Gupta, K., Rasheed, Z., Khan, K. A., Haqqi, T. M. (2008). Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica granatum* L) preferentially inhibit COX2 activity *ex vivo* and IL-1B induced PGE2 production in human chondrocytes *in vitro*. Journal of Inflammation. 13: 5- 9.
- SIAP (2008). Página del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Publicaciones y Descargas, Monografías. Página Web <http://www.siap.gob.mx>. (Acceso en Febrero 2008).
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology. 82: 291-295.
- Sigaudou-Roussel, D., Fromy, B., Saumet, J. L. (2008). *In vivo* vasodilating mechanism: who's NOS involved?. Journal of Physiology. 586: 689-690.
- SINAIS, Sistema Nacional de Información en Salud, Gobierno de México. (2010). Diez Principales de Mortalidad en Hombres y Mujeres. Página Web. <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>. (Acceso en Enero, 2010).
- Singh, R. P., Murthy, K. N. C., Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 81-86.
- Soni, L. K., Gupta, A. K., Kaskhedikar, S. G. (2008). QSAR study of 5-arylidine-2,4-thiazolidinediones as aldose reductase inhibitors. Medicinal Chemistry Research. 17: 258-266.

- Souza, J. M., Radi, R. (1998). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxyxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 360: 187-194.
- Spáčil, Z., Nováková, L., Solich, P. (2008). Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta*. 76: 189-199.
- Spitaler, M. M., Graier, W. F. (2002). Vascular targets of redox signaling in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 45: 476-494.
- Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B., & Jamróz, M. (2008). Antioxidant properties of extracts from fermented and cooked seed of Polish cultivars of *Lathyrus sativus*. *Food Chemistry*. 109: 285-292.
- Steals, B., Fruchart, J. C. (2005). Therapeutic role of peroxisome proliferator-activated receptor against. *Diabetes*. 54: 2460-2470.
- Stuart, A. R., Gulve, E. A., Wang, M. (2004). Chemistry and Biochemistry of type 2 diabetes. *Chemical Reviews*. 104: 1255-1282.
- Sung, C. K., She, H., Xiong, S., Tsukamoto, H. (2004). Tumor necrosis factor-inhibits peroxisome proliferator-activated receptor activity at a posttranscriptional level in hepatic stellate cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 286: G722-G729.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action on β cells of the rat pancreas. *Physiology Research*. 50: 536-546.
- Takamura, T., Ando, H., Nagai, Y., Yamashita, H., Nohara, E., Kobayashi, K. (1999). Pioglitazone prevents mice from multiple low-dose streptozotocin-

- induced insulinitis and diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 44: 107-114.
- Tanaka, T., Nonaka, G. I., Nishioka, I. (1985). Tannins and related compounds. C. Reaction of dehydrohexahydroxydiphenic acid esters with bases, and its application to the structure determination of pomegranate tannins, granatins a and b. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 38: 9424-9428.
- Tannous, M., Rabini, R. A., Vignini, A., Moretti, N., Fumelli, B., Zielinski, B., Mazzanti, L., Muttus, B. (1999). Evidence for iNOS-dependent peroxynitrite production in diabetic platelets. *Diabetologia*. 42: 539-544.
- Tesch, G., Allen, T. J. (2007). Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology*. 12: 261-266.
- Tiwari, A. K., Madhusudana, R. J. (2002). Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: present status and future prospects. *Current Science*. 83:30-38.
- Tonon, R. V., Brabet, C., Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*. 43: 907-914.
- Tripathi, S. M., Singh, D. K. (2000). Molluscicidal activity of *Punica granatum* bark and *Canna indica* root. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*. 33: 1351-1355.
- Tsuyuki, H., Ito, S., Nakatsukasa, Y. (1981). Lipids in pomegranate seeds. *Nihon Daigaku No-Juigakubu Gakujutsu Kenkyu Hokoku*. 38: 141-148.

