



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Efecto del consumo de un jugo de frutos rojos y uva rico en polifenoles procesado con ultrasonido en ratas Wistar con diabetes inducida

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias

Presenta:

L. N. Arturo Iván Esteves Mar

Director:

Dra. Rosa Isela Guzmán Gerónimo

Xalapa, Veracruz

Enero 2016



La presente tesis titulada

“Efecto del consumo de un jugo de frutos rojos y uva rico en polifenoles procesado con ultrasonido en ratas Wistar con diabetes inducida”.

Realizada por el

L. N. ARTURO IVAN ESTEVES MAR

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

Maestro en Ciencias Alimentarias

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 21 de enero de 2016.



Dr. Ebner Azuara Nieto



Dr. José Enrique Meza Alvarado



Dra. María del Socorro Herrera Meza

DEDICATORIAS

A la Divinidad, por todas las bendiciones recibidas y por ser la fuerza que me motiva a ser mejor cada día en todos los aspectos (LSPPGTA).

A mis padres, a quienes les agradezco todo lo que soy y lo que puedo llegar a ser.

A mis tíos, A. y J., por su apoyo incondicional.

A mi abuelo *El Profe*, de quien heredé el gusto por aprender más cada día.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Alimentarias.

Al Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Veracruzana por todas las facilidades prestadas.

A la Dra. Rosa Isela Guzmán Gerónimo, directora de tesis, por su orientación y apoyo durante la realización de este proyecto.

A la Dra. María del Socorro Herrera Meza y su equipo de trabajo, así como a la M. C. Isela Santiago por todo el apoyo brindado para llevar a cabo las pruebas biológicas.

A los revisores de tesis, Dr. Ebner Azuara Nieto, Dr. José Enrique Meza Alvarado y Dra. María del Socorro Herrera Meza por las observaciones realizadas.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Antioxidantes naturales	2
2.2 Polifenoles	3
2.3 Antocianinas	3
2.3.1 Estabilidad química de las antocianinas	5
2.4 Zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	8
2.5 Uva (<i>Vitis vinífera</i> L.)	10
2.6 Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i> D.)	11
2.7 Jugo de fruta	13
2.8 Ultrasonido	14
2.9 Diabetes Mellitus	19
2.9.1 Diagnóstico de la diabetes mellitus	19
2.9.2 Mecanismo de acción de la insulina	20
2.9.2.1 Insulina	20
2.9.2.2 Receptor de la Insulina (IR)	20
2.9.3 Vía de señalización de la insulina	22
2.9.4 Resistencia a la insulina	23
2.9.5 Antocianinas y diabetes	24
2.10 Inducción de diabetes mellitus tipo 2 en ratas	26
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1. Objetivo general	29
5.2. Objetivos específicos	29

6. MATERIAL Y MÉTODOS	30
6.1 Material	30
6.2 Metodología	30
6.2.1 Elaboración de jugos de zarzamora, uva y fresa	30
6.2.2 Pruebas sensoriales de la mezcla de jugos	31
6.2.3 Contenido de polifenoles totales y antocianinas totales en los jugos de zarzamora, uva y fresa y la mezcla seleccionada	32
6.2.4 Evaluación de polifenoles totales	32
6.2.5 Determinación de antocianinas monoméricas	33
6.2.6 Micrografía electrónica de barrido	34
6.2.7 Evaluación de la actividad biológica de la mezcla de jugos	35
6.2.7.1 Animales	35
6.2.7.2 Acondicionamiento	35
6.2.7.3 Modelo inducido experimentalmente	35
6.2.7.4 Elaboración de las croquetas modificadas	35
6.2.7.5 Administración de estreptozotocina	36
6.2.7.6 Administración de los jugos	37
6.2.7.7 Grupos de estudio y distribución de tratamientos	37
6.2.7.8 Toma de muestras de sangre a las ratas	38
6.2.7.9 Sacrificio de los animales y obtención de muestras sanguíneas finales	39
6.2.6.10 Extracción y peso de órganos	39
6.2.7 Análisis estadístico de los resultados	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
7.1 Evaluación sensorial	40
7.2 Determinación de polifenoles totales y antocianinas monoméricas en los jugos de zarzamora, uva y fresa	46
7.3 Determinación de polifenoles totales y antocianinas monoméricas en los jugos comerciales	49
7.4 Determinación de polifenoles totales y antocianinas monoméricas en la mezcla de jugos	51

7.5 Micrografía electrónica de barrido	53
7.6 Pruebas biológicas	56
7.6.1 Peso corporal	56
7.6.2 Inducción de diabetes mellitus tipo 2	57
7.6.3 Concentración plasmática de glucosa	59
7.6.4 Perfil de lípidos (triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL)	60
7.6.5 Peso de tejidos adiposo abdominal, epididimal y pericárdico	64
7.6.6 Peso de órganos	65
8. CONCLUSIONES	67
9. REFERENCIAS	69

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Clasificación de jugos (Codex Stan 247-2005)	13
Cuadro 2	Aplicación de ultrasonido en el proceso de elaboración de jugos ricos en antocianinas	18
Cuadro 3	Diseño de taguchi para la mezcla de los jugos de uva, zarzamora y fresa	31
Cuadro 4	Composición de la dieta modificada para la inducción de diabetes tipo 2	36
Cuadro 5	Concentraciones de polifenoles totales y de antocianinas monoméricas en la mezcla de jugos	51
Cuadro 6	Peso de tejidos adiposos abdominal, epididimal y pericárdico	64
Cuadro 7	Peso de corazón, riñones, hígado y páncreas	65
Cuadro 8	Peso de testículos, bazo, glándulas adrenales y pulmones	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	2-Fenilbenzopirilo	4
Figura 2	Antocianidinas más comunes en los alimentos	5
Figura 3	Planta de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	9
Figura 4	Racimo de uva (<i>Vitis vinífera</i> L.) de la especie de uva roja.	11
Figura 5	Planta de fresa (<i>Fragaria x ananassa</i> D.)	12
Figura 6	Fenómeno de cavitación	16
Figura 7	Receptor de la insulina	21
Figura 8	Vía de señalización de PI3K, relacionada con los efectos metabólicos	23
Figura 9	Mecanismo de toxicidad en células β inducida por estreptozotocina	27
Figura 10	Elaboración de jugo de zarzamora, uva y fresa	30
Figura 11	Interpretación de los 7 puntos de la escala hedónica de la evaluación sensorial.	32
Figura 12	Grupos de estudio y distribución de tratamientos	38
Figura 13	Resultados de aceptabilidad del color de las cuatro mezclas de jugos	41
Figura 14	Resultados de aceptabilidad del sabor de las cuatro mezclas de jugos	41
Figura 15	Resultados de aceptabilidad de la textura de las cuatro mezclas de jugos	42
Figura 16	Resultados de aceptabilidad del dulzor de las cuatro mezclas de jugos	43
Figura 17	Resultados de aceptabilidad general de las cuatro mezclas de jugos	43
Figura 18	Características deseables en los jugos en general	44
Figura 19	Contenido de polifenoles totales en los jugos de zarzamora, uva y fresa con y sin tratamiento con ultrasonido	46
Figura 20	Contenido de antocianinas monoméricas en los jugos de	48

	zarzamora, uva y fresa con y sin tratamiento con ultrasonido	
	Contenido de polifenoles totales en los jugos comerciales de	
Figura 21	manzana con extractos de arándano, granada, frutos mixtos y mezcla de arándano y uva.	49
	Contenido de antocianinas monoméricas en los jugos comerciales	
Figura 22	de manzana con extractos de arándano, granada, frutos mixtos y mezcla de arándano y uva.	50
	Contenido de polifenoles totales en la mezcla de jugos comparado	
Figura 23	con los jugos comerciales.	52
	Contenido de antocianinas monoméricas en la mezcla de jugos	
Figura 24	comparado con los jugos comerciales	52
	Micrografía electrónica de barrido de la zarzamora sin tratamiento	
Figura 25A	con ultrasonido	54
	Micrografía electrónica de barrido de la zarzamora con tratamiento	
Figura 25B	con ultrasonido	54
	Micrografía electrónica de barrido de la uva sin tratamiento con	
Figura 26A	ultrasonido	54
	Micrografía electrónica de barrido de la uva con tratamiento con	
Figura 26B	ultrasonido	54
	Micrografía electrónica de barrido de la fresa sin tratamiento con	
Figura 27A	ultrasonido	55
	Micrografía electrónica de barrido de la fresa con tratamiento con	
Figura 27B	ultrasonido	55
	Micrografías electrónicas de barrido de fresa y uva tratadas con	
Figura 28	ultrasonido mostrando microperforaciones en capas internas de las muestras.	56
	Registro del peso corporal de las ratas en el periodo de	
Figura 29	experimentación	56
Figura 30	Inducción de diabetes mellitus en ratas Wistar	56
Figura 31	Niveles de glucosa plasmática	57
Figura 32	Niveles de triglicéridos	59

Figura 33	Niveles de colesterol total	60
Figura 34	Niveles de colesterol HDL	61
Figura 35	Niveles de colesterol LDL	62
Figura 36	Comparación entre un hígado de rata sano y uno graso	63
Figura 37	Comparación entre un páncreas de rata sano y diabético	67

RESUMEN

En la actualidad, los consumidores tienen un interés particular en las bebidas que proporcionan compuestos bioactivos con efectos benéficos para la salud, tales como las antocianinas, además de suministrar otros nutrimentos. Estos compuestos se encuentran en altas concentraciones en los frutos rojos, que se utilizan en la producción de bebidas como jugos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un jugo de una mezcla de frutos rojos procesado con ultrasonido en ratas diabéticas. Para preparar este producto se utilizaron zarzamora, uva y fresa, las cuales fueron procesadas con ultrasonido y luego el jugo se obtuvo por centrifugación. Se realizó una evaluación sensorial para seleccionar la mezcla de jugo. Posteriormente, se les administró por vía oral a ratas Wistar con diabetes inducida a través del empleo de una dieta alta en grasa y carbohidratos y la administración de una dosis baja de estreptozotocina. La dosis de jugo suministrada a cada animal de jugo de mezcla de frutos rojos fue equivalente a dos vasos diarios (500 ml) durante 28 días. Este proporcionó entre el 63% y el 87% de la recomendación diaria de polifenoles y antocianinas respectivamente. El jugo redujo el peso corporal, mientras que en los resultados de la medición de glucosa, triglicéridos y los niveles de colesterol no mostró un incremento en ratas diabéticas. Este estudio mostró la aplicación potencial del jugo de frutos rojos para su consumo en pacientes diabéticos.