- Türk, G., Sönmez, M., Aydın, M., Yüce, A., Gür, S., Yüksel, M., Aksu, E. H. Aksoy, H. (2008). Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity, and testosterone level in
- Uchida, K. (2000). Role de active aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and medicine*. 28: 1685: 1696.
- Ueda, H., Kuroiwa, E., Tachibana, Y., Kawanishi, K., Ayala, F., Moriyasu, M. (2004). Aldose reductase inhibitors from the leaves of *Myrciaria dubia* (H. B. & K.) Mc Vaugh. *Phytomedicine*. 11: 652-656.
- Urbina-Bonilla, A. P. (2008). Nuevo papel de los radicales libres de oxígeno en el ejercicio: ¿otra paradoja? *Colombia Médica*. 39: 266-275.
- Van Elswijk, D. A., Schobel, U. P., Lansky, E. P., van der Greef, J. (2004). Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*. 65: 233-241.
- Vasconcelos, L. C., Sampaio, M.C., Sampaio, F. C., Higino, J. S. (2003). Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses*. 46:192-196.
- Velioglu, S., Unal, C., Cemeroglu, B. (1997). Chemical characterization of pomegranate juice. *Fruit Processing*. 8: 307-310.
- Ventura, J., Belamres, R., Aguilera-Carbo, A., Gutierrez-Sanchez, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C. N. (2008). Fungal biodegradation of tannins from Creosote bush (*Larrea tridentata*) and tar bush (*Flourensia cernua*) for gallic

- and ellagic acid production. *Food Technology and Biotechnology*. 46: 213-217.
- Ventura-Sobrevilla, J., Boone-Villa, V. D., Aguilar, C. N., Román-Ramos, R., Vega-Águila, E., Campos-Sepúlveda, E., Alarcón-Aguilar, F. (2011). Effect of varying dose administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 54: 5-9.
- Vidal, A., Fallarejo, A., Peña, B. R., Medina, M. E., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y., Vuorela, P. M. (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 89: 295-300.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 9: 635-654.
- Vlasits, J., Jakopitsch, C., Bernroither, M., Zamocky, M., Furtmüller, P. G. (2010). Mechanis of catalase activity of heme peroxidases. *Archives of biochemistry and biophysics*. 500: 74-81.
- Wang, R. F., Xie, W. D., Zhang, Z., Xing, D. M., Wang, W., Ma, C., Du, L. J. (2004). Bioactive compounds from the seed of *Punica granatum* (Pomegranate). *Journal of Natural Products*. 67: 2096-2098.
- Wellen, K. E., Hotamisligil, G. S. (2005). Inflammation, stress and diabetes. *Clinical Investigation*. 115: 1111-1119.
- Werman, A., Hollenberg, A., Solanes, G., Bjørnbæk, C., Vidal-Puig, A. J., Flier, J. S. (1997). Ligand independent activation domain in the N terminus of

- peroxisome-proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) - differential activity of PPAR γ -1 and -2 isoforms and influence of insulin. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 20230-20235.
- WHO. (2010). World Health Organization. Health topics/Medicine tradicional. Página Web <http://www.who.int>. (Acceso en Enero, 2010).
- WHO. (2011). World Health Organization. Health topics/Diabetes. Página Web <http://www.who.int>. (Acceso en Diciembre, 2011).
- Wolfson, E.R. 1988. *The Book of the Pomegranate: Moses de Leon's Sefer Ha-Rimmon*. Scholar's Press, Atlanta, GA.
- Xie, Y., Morikawa, T., Ninomiya, K., Imura, K., Muraoka, O., Yuan, D., Yoshikawa, M. (2008). Medicinal flowers. XXIII. New taraxastane-type triterpene, punicanolic acid, with tumor necrosis factor- α inhibitory activity from the flowers of *Punica granatum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 56: 1628-1631.
- Yamasaki, M., Kitagawa, T., Koyanagi, N., Chujo, H., Maeda, H., Kohno-Murase, J., Imamura, J., Tachibana, H., Yamada, K. (2006). Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. *Nutrition*. 22: 54-59.
- Ye, J., Doyle, P., Iglesias, M., Watson, D., Cooney, G., Kraegen, E. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor α activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats. *Diabetes*. 50: 411-417.
- Yokozawa, T., Kim, H. Y., Cho, E. J., Choi, J. S., Chung, H. Y. (2002). Antioxidant effects of isorhamnetin 3,7-Di-O- β -D-glucopyranoside isolated from mustard