Palabras clave: frutos rojos, mezcla de jugos, ultrasonido, antocianinas, ratas diabéticas

ABSTRACT

Nowadays consumers have a particular interest in beverages that provide bioactive compounds with healthful effects, such as anthocyanins, besides supplying other nutrients. These compounds are found in high concentrations in berries, which are used in the production of beverages such as juices. The aim of this research was to evaluate the effect of mixed berry juice processed with ultrasound in diabetic rats. To prepare mixed berry juice, blackberry, grape and strawberry were processed with ultrasound, the juice was obtained by centrifugation. A sensory evaluation was employed to select the mixed juice. Then, Wistar rats were induced with diabetes using high fat-high carbohydrate diet and administration of low-dose of streptozotocin. An oral dose of mixed juice equivalent to two glasses (500 mL) were administrated by 28 days. This oral dose supplies 63 % and 87 % of the daily polyphenols and anthocyanins recommendation. The administration of mixed juice reduced the body weight, and the glucose, triglycerides and cholesterol levels did not show an increment on diabetic rats. This study showed the potential application of mixed juice on the daily intake on diabetic patients.

Key words: berries, mixed juice, ultrasounds, anthocyanins, diabetic rats

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades crónico-degenerativas son un grave problema de salud pública. Uno de estos padecimientos es la diabetes mellitus tipo 2, la cual presenta una alta prevalencia a nivel mundial y es causa de un gran número de incapacidades. Dicha enfermedad tiene entre sus principales causas los malos hábitos de alimentación, principalmente el alto consumo de alimentos procesados ricos en carbohidratos y grasas saturadas y un bajo consumo de vegetales y frutas. La ingesta de estos últimos alimentos se ha asociado con un descenso en el riesgo de contraer enfermedades crónico-degenerativas, entre ellas la diabetes mellitus, atribuyendo este efecto protector a la presencia de compuestos bioactivos tales como los antioxidantes (Rangkadilok *et al*, 2005).

Los antioxidantes son compuestos con la particularidad de inhibir o retrasar la oxidación de otras moléculas a través de la interrupción de las reacciones de oxidación en cadena, bloqueando los radicales libres que dañan tanto macromoléculas como a las estructuras celulares. Por este motivo, ha surgido un creciente interés por los antioxidantes, los cuales muchas veces representan los compuestos primordiales en los alimentos funcionales, que son aquellos alimentos que además de sus propiedades nutrimentales aportan sustancias que brindan efectos benéficos para el organismo (Murcia, 2002).

La mayoría de los procesos de elaboración de alimentos requieren el empleo de altas temperaturas, lo cual contribuye a la reducción del contenido y la biodisponibilidad nutrimental, así como la disminución de los compuestos con actividad biológica, además de que alteran las características organolépticas de los alimentos. Es por esta razón que se ha motivado a la industria a la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan conservar en mayor medida dichas características deseables en los productos, obteniendo así beneficios que abarcan tanto las cuestiones de mercado como en la salud de los consumidores (Osorio, 2008).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que previenen o ralentizan la oxidación de sustratos oxidables mediante la captura de radicales libres, el control de sustancias prooxidantes o intermediarios de la oxidación (Hernández, 2014).

En un estado de metabolismo normal en los humanos, existe un equilibrio entre las concentraciones de agentes oxidantes y de antioxidantes, manteniendo de esta manera las condiciones fisiológicas óptimas (Temple, 2000). Sin embargo, existen situaciones en las que se ve incrementada la producción excesiva de oxidantes, lo que trae como consecuencia la ruptura de ese equilibrio, conduciendo al daño de diferentes biomoléculas. Por lo tanto, los antioxidantes poseen un efecto protector frente al estrés oxidativo (García, 2011).

En los alimentos, un antioxidante puede ser una sustancia natural o artificial que se añade a los productos para prevenir o retardar su deterioro debido al fenómeno de oxidación, disminuyendo los efectos producidos por las especies reactivas de oxígeno. (Hernández, 2014). Los antioxidantes naturales presentan ciertas ventajas con respecto a los sintéticos, por ejemplo, en cuanto a legislación, se acepta que un aditivo sea un extracto y no un compuesto puro y, además, son aceptados tanto por las autoridades sanitarias como por los consumidores (Iglesias, 2009).

En la época actual, los consumidores cada vez presentan mayor tendencia hacia el consumo de productos naturales, incluyendo los antioxidantes, por lo que la industria alimentaria muestra mayor interés en incluirlos como aditivos con la finalidad de sustituir a los antioxidantes sintéticos. Esta tendencia se basa en la basta variedad de estudios que demuestran que los antioxidantes naturales, incluidos los polifenoles, disminuyen el efecto causado por los radicales libres en el organismo, previniendo así ciertos padecimientos asociados a su desequilibrio (Benvenuti *et al*, 2004).

2.2 Polifenoles

Los polifenoles son compuestos que comprenden un amplio grupo de moléculas que están clasificadas como metabolitos secundarios de plantas. Se caracterizan por estar constituidos por uno o más anillos aromáticos y por lo menos un grupo hidroxilo, estructura derivada de la L-fenilalanina, que puede variar de una molécula simple a un polímero de alto peso molecular (Haminiuk *et al*, 2012). En la naturaleza se conocen más de 8,000 compuestos fenólicos (Bahadoran *et al*, 2013) que atendiendo a su composición química se dividen en dos grupos: los ácidos fenólicos (benzoico y cinámico) y los flavonoides (flavonoides, antocianinas y taninos) (Badui, 2013).

En las plantas, los polifenoles presentan varias funciones: proveen pigmentación a las flores, frutos y semillas, favoreciendo la polinización; son moléculas de señalización en las interacciones entre las plantas y los microorganismos; brindan protección frente a la luz ultravioleta; y tienen funciones defensivas en contra de agentes patógenos y depredadores (Petti *et al*, 2009).

Por otra parte, en lo referente a la alimentación humana, a los polifenoles se les atribuyen diversas actividades biológicas. Entre las más conocidas están las de antioxidantes, antialérgicos, antiinflamatorios, antivirales, antimicrobianos, antiproliferativos, antimutagénicos, anticarcinogénicos, inactivadores de radicales libres, reguladores del ciclo celular, inductores de enzimas antioxidantes y moduladores de vías de señalización celular (Bahadoran *et al*, 2013). Estas funciones son especialmente útiles en la prevención de ciertos padecimientos como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Siriwoharn *et al*, 2004)

2.3 Antocianinas

Las antocianinas son un grupo de compuestos fenólicos que se encuentran dentro del subgrupo de los flavonoides, responsables del color naranja, rojo, azul y violeta en

algunas flores, frutas y vegetales (Wang *et al*, 2007; Tiwari *et al*, 2009). Las antocianinas son glucósidos de polihidroxi- o polimetoxi- derivados de la estructura básica, el 2-fenilbenzopirilio (Damodaran *et al*, 2010). Están conformadas por estructuras básicas conocidas como antocianidinas o agliconas, las cuales constan de un anillo aromático unido a un anillo heterocíclico que contiene oxígeno que también está ligado a un tercer anillo aromático (Castañeda-Ovando *et al*, 2009). Cuando las antocianidinas se encuentran en forma glucosilada, se les conoce entonces como antocianinas, siendo los azúcares que con más frecuencia se unen la glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa, xilosa y otros disacáridos y trisacáridos (Damodaran *et al*, 2010). Estos carbohidratos se enlazan siempre a la posición 3 de la antocianidina, además con frecuencia se encuentra adicionalmente glucosa en la posición 5 y , menos habitual, en las posiciones 7, 3' y 4' (Collado, 2011) (Figura 1).

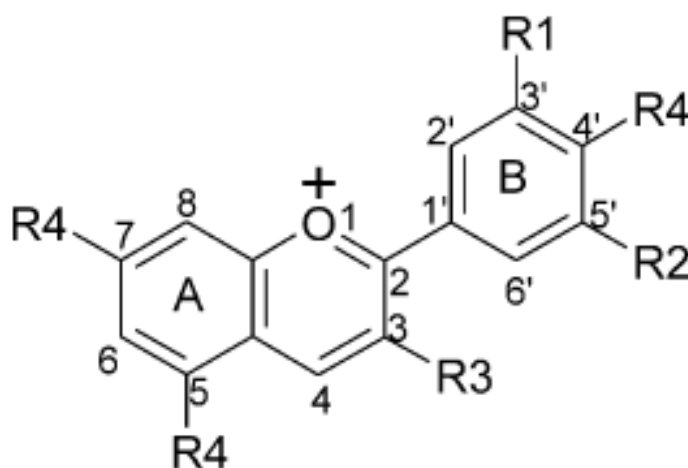


Figura 1. Estructura básica de las antocianidinas: 2-Fenilbenzopirilio. R1 y R2 = -H, -OH ó -OCH₃; R3 = -glicosilo ó -H; R4 = -OH ó -glicosilo. (Kong, *et al* 2003)

Las antocianidinas son menos hidrosolubles que cuando se encuentran glucosiladas, además raramente existen libres en los alimentos. En la actualidad se conocen 19 antocianidinas naturales, aunque las que tienen mayor presencia en alimentos son seis: pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (Kong *et al*, 2003) (Figura 2) nombres que se derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez.

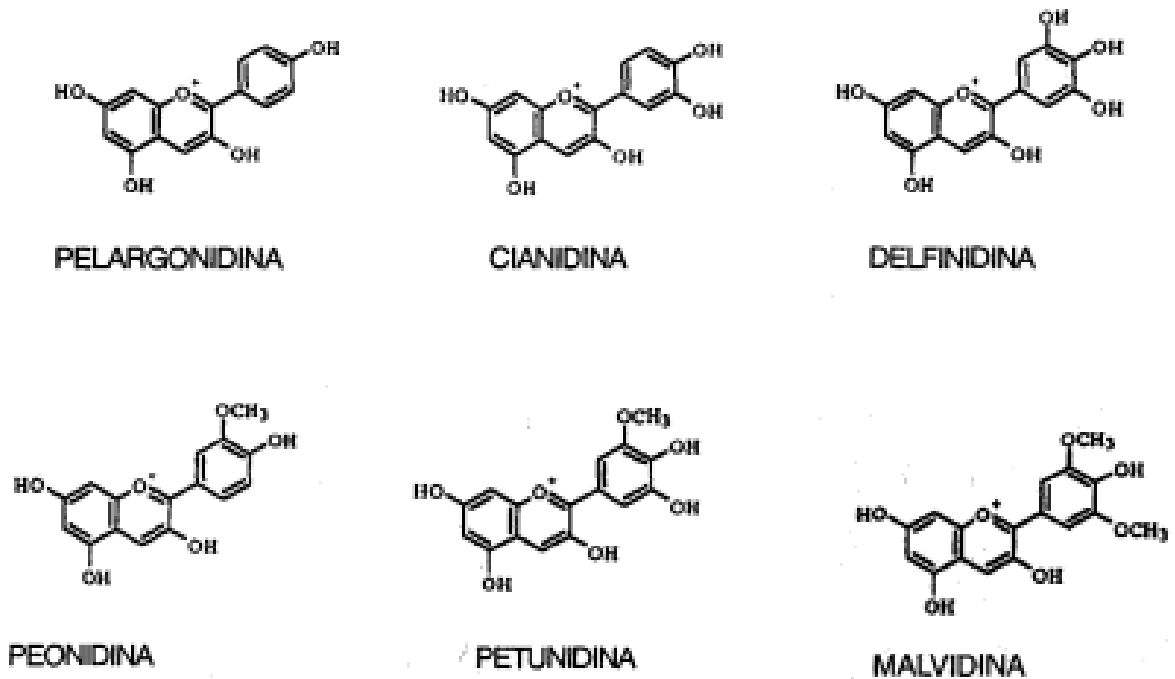


Figura 2. Antocianidinas más comunes en los alimentos (Damodaran, et al 2010).

Debido a que las antocianidinas se pueden glucosilar de diversas formas se genera una gran variabilidad estructural, por lo que se han identificado más de 600 antocianinas en el reino vegetal, las cuales se encuentran mezcladas y su concentración depende del tipo de cultivo y la etapa de madurez de estos (Damodaran *et al*, 2010).

En las plantas la función principal de las antocianinas es la coloración de los frutos y flores para atraer a los animales que pueden contribuir a la polinización. También intervienen en la floración, actúan como antioxidantes, agentes antibacteriales, protegen ante el estrés lumínico (Kong *et al*, 2003). La luminosidad y la temperatura son las principales variables ambientales que regulan la síntesis de estos compuestos; la primera la estimula y las altas temperaturas parecen inhibirla (del Valle *et al*, 2005).

Las antocianinas resisten el paso en el tracto digestivo de los mamíferos, son absorbidas en estómago y en la porción media del intestino delgado y pasan al torrente

sanguíneo de manera casi intacta (Garzón, 2008). Éstas pueden llegar a órganos como el hígado, ojos y cerebro y acumularse en los mismos (Fernandes *et al*, 2014).

Las funciones biológicas de las antocianinas se pueden clasificar en 2 tipos: aquellas relacionadas con su capacidad antioxidante y las implicadas en la modulación de las vías de señalización celular (Santos-Buelga *et al*, 2014). En general, se les atribuyen efectos como la prevención y/o disminución de la aterosclerosis, reduciendo la incidencia de enfermedades cardiovasculares; actividad anticancerígena; antiinflamatoria; reducción de la glucemia; mejora de la agudeza visual y de comportamiento cognitivo (Garzón, 2008; Kong, 2003).

2.3.1 Estabilidad química de las antocianinas

Las antocianinas son compuestos altamente susceptibles a la degradación y su estabilidad depende de factores como la temperatura, pH, luz, enzimas, iones metálicos, oxígeno e interacciones con otros compuestos (Rein, 2005).

Efecto de la temperatura: Las temperaturas altas contribuyen a la degradación de las antocianinas. Este factor causa la pérdida del azúcar que se encuentra en la posición 3 de la molécula y provoca la apertura del anillo, dando lugar a chalconas que son muy inestables (Garzón, 2008). En los procesos industriales como la pasteurización, se han observado pérdidas de hasta un 50% en las concentraciones de antocianinas en los alimentos (Tiwari *et al*, 2009; Wang *et al*, 2009).

Efecto del pH: Debido a que el núcleo de flavilo es muy reactivo, es muy sensible a variaciones en el pH, lo que puede conducir a cambios estructurales (Badui, 2013). De manera general, el pH bajo promueve una mayor estabilidad en la molécula y se ha observado que en solución acuosa a un pH menor a 2 el compuesto se mantiene prácticamente intacto (Garzón, 2008).

Efecto de la luz. La luz es un factor que acelera la degradación de las antocianinas. Aquellas que están sustituidas en los grupos hidroxilo del C-5 poseen mayor sensibilidad a la degradación por luz que las que no están sustituidas en dicho carbono (Damodaran *et al*, 2010).

Efecto de enzimas: Las glucosidasas y polifenoloxidasas, conocidas también como antocianasas, están implicadas en la degradación de las antocianinas. Las primeras hidrolizan los enlaces glucosídicos y las segundas oxidan las antocianinas en presencia de o-difenoles (Damodaran *et al*, 2010). Estas y otras enzimas son liberadas cuando se producen daños a la integridad de tejidos vegetales (Badui, 2013).

Asociaciones con otros compuestos e iones metálicos: Junto con ciertos compuestos fenólicos, las antocianinas forman complejos modificando su color a otros más intensos porque produce incremento en su absorbancia de luz visible. Sin embargo, en algunos frutos o en el caso de los vinos, con el paso del tiempo se disminuye la concentración de antocianinas monoméricas y se incrementa la producción de compuestos poliméricos. Por otra parte, la presencia en los alimentos de iones como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ó Mg^{2+} catalizan las reacciones de degradación de las antocianinas en presencia de azúcares reductores (Mazza, 1993).

Oxígeno y ácido ascórbico: El oxígeno altera la estabilidad de las antocianinas, ya que son de naturaleza insaturada y, por lo tanto, sensibles al oxígeno molecular. Uno de los métodos de control más empleados para disminuir la reacción con el oxígeno en los alimentos es utilizar envases con espacios de cabeza muy reducidos. Las antocianinas también son degradadas cuando hay presencia de ácido ascórbico, ya que durante la oxidación de este último se produce peróxido de hidrógeno.

Recientemente se ha incrementado el interés por el estudio de las antocianinas debido precisamente a su actividad biológica y sus efectos benéficos para la salud humana, los cuales son corroborados con datos epidemiológicos que sugieren que el

consumo de estos compuestos está relacionado con la prevención de ciertos padecimientos crónico-degenerativos (Veberic *et al*, 2015).

Existen diversos frutos que son fuente de antocianinas, entre los cuales se encuentran la zarzamora, la uva y la fresa, que son los que fueron empleados en el presente trabajo de tesis para elaborar un jugo rico en estos compuestos fenólicos.

2.4 Zarzamora (*Rubus fruticosus* L.)

La zarzamora pertenece al género *Rubus*, uno de los que cuentan con mayor número de especies (aproximadamente 750) y que se ha adaptado a diferentes condiciones ambientales, razón que le ha favorecido en su distribución por casi todo el mundo. En México se han catalogado 28 especies del género, algunas de ellas son endémicas (Cruz, 2013).

Los frutos se encuentran en forma de drupas pequeñas, generalmente concrecentes en la base, que en conjunto forman frutos agregados o también denominados polidrupas. Éstos se desprenden con frecuencia íntegros y acompañados o no del receptáculo. Sus semillas son ovoide-globosas, con testa delgada, membranosa y cotiledones plano-convexos (Rzedowski y Rzedowski, 2005; Díaz, 2011).

Se encuentra distribuido principalmente en regiones de clima templado y frío del Hemisferio Norte, pero también presente en zonas montañosas intertropicales (Rzedowski y Rzedowski, 2005). En México se encuentra distribuidas en zonas boscosas del centro y sur del país (López, 2009), y ocupa tercer lugar mundial en cuanto a la producción de zarzamora y el primer lugar en exportación (SAGARPA, 2014).

Los estudios fitoquímicos realizados este fruto muestran que las partes aéreas de algunas especies del género *Rubus*, presentan un elevado contenido de flavonoides (quercetina, kaempferol, ácido cafeico, ácido gálico y ácido clorogénico), ácidos fenólicos, taninos, aminoácidos, azúcares, pectinas, ácidos carboxílicos, antocianinas, catequinas, vitamina C, ácidos grasos saturados e insaturados (Süntar, et al., 2009; Buřičová et al., 2011). También se han aislado terpenos, flavonoides, galotaninos, esteroides, cetonas, ácidos carboxílicos, alcoholes, proantocianidinas, polifenoles, antrones, y alcaloides con actividad biológica (Cornejo *et al*, 2006).

Los niveles de acidez total, ácido ascórbico, sólidos solubles, capacidad antioxidante y polifenoles de la zarzamora dependen en mayor medida del genotipo que del clima o la estación. Además, el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante no son influidos por la región de cultivo o de temporada (Reyes *et al*, 2005).

En lo referente a la alimentación humana, la zarzamora constituye una de las principales fuentes de compuestos fenólicos, cuya capacidad antioxidante sugiere que su consumo puede desempeñar un papel importante en la atenuación del daño ocasionado por los radicales libres en ciertas situaciones patológicas (Márquez, 2011).



Figura 3. Planta de zarzamora (Rubus fruticosus L.

2.5 Uva (*Vitis vinífera* L.)

La uva es el fruto de la vid y crece en racimos. Pertenece al género *Vitis* que incluye aproximadamente 600 especies de arbustos. Los frutos, que nacen agrupados en racimos, son carnosos, de forma globular (redonda o alargada) cuyo diámetro es de alrededor de 1,6 cm y su peso oscila entre los 200 y 350 mg. El color de la piel es rojizo o purpúreo, esto dependiendo de las variedades. Su pulpa es jugosa y dulce.

Se cree que este fruto se cultiva desde la prehistoria, tal y como lo demuestran las semillas encontradas en yacimientos arqueológicos de la edad del bronce en Suiza, Italia y en tumbas de Egipto. Los botánicos sitúan el origen de la uva cultivada en Europa en la región asiática del mar Caspio, desde donde las semillas se dispersaron hacia el oeste por la cuenca mediterránea. Los colonos españoles fueron quienes introdujeron la vid en el continente americano (Collado, 2011). Actualmente, México ocupa el decimocuarto lugar en la producción de uva a nivel mundial, con 350,000 toneladas anuales (SAGARPA, 2014).

La cáscara de uva y sus semillas son fuentes importantes de sustancias con actividad biológica, tales como compuestos fenólicos, antocianinas y otros antioxidantes. La recuperación de estos componentes y su utilización adecuada es importante para el desarrollo de alimentos funcionales (Ghafoor *et al*, 2011). El perfil de los polifenoles de la uva es un indicador de calidad, así que su determinación es una herramienta fundamental para la caracterización de diferentes cepas y zonas de producción o distintos clones de una variedad (Ojeda, 2003).

Las antocianinas están relacionadas con la coloración de la fruta y con la protección ante el estrés lumínico, como parte del sistema antioxidante. En las uvas el contenido y perfil de antocianinas varía entre especies, cultivos, madurez, condiciones estacionales, áreas de producción, prácticas culturales y con el nivel de rendimiento. Las uvas coloreadas son una de las principales fuentes de antocianinas, por lo que se desarrollan

estudios para incrementar la síntesis de éstas, y por ende es importante conocer los mecanismos de regulación implicados ya que también preocupa el color como atributo externo de calidad (Mori *et al*, 2005).



Figura 4. Racimo de uva (*Vitis vinífera* L.) de la especie de uva roja.

2.6 Fresa (*Fragaria x ananassa* D.)

La fresa pertenece a la familia de las rosáceas, que abarca 20 especies botánicas, las cuales se encuentran dentro del género *Fragaria*. La especie *Fragaria x ananassa* es la única de este género que es cultivada. (Soria, 2015)

La planta es herbácea y perenifolia debido a que forma nuevos tallos de manera constante. Presenta numerosas hojas con los bordes dentados, ya sean lampiñas o vellosas. Sus tallos son pequeños (menores a 50 cm) y están transformados en rizoma, del cual parten las hojas y los estolones, los cuales se enraízan y desarrollan brotes que originan nuevos individuos. Sus flores pueden ser hermafroditas o unisexuales y se agrupan en racimos (Coronel, 2015).