- leaf (*Brassica juncea*) in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Agric. Food Chem.* 50:5490-5495.
- Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J. K., Cushman, S. M., Cooney, G. J., Atcheson, B., White, M. F., Kraegen, E. W., Shulman, G. I. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *Biological Chemistry.* 277: 50230-50236.
- Yudkin, J. S., Stehouwer, C. D., Emeis, J. J., Coppack, S. W. (1999). C-reactive protein in healthy subjects: association with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 19: 972-978.
- Zhou, B. H., Liu, C., Wu, Y., Wu, Z. H., Li, X. J., Zhang, J. (2006). Protective effect of *Punica granatum* L. against of liver microsomal lipid peroxidation. *Chinese Pharmaceutical Journal.* 41: 1864-1865.

11. Perspectivas

Estudiar el efecto del extracto y jalea sobre otro modelo de diabetes, como los genéticamente modificados o inducidos por dieta alta en azúcares o grasas.

Determinar el posible mecanismo de acción por el cual el extracto disminuye la glucosa en sangre y reduce el estrés oxidante en los animales.

Analizar la acción del extracto y jalea en modelos *in vitro*.

Identificar y aislar el o los compuestos en el extracto y jalea responsables de los efectos biológicos positivos.

Effect of Varying Dose and Administration of Streptozotocin on Blood Sugar in Male CD1 Mice

Ventura-Sobrevilla, J.¹, Boone-Villa, V.D.³, Aguilar, C.N.³, Román-Ramos, R.², Vega-Ávila, E.², Campos-Sepúlveda, E.⁴ and Alarcón-Aguilar, F.*²

¹ Posgrado en Biología Experimental, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México; ² Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México; ³ Departamento de Investigación en Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México; ⁴ Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.
*E-mail: aaasj2@prodigy.net.mx.

Received May 25, accepted July 28, 2011

Abstract

Streptozotocin (STZ) is used to induce experimental diabetes in rodents. There is however, controversy as to whether STZ induced diabetes models type 1 or 2 diabetes. We show that the grade of STZ-induced hyperglycemia in male CD1 mice is dependent on STZ dose. A single injection of high dose (130 or 150 mg/Kg body weight) or multiple injections (2, 3, 4 or 5) of low dose (40 mg/Kg body weight) STZ was administered intraperitoneally in non-fasted mice. Blood glucose and body weight were measured over 21 days for high dose and 21 and 28 days for low dose administration. On day three, high dose treatment produced hyperglycemia and body weight loss in comparison to mice without STZ, however unstable hyperglycemias and several deaths were observed during treatment. Hyperglycemia and body weight loss were seen with three or more injections of STZ at 21 days, whereas 4 and 5 injections produced severe hyperglycemia but not death. Mild hyperglycemia (250-450 mg/dL) was seen after 28 days following three injections of STZ. Therefore we concluded that a high dose STZ produces severe hyperglycemia in mice similar to a type 1 diabetic, and three successive administrations of STZ induces mild hyperglycemia in mice similar to type 2 diabetics.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion or action or both, that affects carbohydrate, lipid, protein and nucleic acid metabolism [1]. The world prevalence of DM exceeds 220 million people and is rapidly increasing [2]. In Mexico, DM is considered a major health problem. Ninety percent of diabetic patients have DM type 2.

Hyperglycemia associated with DM is characterized by hypertension, oxidative stress, chronic inflammation and diseases associated with abnormal lipid profiles such as cardiovascular diseases. DM can be studied in animal models of the disease, although these animals do not present a complete picture of DM in humans. These experimental models are useful for biochemical or anatomical studies that target the effects of hyperglycemia on diabetic complications including neuropathy, nephropathy and cardiovascular diseases.