El que se conoce popularmente como fruto de la fresa es en realidad un fruto falso, ya que se trata de un ensanchamiento de forma cónica del receptáculo floral (eterio) de color rojo, sobre el cual se encuentran adheridos los achenios, que son los frutos verdaderos (Fox *et al*, 1999).

Esta planta es originaria de Europa y actualmente es cultivada de manera anual en casi todas las regiones del mundo. Se conocen más de 1,000 variedades, algunas de las cuales son altamente comerciales (Soria, 2015), además de que su uso no se limita al consumo fresco, sino que es ampliamente utilizada en la industria para la elaboración de mermeladas, concentrados, purés y otros productos procesados.

En México, la fresa se introdujo el año de 1849 (León *et al*, 2014). En la actualidad, este país está posicionado en el 6° lugar mundial en producción, con 400 mil toneladas de fresa cultivadas en 8 mil 890 hectáreas, cuyo rendimiento promedio es de 44.62 toneladas por hectárea y su valor de producción suma un total de 4,475 millones de pesos (SAGARPA, 2014).

Las fresas contienen diversos compuestos fenólicos como las antocianinas, flavonoles, flavanoles, elagitaninos y ácidos hidroxicinámicos (Edirisinghe *et al*, 2011). Dentro de las antocianinas que contiene este fruto, las más abundantes son la pelargonidina-3-glucósido y la cianidina-3-glucósido (Fossen *et al*, 2004). Todos estos compuestos son los responsables de la alta actividad antioxidante que posee la fresa.



Figura 5. Planta de fresa (*Fragaria x ananassa* D.)

2.7 Jugos de frutas

En el Codex Alimentarius se encuentra el Codex Stan 247-2005, que es un código específico para jugos. Acorde con las disposiciones emitidas por la comisión del Codex Alimentarius, en este código se define como jugo de fruta el “líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie aplicados después de la cosecha”.

El Codex indica que un jugo de un solo tipo es el que se obtiene de un solo tipo de fruta, mientras que se le llama jugo mixto al que se obtiene de la mezcla de dos o más jugos, o jugos y purés de diferentes tipos de frutas.

Los tipos de jugo van a depender del tipo de elaboración a la que son sometidos después de la extracción (Cuadro 1):

TIPO DE JUGO	CARACTERÍSTICAS
FRESCO	Tratamiento mínimo. Obtenido por extracción mecánica. Sin pasteurizar. Atributos sensoriales agradables como sabor y aroma. Vida media menor a tres días. Debe almacenarse en condiciones de refrigeración.
CLARIFICADO	Se remueve el exceso de pulpa (pectinas, almidón, gomas, proteínas, etc.) por centrifugación o tratamientos enzimáticos.
NO CLARIFICADO	Pueden contener partículas en suspensión que no precipitan.
CONCENTRADO	Se ha eliminado físicamente el agua en una cantidad suficiente para elevar el nivel de °Brix al menos en un 50%.

Cuadro 1. Clasificación de jugos (Codex Stan 247-2005)

El CODEX STAN 247-2005 muestra los factores de composición, calidad y autenticidad de los jugos y néctares de frutas e indica los métodos de análisis para la verificación de estos factores. En este código, se le define autenticidad al mantenimiento de las características físicas, químicas, sensoriales y nutricionales de los frutos de los que proceden los jugos. Uno de los principales criterios de calidad es que los jugos y néctares de frutas deben poseer el mismo color, sabor y aroma que son característicos del fruto del que proceden.

En los procesos industriales se emplean tratamientos térmicos en la elaboración de jugos, los cuales pueden alcanzar temperaturas de entre los 60 a 82 ° C. Estudios señalan que este tipo de procedimientos causan la degradación de las antocianinas en los jugos, llegando incluso a afectar hasta el 50% de la concentración de este tipo de compuestos. Por tal razón es importante encontrar tecnologías no convencionales que permitan el procesamiento de los frutos sin tener ese inconveniente (Hager *et al*, 2008). Estas tecnologías, además, deben permitir la obtención de jugos preservando sus características nutrimentales y sensoriales. Un ejemplo de este tipo de tecnologías emergentes es el ultrasonido.

2.8 Ultrasonido

Las ondas sonoras son ondas mecánicas que requieren de un medio material para propagarse. Cuando éstas tienen una frecuencia mayor a los 20 KHz se les conoce como ondas de ultrasonido, ya que rebasan el umbral de la audición humana (20 Hz a 20 KHz) (Cárcel *et al*, 2012) y pueden llegar hasta los 5MHz en gases o los 500MHz en líquidos y sólidos (Kuldiloke *et al*, 2002). Estas ondas se generan a partir de la conversión de energía eléctrica a mecánica por medio de diferentes tipos de transductores. Esta energía transmitida por el ultrasonido puede ser expresada como poder de ultrasonido (W), intensidad de ultrasonido (W/cm²), densidad de energía acústica (W/mL), o intensidad cavitacional (O'Donnell *et al*. 2010).

Es posible caracterizar a las ondas de ultrasonido en función de su amplitud (A) y frecuencia (f), variables que pueden ser controladas por el operador del generador de onda con el que se trabaja. Por otro lado, la velocidad ultrasónica (c), el coeficiente de atenuación (α) y la impedancia acústica (Z) son parámetros que dependen de las propiedades físicas del material que es sometido al tratamiento y, por lo tanto, su medición reviste de importancia para la determinación de cambios en la estructura, composición o estado físico de los materiales (González *et al*, 2008).

De acuerdo a los intervalos de frecuencia de sonido utilizados en el ultrasonido se divide en (Mason, 1990):

- Ultrasonido de diagnóstico o de alta frecuencia (2-10 MHz)
- Ultrasonido de poder o de baja frecuencia (20-100 KHz)

El ultrasonido de poder o de baja frecuencia provoca el fenómeno de cavitación (Figura 6), que consiste en la formación de burbujas cuando la energía ultrasónica se propaga en un líquido y produce una alternancia de ondas de compresión y descompresión en el medio. Cuando la energía alcanza cierto umbral, estas burbujas crecen y colapsan liberando energía, resultando en regiones de alta temperatura y presión (Cárcel *et al*, 2012). La intensidad de la cavitación y sus efectos dependen de las características del medio, como la viscosidad, la intensidad del ultrasonido, frecuencia o presión.

La aplicación de fuerzas sinusoidales sobre la superficie de un material puede generar ondas de compresión, si la fuerza aplicada es perpendicular a la superficie del material, u ondas de corte, si la fuerza aplicada es paralela a la superficie del material (Kuldiloke *et al*, 2002).

El ultrasonido tiene diversas aplicaciones. Dentro de la industria alimentaria es uno de los métodos no térmicos de procesamiento de alimentos que se encuentran en investigación y desarrollo en la actualidad por los beneficios que puede suponer. El uso de ultrasonido es un método eficiente de procesamiento, de bajo consumo energético y

utiliza temperaturas menores a otros tratamientos; contribuye a una mejor extracción y/o conservación de algunos componentes de los alimentos; es una técnica de control microbiológico; y, además, puede inhibir ciertas enzimas (Chematt *et al*, 2011; Tiwari *et al*, 2009).

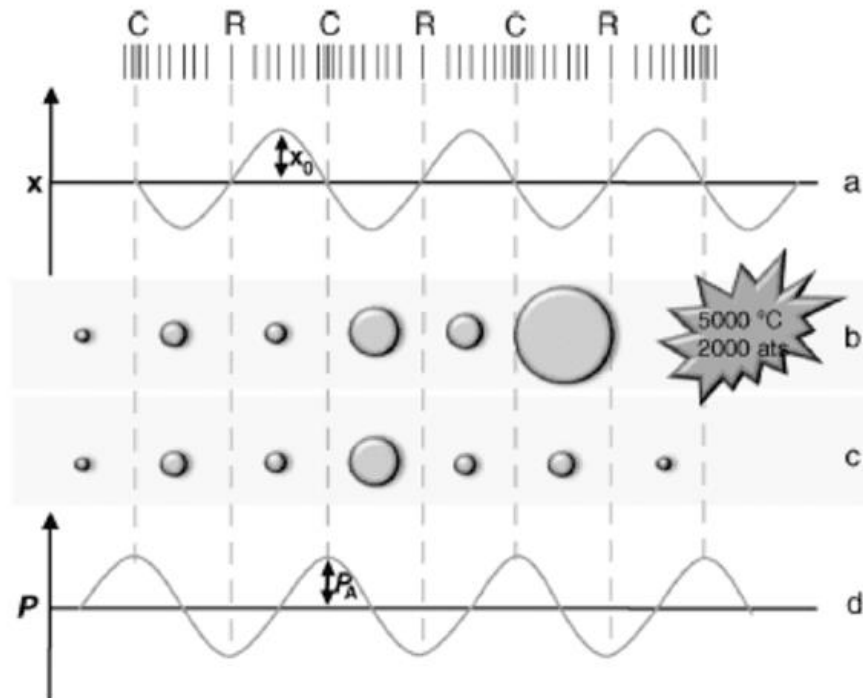


Figura 6. Fenómeno de cavitación. (a) Desplazamiento; (b) Cavitación transitoria; (c) Cavitación estable; (d) Presión (Santos *et al*, 2009).

Las ondas de ultrasonido presentan un efecto antimicrobiano que está dado por el fenómeno de cavitación. Las burbujas, al colapsar y liberar energía, producen un impacto mecánico continuo a nivel microscópico, los cuales provocan la lisis de la membrana y de otros organelos celulares en los microorganismos. El nivel de daño depende del tipo de bacterias, el tiempo de contacto con las mismas, la cantidad, composición del alimento y la temperatura durante el tratamiento (Mason, 1998).

La aplicación de ultrasonido en los alimentos supone una alternativa promisoriosa para la futura elaboración de productos alimentarios, incluyendo los jugos de fruta, cuya carga microbiana debe reducirse en al menos 5 ciclos logarítmicos de acuerdo a lo

estipulado por la FDA, un requisito que esta tecnología logra cubrir (Salleh-Mack *et al*, 2007) y que incluso dicha organización promueve.

El ultrasonido es capaz de inactivar enzimas presentes en los frutos que son responsables de algunos procesos de degradación de sus componentes. Esta inactivación se debe a la desnaturalización proteica y la formación de radicales libre por la sonólisis del agua ($H_2O \rightarrow OH^- + H^+$), por el efecto de cavitación o la combinación de ambos (Mason *et al*. 1994). Sin embargo, el ultrasonido también puede favorecer la actividad de algunas enzimas como las lipasas (Sakakibara *et al*, 1996; Liu *et al*, 2008).