It is important to consider certain criteria in selecting an animal model of diabetes: (i) there must be a reliable method for establishing a consistent level of diabetes (*e.g.*, hyperglycemia); (ii) to be able to maintain a steady level of diabetic change for the duration of the experiment; (iii) to understand the disease characteristic and progression of injury in the

rodent strain being employed; and (iv) achievement of a pathological state which has clinical relevance [3]. The common diabetic rodent models are genetically engineered, or created by changes in diet or use of chemical agents. The most used substances to induce diabetes in rodents are alloxan and streptozotocin (STZ). STZ (2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea)-1-D-glucopyranose) is a broad-spectrum antibiotic which is produced by *Streptomyces achromogenes* (Fig. 1). The diabetogenic effect of STZ was first reported in 1963 by Rakietyen *et al.* [4] after injection of a single intravenous dose in rats and dogs.

STZ has a structure similar to glucose (Glu) and N-acetyl glucosamine (GlcNAc) (Fig. 1). STZ is taken up by pancreatic β -cells via the GLUT 2 transporter where it causes β -cell death by DNA fragmentation due to the nitrosourea moiety. Three major pathways associated with cell death are: (i) methylation of DNA by the formation of carbonium ion (CH_3^+) resulting in the activation of the nuclear enzyme poly ADP-ribose synthetase as part of the cell repair mechanism and therefore NAD^+ depletion; (ii) free radical generation as hydrogen peroxide and (iii) nitric oxide production [3,5].

Use of STZ to induce diabetes mellitus type 1 versus type 2 has been controversial. The aim of the present study was to evaluate the effect of several doses of STZ on the grade of hyperglycemia in non-fasted male CD1 mice.

Material and Methods

CD1 albino male mice (Charles River) 6-8 weeks old were supplied from Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I) vivarium and housed in polypropylene cages containing sterile sawdust as bedding. Animals were maintained under controlled temperature (23 ± 2 °C), humidity (40-70 %) and a 12 h light-dark cycle. Water and food pellets (Harlan® Rodent diet) were provided *ad libitum*. The animal experimental protocol was approved by the the Mexican standard NOM-062-ZOO-1999 [6].

Induction of diabetes: STZ, citric acid and sodium citrate analytical grade were purchase from Sigma-Aldrich, Mexico. STZ was dissolved in citrate buffer 100 mM, pH 4.5 and injected intraperitoneally within 15 min in non-fasted mice, each mouse received 0.1 mL of STZ solution per 10 g of body weight. We employed two protocols for induction of diabetes, multiple low doses of STZ (MLDS) or one high dose of STZ (OHDS). For MLDS, 40 mg of STZ/Kg body weight was injected for 2, 3, 4 and 5 consecutive days and for OHDS, 130 or 150 mg of STZ/Kg body weight were administrated while the control group received citrate buffer alone. Blood glucose was determined using an Accu-Chek® system (Roche), and body weights were taken each 3 days during 21 days for OHDS and for MLDS at 21 and 28 days. Mice were considered to be diabetic when their non-fasted blood glucose levels were ≥ 200 mg/dL.

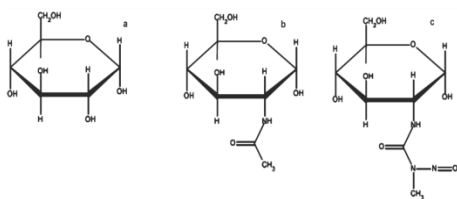


Figure 1. Chemical structures of (a) glucose, (b) N-acetyl glucosamine and (c) streptozotocin.

Biochemical parameters: Mild hyperglycemia (250-450 mg/dL) was reached after 28 days with 3 injections of STZ. Blood samples from this group were collected by orbital puncture in anesthetized animals using capillary tubes containing disodium EDTA (anti-coagulant). Glycated hemoglobin (HbA1c) was determined with a kit (DCA 2000 Analyzer®, Bayer) and triglycerides (TG), cholesterol (CHOL), high density lipoproteins (HDL), glutamate-oxalacetate transaminase (GOT or AST), glutamate-pyruvate transaminase (GPT or ALT) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) were determined using a Reflotron® system (Roche).