Como se mencionó, otra ventaja tecnológica del uso del ultrasonido en el procesamiento de alimentos es que no son necesarias altas temperaturas como en el caso de los tratamientos convencionales. Esto permite conservar en mayor medida algunos compuestos con actividad biológica que son termolábiles, por ejemplo las antocianinas, cuya degradación llega hasta un 50% al emplear métodos que requieren temperaturas elevadas, como la pasteurización (Hager *et al*, 2008).

Específicamente en el caso de los jugos, se ha observado que el tratamiento con ultrasonido tiene un mínimo de efecto sobre la calidad del producto final (O'Donnell *et al*, 2010). Se ha reportado que las antocianinas en jugos se degradan de manera leve (Cheng *et al*, 2007), o incluso en algunos jugos, como el de fresa, la concentración de antocianinas incrementa entre un 1 y 2% luego del procesamiento con bajos niveles de amplitud (Tiwari *et al*, 2008), ya que el ultrasonido contribuye a una mayor liberación de los compuestos presentes en la pulpa de las frutas (Cuadro 2).

JUGO	CONDICIONES	RESULTADOS	REFERENCIA
ZARZAMORA	Tiempo: 2 – 10 min. Amplitud: 40% (48 µm) Frecuencia: 20KHz	Retención de antocianinas mayor al 95%	Wong, <i>et al</i> 2010
	Tiempo: 2 – 10 min. Amplitud: 24.4 – 61µm Frecuencia: 20KHz Pulso: 5s on/5s off		
UVA	Tiempo: 3 – 9 min. Amplitud: 60 – 120mm Frecuencia: 20KHz	Disminución de antocianinas en un 5 - 7.1% con ultrasonido en períodos prolongados. Disminución de 0.7 – 4.4% con ultrasonido en períodos cortos. Incremento de 1-2% de antocianinas	Dubrovic, <i>et al</i> 2011 Tiwari, <i>et al</i> 2009

Cuadro 2. Aplicación de ultrasonido en el proceso de elaboración de jugos ricos en antocianinas

Sin embargo, son escasas las investigaciones en las cuales se emplee el ultrasonido como una etapa previa al proceso de extracción, tal es el caso del estudio realizado por Costa *et al* (2011) en jugo de piña, en el que encontraron que el ultrasonido afectó la concentración de los compuestos fenólicos, además de que lograron la inactivación de la enzima polifenol oxidasa, algo no observado al utilizar el calentamiento a alta temperatura.

En el presente trabajo fue empleado el ultrasonido como una etapa previa al proceso de extracción del jugo, esto con la finalidad de mantener en mayor grado los compuestos fenólicos, como las antocianinas, durante la elaboración y almacenamiento. Y es que actualmente la industria alimentaria busca la aplicación de tecnologías que permitan obtener productos con un mayor contenido de antioxidantes naturales y que además estén mínimamente procesados, en respuesta a la solicitud de un amplio sector de los consumidores, cada día más preocupado por su salud.

2.9 Diabetes Mellitus

Según la definición de la Organización Mundial de la Salud, la diabetes es una “enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia que con el tiempo daña gravemente órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos” (OMS, 2013).

Existen dos tipos de diabetes: la diabetes mellitus tipo 1 y la diabetes mellitus tipo 2. En la de tipo 1, la hiperglucemia se produce porque el páncreas no produce insulina como consecuencia de un problema autoinmune, por lo que quienes la padecen se deben administrar insulina diariamente.

En la diabetes de tipo 2, en las primeras etapas hay producción de insulina, pero las células que la requieren dejan de responder a ésta. Este tipo representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física.

Los síntomas típicos de la diabetes son poliuria, polidipsia y polifagia; también hay pérdida de peso, debilidad y molestias en extremidades. Sin embargo, lo más grave de la diabetes son sus complicaciones, que se desarrollan a lo largo de varios años de evolución. Entre las principales complicaciones se encuentran: retinopatía, nefropatía, cardiopatía, neuropatía, pie diabético y el coma.

2.9.1 Diagnóstico de la diabetes mellitus

De acuerdo a la OMS, los principales criterios de diagnóstico para la diabetes son los siguientes (OMS, 2009):

- Síntomas característicos de la diabetes, con una determinación de glucemia al azar igual o mayor a 200 mg/dl.
- Glucemia en ayunas (al menos 8 horas) con resultado igual o mayor a 126 mg/dl.

- Glucemia igual o mayor de 200 mg/dl a las 2 horas de una sobrecarga oral de glucosa.
- Glucemia a las 2 horas en una curva de tolerancia a la glucosa entre 140 y 199mg/dl.

2.9.2 Mecanismo de acción de la insulina

La insulina ejerce sus acciones a través de la activación de un receptor específico que se localiza en la membrana de las células diana, es decir, de células del tejido adiposo, musculares y hepáticas. La hormona se acopla a la porción extracelular del receptor, lo que produce un cambio conformacional que genera una señal que se transmite al interior de la célula, activando enzimas en forma de cascada, es decir, de manera secuencial (Koolman *et al*, 2005).

2.9.2.1 Insulina

La insulina es una hormona peptídica hidrófila que está constituida por 51 aminoácidos (Koolman *et al*, 2004) y su peso molecular es de 5.8kDa (Mathews *et al*, 2002). Se sintetiza en las células β , localizadas en conjuntos celulares que se encuentran en el páncreas y se conocen como islotes de Langerhans (Mathews *et al*, 2002).

Los monómeros de insulina se pueden asociar y dar lugar a una estructura cuaternaria. Sin embargo, la forma polimérica solamente se puede encontrar cuando se almacena en el páncreas, estabilizada por iones Zn^{2+} , ya que en la circulación sanguínea se encuentra como dímero (Koolman *et al*, 2004).

2.9.2.2 Receptor de la Insulina (IR)

El Receptor de la insulina (IR) es un heterotetrámero formado por dos subunidades α , que se encuentran en la parte externa de la membrana celular, y dos subunidades β

(Olivares *et al*, 2008), cuya extensión es tal que una fracción de las mismas es extracelular, otra es transmembranal y una tercera es intracelular (Mendivil *et al*, 2005). Ambas subunidades se encuentran unidas por puentes disulfuro (Figura 7).

Las subunidades β son las subunidades catalíticas y las subunidades α son subunidades regulatorias que mantienen inhibidas a las primeras. Son las subunidades α las que poseen los sitios de unión para la insulina, que al entrar en contacto con éstas, desactivan la actividad inhibitoria de éstas sobre las subunidades β , las cuales presentan dominios de tirocincinasas, que son los que sufren autofosforilación en 6-7 residuos de tirosina (Mendivil *et al*, 2005; Olivares *et al*, 2008).

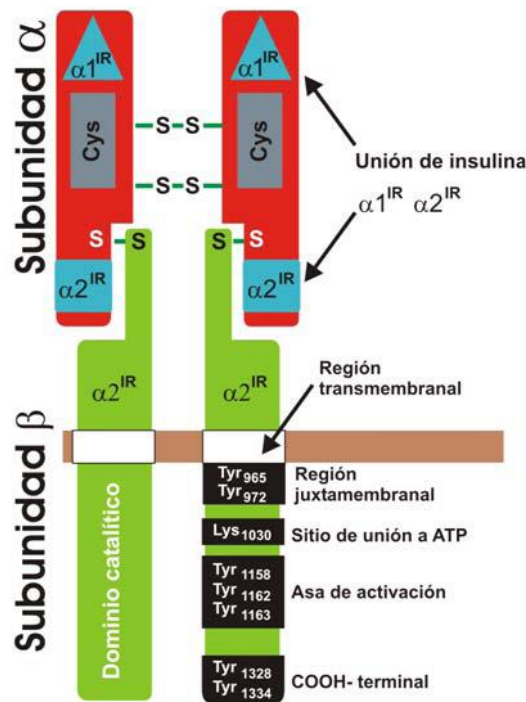


Figura 7. Receptor de la insulina (Olivares *et al*, 2008)

2.9.3 Vía de señalización de la insulina

Las funciones principales de la insulina están reguladas a través de dos vías: una es la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas), que se encarga de los efectos a nivel genético de la insulina; la segunda es la vía del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la cual está asociada con los efectos metabólicos de la hormona (Olivares *et al*, 2008) (Figura 8).

Al haber contacto entre la insulina y los sitios de unión de las subunidades α del IR, se produce un cambio estructural que lleva a la autofosforilación de las subunidades β en residuos de tirosina. Esto, a su vez, produce la fosforilación de la proteína llamada sustrato del receptor de la insulina (IRS) (Olivares *et al*, 2008).

El IRS, tras ser activado, sirven como sitio de unión para proteínas con dominios de homología al dominio 2 de la proteína Src (SH2), como la PI3K (Mendivil *et al*, 2005; Olivares *et al*, 2008).

La PI3K, al ser fosforilada, activa a la cinasa dependiente de fosfoinositidos-1 (PDK1) y a la proteína cinasa B (PKB) o Akt (Mendivil *et al*, 2005; Olivares *et al*, 2008). Luego, esta última induce la fosforilación de varios sustratos relacionados con las diferentes respuestas a la insulina (Olivares *et al*, 2008).

La insulina promueve la externalización del transportador de glucosa GLUT4 desde los compartimentos celulares hasta la membrana plasmática y este mecanismo es regulado por la vía de señalización PI3K y la cinasa Akt. Esta última, al ser activada, fosforila AS160 y la inhibe, de este modo se favorece el tráfico de GLUT4 (Virkamäki *et al*, 1999).

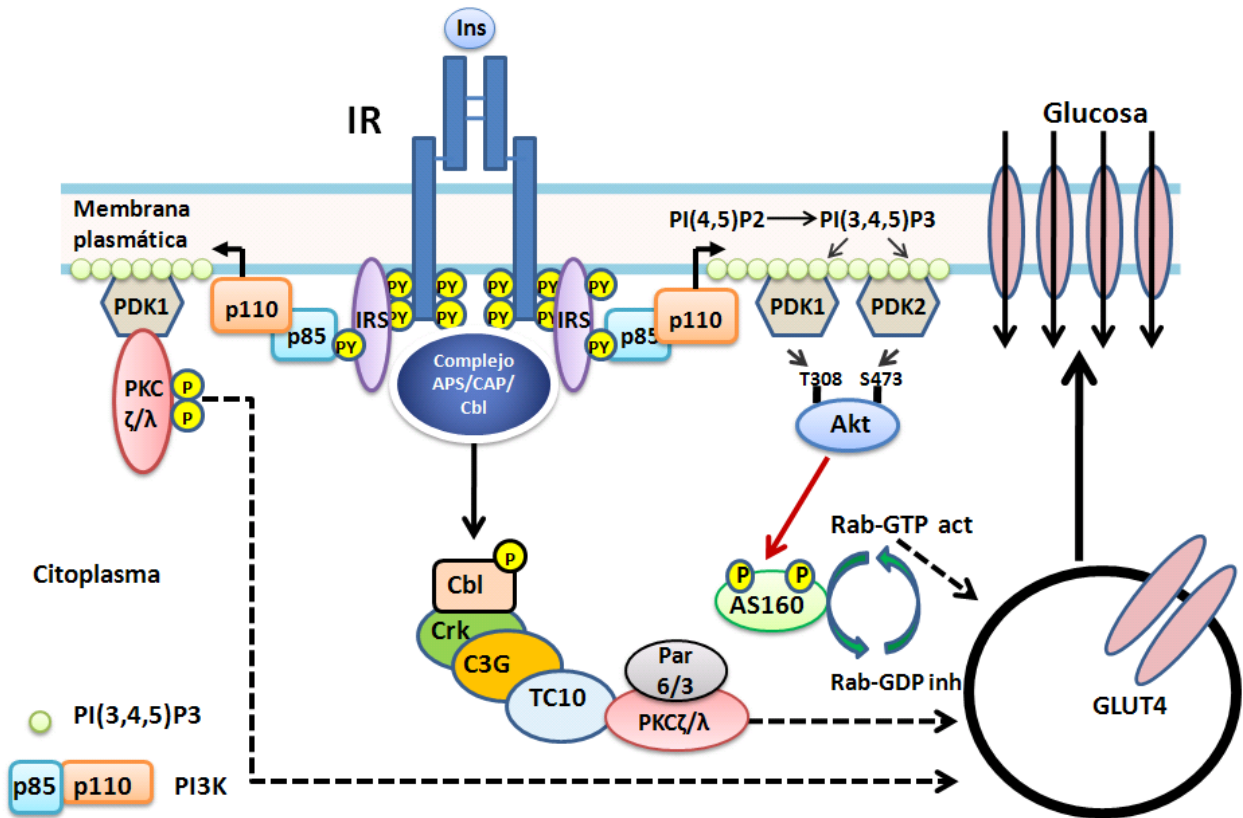


Figura 8. Vía de señalización de PI3K, relacionada con los efectos metabólicos (Olivares et al, 2008)

2.9.4 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es un estado patológico en el que las células que ordinariamente responden a esta hormona, dejan de hacerlo (Olivares et al, 2008). Se le asocia frecuentemente a padecimientos como infecciones crónicas, obesidad, diabetes tipo 2, hipertensión y problemas cardiovasculares (Le Roith et al, 2001).

La resistencia a la insulina se debe a mutaciones o modificaciones postransduccionales del receptor de insulina o de moléculas de la cascada de señalización a nivel molecular (Le Roith et al, 2001).

Algunos factores que se han identificado como inductores de la resistencia a la insulina son (Olivares *et al*, 2008):

- Ácidos grasos libres y sus metabolitos.
- Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y otras citocinas.
- Hormonas catabólicas.
- Hormonas secretadas por el tejido adiposo.

2.9.5 Antocianinas y diabetes

Las antocianinas son compuestos cuya actividad biológica se debe tanto a su efecto antioxidante como a su capacidad para intervenir en procesos de señalización celular, aunque los mecanismos de ambos tipos de acción no están del todo esclarecidos (Santos-Buelga *et al*, 2014).

En lo referente al efecto antidiabético de las antocianinas, se sabe que está dado por los siguientes factores (Sancho *et al*, 2012):

- Disminución del estrés oxidativo
- Protección de células β
- Incremento de la secreción de la insulina
- Mejora de la resistencia a la insulina
- Inhibición de la α -glucosidasa

Se ha observado que la elevación de los niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos, una condición existente en la diabetes, está directamente relacionada con el aumento de la producción de radicales libres, que a su vez contribuyen a la disrupción de algunas de las proteínas implicadas en la cascada de señalización de la insulina y de la generación de factores de inflamación. Por lo tanto, las antocianinas juegan un papel importante al contribuir en el control de los radicales libres, previniendo o retardando las complicaciones de la diabetes (Feshani *et al*, 2011)

Además de la resistencia a la insulina que se presenta en la diabetes mellitus tipo 2, también se caracteriza por la disfunción de las células β del páncreas. Esto se debe a la apoptosis inducida por radicales libres que se generan por reacciones de glicación provocadas por la hiperglucemia, junto al agotamiento pancreático secundario al exceso de insulina que estas células deben producir para contrarrestar el efecto del aumento de los niveles de glucosa plasmática (Ahrén, 2005). Nuevamente, las antocianinas pueden intervenir en la prevención del estrés oxidativo protegiendo así las células β de la apoptosis (Roy *et al*, 2008) y también se cree que intervienen en la proliferación de las mismas (Martineau *et al*, 2006).

Como se explicó anteriormente, la resistencia a la insulina es un estado en el que las células disminuyen la captación de la glucosa, entre otras funciones, debido a una inadecuada respuesta celular ante esta hormona. Su origen está relacionado con la hiperglucemia, los ácidos grasos, el estrés oxidativo y con moléculas proinflamatorias. Las antocianinas, que tienen la capacidad de neutralizar radicales libres también intervienen en la disminución de la expresión de citosinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-6 (IL-6), la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), entre otras (Sasaki *et al*, 2007). Además, dichos compuestos fenólicos contribuyen en el descenso de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres (Guo *et al*, 2007); posiblemente ayudan a la activación de los receptores de insulina e incrementan la expresión de los transportadores GLUT-4 (Nizamutdinova *et al*, 2009).

Las antocianinas inhiben la actividad enzimática de la α -glucosidasa, la cual se encarga de la hidrólisis de carbohidratos en el intestino delgado, retrasando la digestión de los mismos y previniendo de esta forma el aumento de la glucosa posprandial (McDougall *et al*, 2005).

2.10 Inducción de diabetes mellitus tipo 2 en ratas

Para la obtención de modelos de diabetes mellitus en ratas se pueden emplear tanto fármacos con efecto diabetogénico como la administración de dietas con elevado contenido de lípidos, o la combinación de ambos factores (Skovsø, 2014).

Los fármacos más utilizados para la inducción de diabetes son el aloxano y la estreptozotocina, siendo el primero empleado para producir diabetes tipo 1 y el segundo para diabetes tipo 2, aunque también puede ocuparse para la tipo 1 dependiendo la dosis administrada (Szkudelski, 2001).

Por otra parte, la inducción de diabetes por dieta hipercalórica generalmente es la alternativa preferida por los investigadores para provocar la diabetes tipo 2 en ratas puesto que se simulan de manera más fidedigna las condiciones que experimentan los humanos durante el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, se requiere de períodos de tiempo largos para llevarlo a cabo (12 semanas o más). Por tal motivo es común el uso de la combinación de dietas altas en lípidos y la aplicación de estreptozotocina, que es un agente con menor potencia que el aloxano, reduciendo el tiempo de inducción a 2 ó 4 semanas (Skovsø, 2014).

La dieta elevada en lípidos, que también puede incluir azúcares simples, se administra para producir hiperglucemia y resistencia a la insulina, que se observa en las etapas iniciales de la diabetes (pre-diabetes). Después de un período aproximado de 4 semanas se procede con la aplicación de una dosis baja de estreptozotocina (de 30 a 50 mg/kg), lo cual afecta la funcionalidad pancreática tal y como sucede en estadios más avanzados de diabetes tipo 2 (Reed *et al*, 2000)

La estreptozotocina ingresa a las células β del páncreas a través de los transportadores GLUT2 y genera la producción de óxido nítrico, favoreciendo además la formación de aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales que en conjunto contribuyen a la fragmentación del DNA y provocan daño mitocondrial, causando la

muerte celular y trayendo como consecuencia la disminución de la funcionalidad endócrina del páncreas (Szkudelski, 2001).

Histológicamente, en la diabetes tipo 1 se observa una pérdida del 60 al 80% de la masa funcional de células β , mientras que en la diabetes tipo 2 la reducción es menor al 24% en pacientes con menos de 5 años de evolución de la enfermedad, cifra que puede incrementar hasta un 54% después de 15 años. En períodos de tiempo mayores, la cantidad de disminución es similar en ambos tipos de diabetes (Skovsø, 2014).

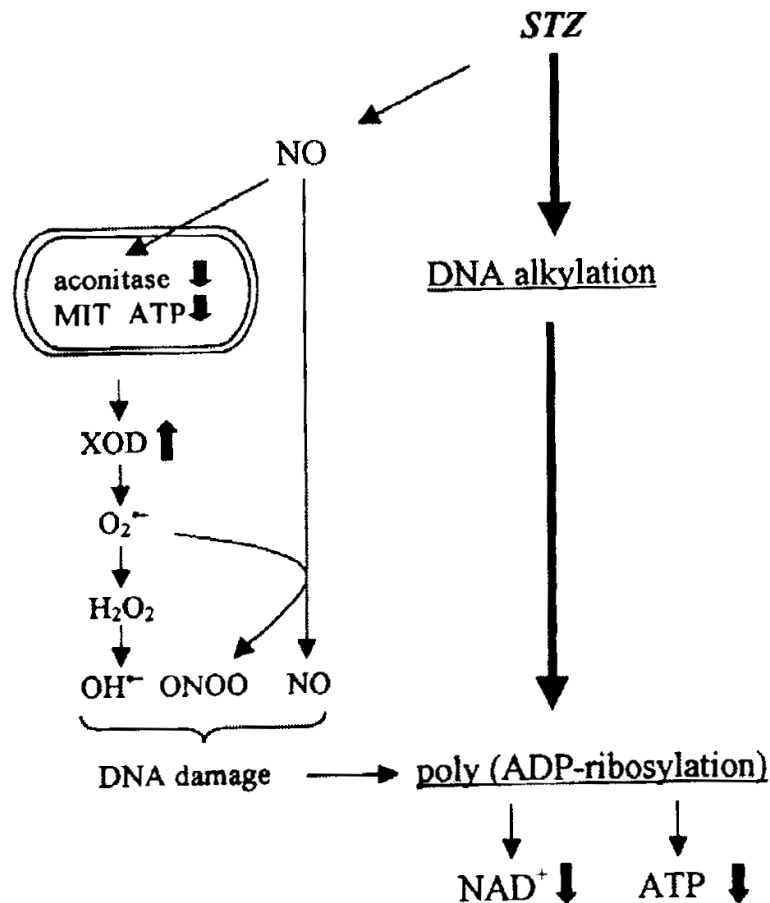


Figura 9. Mecanismo de toxicidad en células β inducida por estreptozotocina. MIT – mitocondria; XOD – xantina oxidasa. (Szkudelski, 2001)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes es una enfermedad crónica que en la actualidad representa un grave problema de salud pública. De acuerdo a la OMS (2012), en el mundo existen más de 347 millones de personas diagnosticadas con esta enfermedad. En México, según cifras de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT), hay 6.4 millones de casos registrados.

Los sistemas de salud están cada vez más comprometidos debido a las consecuencias que acarrea la diabetes sobre la salud pública y la productividad laboral. Por esta razón, es importante buscar alternativas a los tratamientos médicos actuales, que estén al alcance de todos y que sean efectivos.