Table I. Effect of OHDS and MLDS on the DM frequency and mortality in mice

N	STZ (mg/Kg)	Diabetes Freq.		HypoG	Mort.	HyperG
Non diabetic						
		7d	21d			
6	0	0/6	0/6	0 %	0 %	
OHDS						
		7d	21d			
6	130	6/6	5/5	50%	16%	1/5 (21d)
6	150	5/5	3/3	0 %	50%	3/3 (21d)
MLDS						
		21d	28d			
6	(2)40	0/6	0/6	0%	0%	
6	(3)40	5/6	5/6	0%	0%	
6	(4)40	5/6	5/6	0%	0%	1/6 (28d)
6	(5)40	6/6	6/6	0 %	0 %	2/6 (21d); 4/6 (28d)

Abbreviations:

N, number of mice; HypoG, prevalence of hypoglycemia; Mort., mortality at 21 days; HyperG., hyperglycemia ≥ 600 mg/dL; OHDS, one high dose of STZ; MLDS, multiple low doses of STZ; d, Day

Table II. Effect of three administration of STZ (40 mg/Kg) in non-fasted male mice.

Parameter	Non-diabetic		Diabetic	
CHOL (mg/dL)	166.67	± 6.94	143.33	$\pm 4.70^*$
TG (mg/dL)	167.80	± 3.18	151.18	± 12.69
HDL (mg/dL)	87.85	± 3.84	86.43	± 3.56
GGT (U/L)	<2.28		<2.28	
GOT (U/L)	42.80	± 8.17	47.20	± 11.46
GPT (U/L)	67.53	± 21.22	39.80	± 4.08
Hb1Ac (%)	3.87	± 0.15	5.03	$\pm 0.18^{**}$

Values are the mean \pm SEM, n=5.

$p^* < 0.05$ and $p^{**} < 0.01$ compared to non-diabetic group by Student's test.

Results and Discussion

Effect of OHDS and MLDS on the frequency of diabetic changes and mortality in mice: Effect of OHDS and MLDS of STZ on diabetes frequency and mortality are represented in Table I. The prevalence of diabetes was earlier in OHDS than MLDS. At day 7, 100 % of mice developed diabetes with the OHDS model, whereas three or more injections of STZ were required to develop diabetes in the multiple-dose animals. At day 21, 83 % of mice were diabetic with 3 and 4 injections of STZ; 100 % were diabetic after 5 administrations and

no diabetogenic effect was seen after two injections. In contrast to MLDS, mortality was observed in OHDS treatment; with 130 mg/Kg of STZ, 1 of 6 mice died.