Una de las alternativas que existen para abordar esta problemática es la creación de alimentos funcionales que, incluidos dentro del marco de una dieta correcta, puedan ser consumidos por la población afectada para prevenir e incluso contribuir a la disminución de las condiciones clínicas que se presentan tanto en la diabetes como en otras enfermedades crónico-degenerativas.

Ejemplo de esto es la elaboración de jugos de frutas como la zarzamora, la uva y la fresa, las cuales presentan un elevado contenido de antocianinas, sustancias que poseen efecto hipoglucemiante e hipolipemiante, que son importantes en la prevención y tratamiento de la diabetes.

4. HIPÓTESIS

La mezcla de jugos de zarzamora, uva y fresa procesados con ultrasonido presenta un efecto hipoglucemiante en ratas Wistar con diabetes mellitus tipo 2 inducida.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del consumo de un jugo de frutos rojos y uva rico en polifenoles procesado con ultrasonido en ratas Wistar con diabetes mellitus tipo 2 inducida

5.2 Objetivos específicos

- ✚ Evaluar el contenido de polifenoles y antocianinas monoméricas a los jugos de zarzamora, uva y fresa con y sin tratamiento con ultrasonido, así como en jugos comerciales.
- ✚ Analizar la microestructura de la fruta con y sin procesamiento con ultrasonido.
- ✚ Realizar una evaluación sensorial para conocer la aceptabilidad de cuatro formulaciones de jugo.
- ✚ Evaluar el contenido de polifenoles y antocianinas monoméricas a la mezcla de jugos.
- ✚ Administrar el jugo a ratas Wistar con diabetes tipo 2 inducida y evaluar su efecto sobre los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y HDL.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material

Se compró zarzamora, uva y fresa de la empresa Driscoll's de México, los cuales fueron adquiridos en un mercado local de la ciudad de Xalapa, Veracruz, México, entre los meses de agosto y noviembre de 2014. Dichos frutos se consiguieron y procesaron en estado fresco.

6.2 Metodología

6.2.1 Elaboración de jugos de zarzamora, uva y fresa

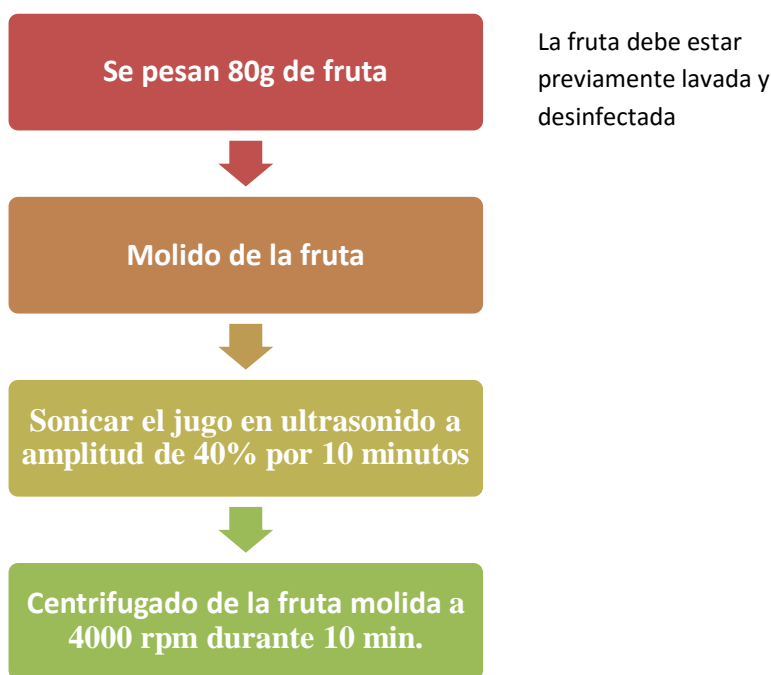


Figura 10. Elaboración de jugo de zarzamora, uva y fresa.

Los frutos fueron lavados en una solución de hipoclorito de sodio al 0.1 %. Una vez lavados, se pesaron 80 g de cada uno de ellos, siendo molidos por separado con un homogeneizador marca Braun durante 30 s. Posteriormente, la fruta molida fue colocada en un vaso de vidrio en un baño de hielo y se procesó a 40% de amplitud durante 10

min con 5 s en modo encendido y 5 s en modo apagado empleando un homogeneizador ultrasónico con frecuencia de 20 kHz y una potencia 750 W (Cole-Palmer Instrumental Company, VCX-750, E.E.U.U.). Finalmente, tanto la uva como la zarzamora fueron colocadas en tubos para ser centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos a 10 °C en una centrifuga Hettich Universal 32R. Para el caso de la fresa, el mismo proceso se llevó a cabo a un tiempo de 60 minutos.

6.2.2 Pruebas sensoriales de la mezcla de jugos

Para la formulación de las mezclas de jugos se realizó un diseño de taguchi de dos niveles utilizando el software estadístico Design Expert 7.0 (Figura 13), en el cual se consideró como variable la mayor concentración de antocianinas, que en este caso está dada por el jugo de zarzamora.

Como resultado del diseño de taguchi, se obtuvieron 4 mezclas con las siguientes proporciones de cada uno de los jugos individuales:

	M1	M2	M3	M4
Zarzamora	50	40	50	40
Uva	50	50	40	40
Fresa	5	10	10	5

Cuadro 3. Diseño de taguchi para la mezcla de los jugos de uva, zarzamora y fresa.

Las cuatro mezclas de jugos fueron evaluadas sensorialmente mediante una prueba hedónica de 7 puntos en la cual se emplearon 20 jueces no entrenados (Figura 11).

A cada uno de los jueces se le entregaron 10mL de cada una de las cuatro mezclas de jugos, los cuales debían ser calificados en cuanto al sabor, olor, color, textura y aceptabilidad general de la muestra.

Entre cada muestra que se dio a probar, a los jueces se les solicitó beber agua con la finalidad de diluir los residuos del jugo tomado previamente. Además, entre las primeras 2 muestras y las siguientes 2 se les pidió que esperaran un lapso de 30 minutos para llevar a cabo las siguientes pruebas. Este descanso se les brindó a los jueces debido al sabor fuerte característico de los frutos rojos, el cual podría causar interferencia en el sentido del gusto si las mezclas eran consumidas dentro de un período de tiempo corto.



Figura 11. Interpretación de los 7 puntos de la escala hedónica de la evaluación sensorial.

Tomando como base los resultados de la prueba sensorial, se seleccionó la mezcla con mayor nivel de agrado en cuanto a los parámetros evaluados.

6.2.3 Contenido de polifenoles totales y antocianinas totales en los jugos de zarzamora, uva y fresa y la mezcla seleccionada

6.2.4 Evaluación de polifenoles totales

Se empleó la técnica de Folin – Ciocalteau, la cual requiere de la elaboración de una curva de calibración de ácido gálico (12 mg/100 mL).

Fueron tomados 200 µL de cada una de las muestras, se añadieron 200 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2N y se agitó vigorosamente. Después, se agregaron 2 mL de solución de carbonato de sodio al 7 % y 2.6 mL de agua. La mezcla se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro ultravioleta/visible.

La concentración de las muestras se calculó con base a la curva de calibración y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/L.

6.2.5 Determinación de antocianinas monoméricas

Se utilizó el método de pH diferencial, la cual requiere de la preparación de una dilución con buffer de cloruro de potasio a pH 1.0, y otra con buffer de acetato de sodio a pH 4.5. El volumen final debe ser de 3 mL.

Las muestras se dejan en reposo por 15 minutos y se lleva a cabo la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro de barrido ultravioleta/visible entre 700 y 420 nm.

Para calcular la concentración de antocianinas monoméricas se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas monoméricas} = \frac{(A)(PM)(FD)(1000)}{(\epsilon)(1)}$$

Donde:

A = Absorbancia

PM = Peso molecular de la antocianina (449.2)

FD = Factor de dilución

ϵ = Absortividad molar (26,900)

El valor final de la absorbancia se obtendrá de la siguiente manera:

$$A = (A_{\max} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1} - (A_{\max} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$$

Donde:

A_{\max} = Mayor absorbancia obtenida a pH 1 y pH 4.5

$A_{700\text{nm}}$ = Lectura a 700 nm a pH 1 y pH 4.5.

La concentración final de antocianinas se expresa como mg equivalentes de cianidina-3-glucósido por litro. Se calcula con base al volumen de extracto y peso de la muestra empleado.

6.2.6 Microscopía electrónica de barrido

Para observar el efecto del tratamiento con ultrasonido sobre la microestructura de los frutos utilizados para la elaboración del jugo, se realizó una microscopía electrónica de barrido, empleando el equipo para tal estudio que se encuentra en las instalaciones del Instituto de Ecología A. C., de la ciudad de Xalapa, Veracruz.

Luego de ser sometidos al ultrasonido, los frutos molidos fueron centrifugados de acuerdo a la metodología antes descrita. Posteriormente se retiró el sobrenadante y los residuos sólidos de cada uno de los frutos fueron recolectados y llevados al laboratorio para realizar la microscopía.

6.2.7 Evaluación de la actividad biológica de la mezcla de jugos

6.2.7.1 Animales

Para la realización de las pruebas biológicas se emplearon 26 ratas macho Wistar con un peso de inicial de 150 a 200g, adquiridas en la empresa Harlan Teklad Inc. Los animales fueron manejados bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

6.2.7.2 Acondicionamiento

Las ratas fueron colocadas de manera individual y aleatoria en cajas, con ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 horas cada uno y a temperatura ambiente (23 °C). Durante 12 semanas se les suministró dieta estándar Rodent Diet 2018S de Harlan Teklad, la cual consumían *ad libitum* al igual que el agua. Se llevó a cabo el registro de peso semanal.

6.2.7.3 Inducción de diabetes mellitus tipo 2

Para la inducción de la diabetes mellitus tipo 2 se siguió la metodología establecida por Guo *et al* (2010), que consiste en la administración durante un período de 4 semanas de una dieta modificada rica en azúcares y lípidos, incluyendo colesterol, y una posterior administración por vía intraperitoneal de estreptozotocina.

6.2.7.4 Elaboración de las croquetas modificadas

A los animales a los que les fue inducida la diabetes mellitus tipo 2, se les administró una dieta modificada con la siguiente composición:

COMPONENTE	PORCENTAJE
Alimento estándar	68%
Sacarosa	20%
Manteca	11.5%
Colesterol	0.5%

Cuadro 4. Composición de la dieta modificada para la inducción de diabetes tipo 2 en ratas

El alimento estándar fue triturado en un molino manual para obtener un polvo fino, el cual fue mezclado junto con el resto de los ingredientes. A estos se le incorporaron de 10 a 20mL de agua para formar una pasta con la que se elaboraron croquetas de forma cilíndrica con un peso aproximado de 50g. Dichas croquetas fueron colocadas en un horno de microondas durante 30 segundos y luego guardadas inmediatamente en congelación (-20°C) durante un mínimo de 8 horas antes de administrarla a los animales. Los dos últimos pasos se realizaron con la finalidad de que las croquetas adquirieran cierto nivel de dureza, ya que esta es una de las características que deben tener los alimentos para roedores.