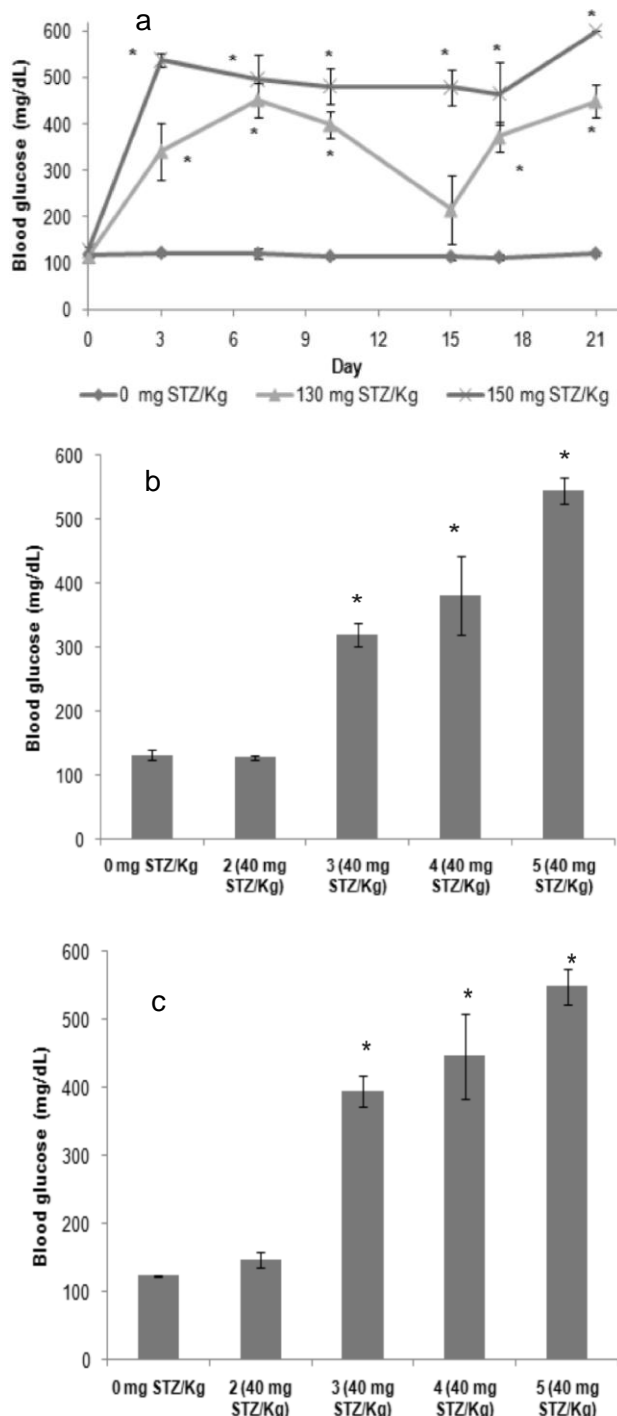


Figure 2. Effect of (a) OHDS at 21 days and MLDS at (b) 21 and (c) 28 days on blood glucose in non-fasted male mice. Values are the mean \pm SEM, n=5. $p^* < 0.05$ compared to non-diabetic control. ANOVA followed of Tukey's test.

When the dose was increased to 150 mg/Kg of STZ on day 7, one mouse died and at day 21, 50% of mice

were dead. Severe hyperglycemia (≥ 600 mg/dL) was detected in both models and these concentrations were dependent on the dose. Hypoglycemia was seen only in the OHDS model.

Effect of OHDS and MLDS on non-fasted blood glucose: The changes in non-fasted blood glucose in male CD1 mice for our two models are given in figure 2. Marked hyperglycemia occurred in OHDS mice three days after the injections of STZ compared with the group without STZ ($*p < 0.05$). For animals receiving 130 mg/Kg the non-fasted blood glucose levels were decreasing at day 15 and 3 mice in this group developed hypoglycemia. MLDS-diabetic-prone mice injected intraperitoneally with 3, 4 and 5 daily STZ injections (40 mg/Kg) developed hyperglycemia after 21 days following the first administration in comparison with the control group ($*p < 0.05$). Mild non-fasted hyperglycemias (250-450 mg/dL) were found in 3 mice (40 mg/Kg). The hyperglycemias measured at 28 days were higher than 21 days, however, this increase was not significant.

Effect of OHDS and MLDS on non-fasted body weight; The initial body weights of the mice were similar in non-diabetic as well as OHDS and MLDS groups. After 3 days of the administration of STZ, there was a significant reduction ($*p < 0.05$) in body weight in OHDS groups (130 and 150 mg/Kg) compared to non-diabetic animals as a characteristic feature of diabetic status. This body weight reduction remained during the study period. Multiple administrations of a low dose of STZ did not produce weight loss (Fig. 3).

Effects of 3 administrations of STZ (40 mg/Kg) on biochemical parameters in mice: We studied the effect of 3 administrations of STZ (40 mg/Kg) on biochemical parameters in mice because this group had mild hyperglycemias on day 28 after administration of STZ. The blood CHOL levels in the diabetic group were significantly lower than non-diabetic controls ($*p < 0.05$). However, STZ did not produce any significant change in TG, HDL, GGT, GOT and GPT. HbA1c was increased 30% ($*p < 0.01$) in diabetic compared to non-diabetic animals (Table II).

DM is increasing at an alarming rate worldwide and is attributed to a sedentary life style and calorie rich diet. DM is often linked with abnormal lipid metabolism and it is considered a major risk factor to development of atherosclerosis and cardiovascular disease [7].

The American Diabetes Association (ADA) has established an etiologic classification of DM [1], they had proposed four groups: 1) Type 1 (5-10 %); 2) Type

2 (90-95 %); 3) Other specific types and 4) Gestational. In this sense, STZ-induced diabetes belongs to subcategory "Drug or chemical induced", in other specific type category. However, many researchers conclude that STZ produces a DM1. The type of diabetes induced by STZ is controversial because STZ-hyperglycemia can be similar to DM1 or DM2 [5,8,9].

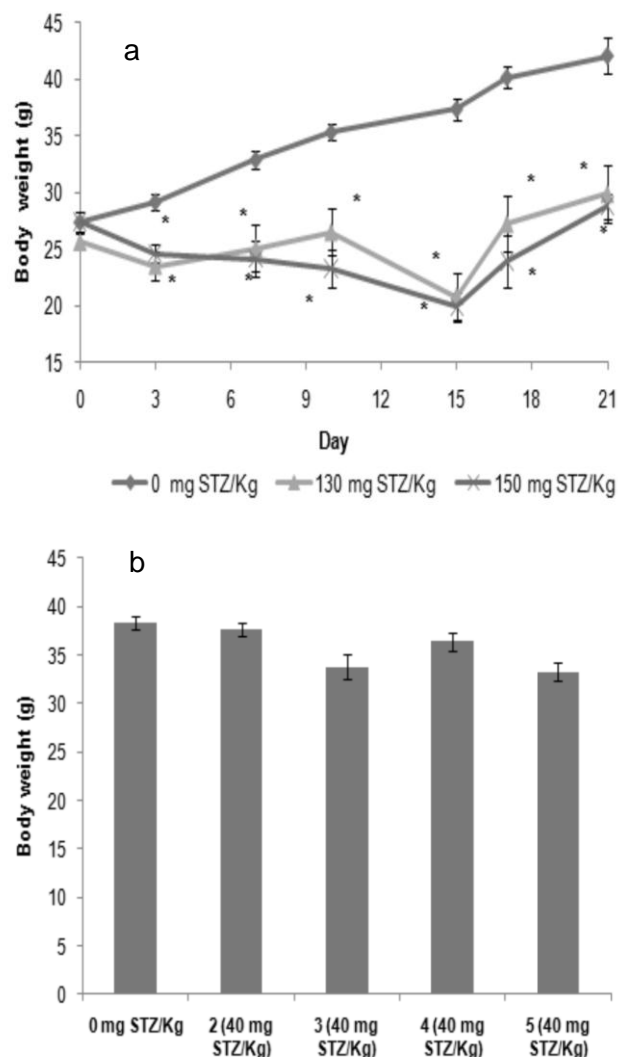


Figure 3. Effect of (a) OHDS and (b) MLDS at 21 days on body weight in non-fasted male mice. Values are the mean \pm SEM, $n=5$. $p^* < 0.05$ compared to non-diabetic control. ANOVA followed of Tukey's test.

STZ is a toxic glucose (Glu) and N-acetyl glucosamine (GlcNAc) analogue that is accumulated preferentially in pancreatic β -cells via GLUT 2 transporter uptake. A High dose and multiple low doses of STZ are used for development of diabetes in rodents. However, the severity of damage is dependent of different factors including: (i) the dose and number of STZ

administration, (ii) animal species, (iii) strain and (iv) age. Gurley [10] has identified an order of mouse strain susceptibility to diabetes induced by MLDS (DBA/2 > C57BL/6 > MRL/MP > 129/SvEv > BALB/c).

This way, OHDS and four or more MLDS injections produced hyperglycemias similar to type 1 diabetes and three administrations of MLDS generated mild hyperglycemia (250-450 mg/dL), that is similar to type 2 diabetes. Although severe non-fasted hyperglycemias (>600 mg/dL) were produced in both models, only OHDS caused a marked loss of weight by the third day after STZ injection. Symptoms of marked hyperglycemia include polyuria, polydipsia, weight loss and polyphagia. STZ treatment can generate diabetic mice with these symptoms.

The toxic effects of STZ are not restricted to pancreatic β -cells. STZ also causes renal, cardiac and adipose tissue damage and increases oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction [11]. We selected the group that received three injections of STZ (40 mg/Kg) to analyze some biochemical parameters related with diabetes and toxicity.

The effects of STZ on glucose and HbA1c reflect the toxin-induced abnormalities in β -cell function resulting in insulin deficiency [12]. Glycated hemoglobin is a marker of glucose control and provides an indirect assessment of the average blood glucose level over the previous month. In uncontrolled diabetic animals the glycosylation of proteins is increased. STZ selectively inhibits the activity of the glycoside hydrolase *O*-GlcNAcase in the β -cell, which is responsible for removing *O*-GlcNA from proteins. This causes irreversible *O*-glycosylation of intracellular proteins resulting in β -cell apoptosis [5,13 14].

GOT, GPT and GGT are considered markers of liver toxicity [15]. STZ can produce a change in these enzymes in the serum of diabetic rodents. It has been reported that the transaminases are increased in insulin deficiency; these changes can be associated with the increase of gluconeogenesis and ketogenesis during diabetes [16].

Diabetes mellitus often involves abnormal lipid metabolism which is a metabolic disorder contributing to diabetic complications [13]. Hyperglycemia produced a marked increase in serum TG and CHOL. Insulin activates the lipoprotein lipase which hydrolyzes TG. Insulin deficiency results in failure to activate these enzymes, thereby causing hypertriglyceridemia [17]. Although STZ causes liver toxicity

and lipid alteration, we did not find important changes in transaminases when mice were treated with 3 injections, it is possible that the STZ-induced damage in these diabetic animals was minor when the hyperglycemias are mild; the change in lipids and some organs such as heart and kidney can be observed 3 or 6 months after the development of diabetes [4].

Conclusion

This study suggests that the severity of hyperglycemias are directly associated with the doses of STZ administered. MLDS can induce sever and mild hyperglycemias similar to DM1 and DM2 respectively. More than 28 days is needed to develop diabetic complications when the hyperglycemias are mild (<450 mg/dL). However, further studies are necessary to evaluate the kind of metabolic, endocrine and morphologic alterations in pancreas, as well as the times in which these are manifest in diabetic animals treated with different doses of STZ.

References

1. ADA, American Diabetes Association. (2009) *Diabetes Care*. 32, S62-S67.
2. WHO, World Health Organization. (2010) [WWW page] URL <http://www.who.int>. Fact sheet N° 312
3. Tesch, G.H. and Allen T.J. (2007) *Nephrology*. 12, 261-266.
4. McNeill, J.H. (1999) *Experimental Model of Diabetes*. 1st Ed., CRC Press, Florida.
5. Szkudelski, T. (2001) *Physiol Res*. 50, 536-546.
6. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones y técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
7. Bansal, P., Piya, P., Mudgal, J., Pawan, G.N. and Steve, T.P. (2011) *Exp. Toxicol. Pathol.* In press.
8. Arias-Díaz, J. and Balibrea, J. (2007) *Nutr. Hosp.* 22, 160-168.
9. Boroujeni, N.B., Hashemi, S.M., Khaki, Z. and Soleimani, M. (2011) *Tissue and Cell*. 43, 75-82.
10. Gurley, S.B., Clare, S.E., Snow, K.P., Hu, A., Meyer, T.W. and Coffman, T.M. (2006) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290, F214-F222.
11. Valentovic, M.A., Alejandro, N., Betts, C.A., Brown, P.I. and Ramos, K. (2006). *Toxicol Lett*. 164, 214-220.
12. Strandell, E., Eizirik, D.L., Korsgren, O., and Sandler, S. (1998) *Mol. Cell Endocrinol.* 59, 83-91.
13. Krentz, A.J. (2003) *Diab. Obes. Metab.* 5, S19-S21.
14. Konrad, R.J., Mikolaenko, I., Tolar, J.F., Liu, K. and Kudlow, J.E. (2001) *Biochem. J.* 356, 31-41.
15. Mori, D.B., Baviera, A.M., Ramalho, L.T.D.O., Vendramini, R.C., Brunetti, I.L. and Pepato M.T. (2003) *Biotechnol. App. Biochem.* 38, 183-191.
16. Fleig, P., Marliss, E., Ohman, J. and Cahill, J.F. (1970) *Diabetes*. 19, 727-729
17. Shirwaikar, A., Rajendar, K. and Kumar, C.D. (2004) *J. Ethnopharmacol.* 91, 171-175.