6.2.7.5 Administración de estreptozotocina

Después de las 4 semanas de administración de la dieta modificada, a las ratas se les inyectó estreptozotocina por vía intraperitoneal.

Las ratas fueron mantenidas en un ayuno de 8 horas previo a la inyección de estreptozotocina. Luego, se procedió con la aplicación de la estreptozotocina a una concentración de 30mg/Kg de peso corporal. Los animales se dejaron reposar durante un período de 24 horas y posteriormente se tomó el nivel de glucosa en plasma. Se declaró la diabetes en las ratas que tuvieron una concentración igual o mayor a 200mg/dl.

6.2.7.6 Administración de los jugos

En el período de experimentación de 28 días, los jugos, tanto comercial como el jugo de frutos rojos y uva procesado con ultrasonido, fueron suministrados a las ratas a través de una croqueta, la cual estaba elaborada con 2.5 g de alimento estándar molido, una solución de grenetina en agua y 3 mL del jugo correspondiente, cantidad que es el equivalente humano a consumir 500 mL al día, es decir, 2 vasos de 250 mL. Finalmente, las croquetas fueron sometidas a congelación durante un mínimo de 8 horas previas a su administración a los animales.

El cálculo de la dosis de jugos que fue administrada fue realizada con base a la recomendación diaria de antocianinas, la cual es de 2.5 mg/kg (Clifford, 2000).

6.2.7.7 Grupos de estudio y distribución de tratamientos

Las ratas fueron divididas en 4 grupos experimentales, con una n= 6 - 7 animales por cada uno (Figura 12).

El primer grupo (I) es de control sano, el cual recibió únicamente alimentación estándar y agua *ad libitum* durante todo el experimento. Del segundo al cuarto grupo (III, IV y V) se les indujo la diabetes mellitus tipo 2 mediante la administración de la dieta modificada por 4 semanas y la posterior inyección de estreptozotocina. Estos últimos continuaron el consumo de las mismas croquetas a libre demanda, al igual que el agua, hasta finalizar las pruebas biológicas, cuya duración fue de 4 semanas.

El grupo II se empleó como control enfermo con diabetes y no recibió ningún tratamiento. Al número III se le administró jugo comercial de manera diaria a través de la croqueta como tratamiento, mientras que al grupo IV se le suministró el jugo de frutos rojos y uva procesado con ultrasonido a través de la misma vía.

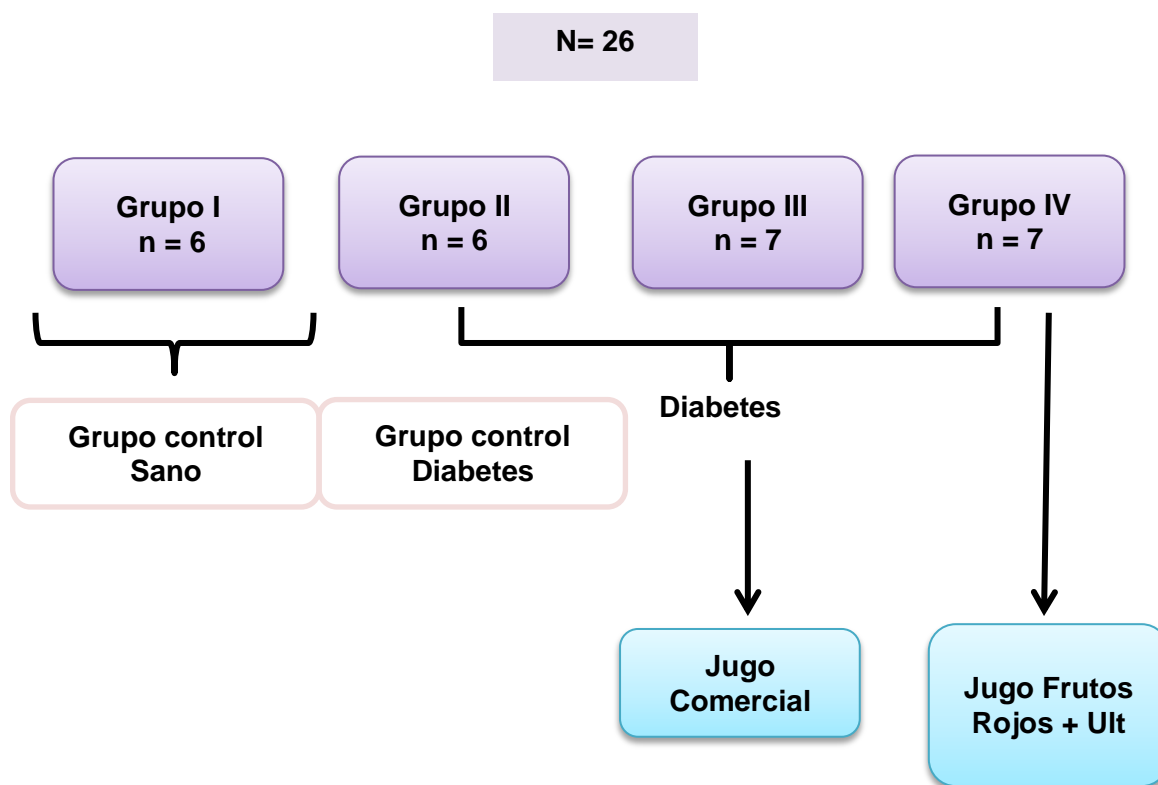


Figura 12. Grupos de estudio y distribución de tratamientos

6.2.7.8 Toma de muestras de sangre a las ratas

En el experimento se evaluaron los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, LDL y HDL en plasma, por lo que se requirió la toma de muestras de sangre de las ratas.

Para tal efecto, los roedores fueron dejados en un ayuno previo de 8 horas. Posteriormente, fueron anestesiados con pentobarbital sódico a una concentración de 40 mg/Kg por vía intraperitoneal. Una vez que se confirmaba que el fármaco surtiera efecto, a los animales se les realizaba un pequeño corte en la punta de la cola para que brotara la sangre levemente, la cual era recolectada por goteo en tubos eppendor de 1.5 mL y después era centrifugada durante 10 minutos para la separación del suero, que era colectado y luego congelado a -20°C.

Las muestras recolectadas de esta manera fueron analizadas en el Laboratorio de Neurotoxicología de la Universidad Veracruzana con el apoyo de químicos clínicos.

6.2.7.9 Sacrificio de los animales y obtención de muestras sanguíneas finales

Una vez finalizado el período experimental, las ratas fueron puestas en un ayuno de 4 horas y después decapitadas empleando una guillotina para el sacrificio de roedores. La sangre fue recolectada en tubos y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para el análisis de los parámetros bioquímicos considerados en este trabajo.

6.2.7.10 Extracción y peso de órganos

Luego de la decapitación, se llevó a cabo la disección de las ratas para extraer el hígado, páncreas, corazón, pulmones, bazo, riñones, glándulas adrenales, testículos y los tejidos adiposos epididimal, pericárdico y abdominal. Se registró el peso de tales órganos.

6.2.8 Análisis estadístico de los resultados

Las variables de respuesta polifenoles totales y antocianinas monoméricas de los jugos fueron analizadas con una prueba t de Student para encontrar diferencias entre los mismos (jugos de control y tratados con ultrasonido). A los parámetros bioquímicos y al peso de los órganos y del tejido graso se les aplicó el test de Kruskal-Wallis. Se realizó la asociación entre las variables de los distintos grupos, considerando el valor de P estadísticamente significativo cuando se obtuvo un valor $< 0,05$. Los análisis fueron procesados en el paquete estadístico Statistica versión 7.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial de las mezclas de jugo se llevó a cabo según la metodología descrita con anterioridad.

Los 5 parámetros sometidos a evaluación fueron: el sabor, el color, el dulzor, textura y aceptabilidad general.

De acuerdo a los resultados de la encuesta, en lo que se refiere al color (Figura 13), la mezcla número 2 (M2) es la que tiene la mayor aceptación entre el grupo de jueces no entrenados, mientras que la muestra número 4 (M4) fue la que resultó menos atractiva. La calificación que alcanzó la M2 para este parámetro fue de 5.75, que en la escala hedónica corresponde a un intermedio entre “me gusta ligeramente” y “me gusta moderadamente”.

En cuanto al sabor (Figura 14), la mezcla número 1 (M1) fue la preferida por los participantes de la prueba con una calificación de 6.25 que corresponda “me gusta moderadamente” en la escala. Por otra parte, la M4 tuvo también el puntaje más bajo.

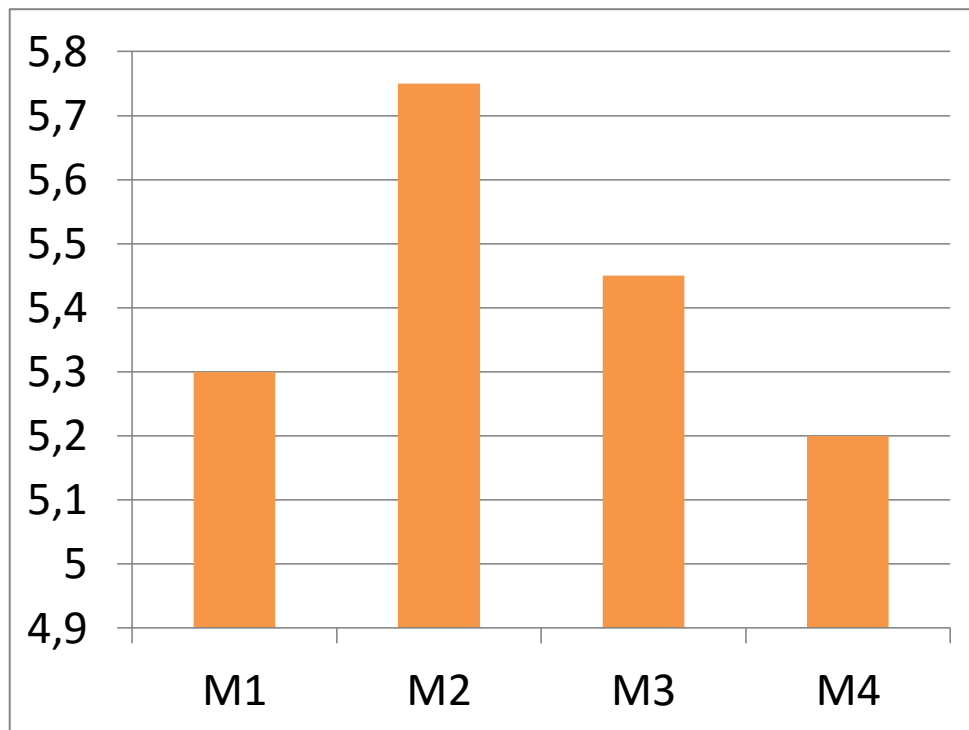


Figura 13. Resultados de aceptabilidad del color de las cuatro mezclas de jugos

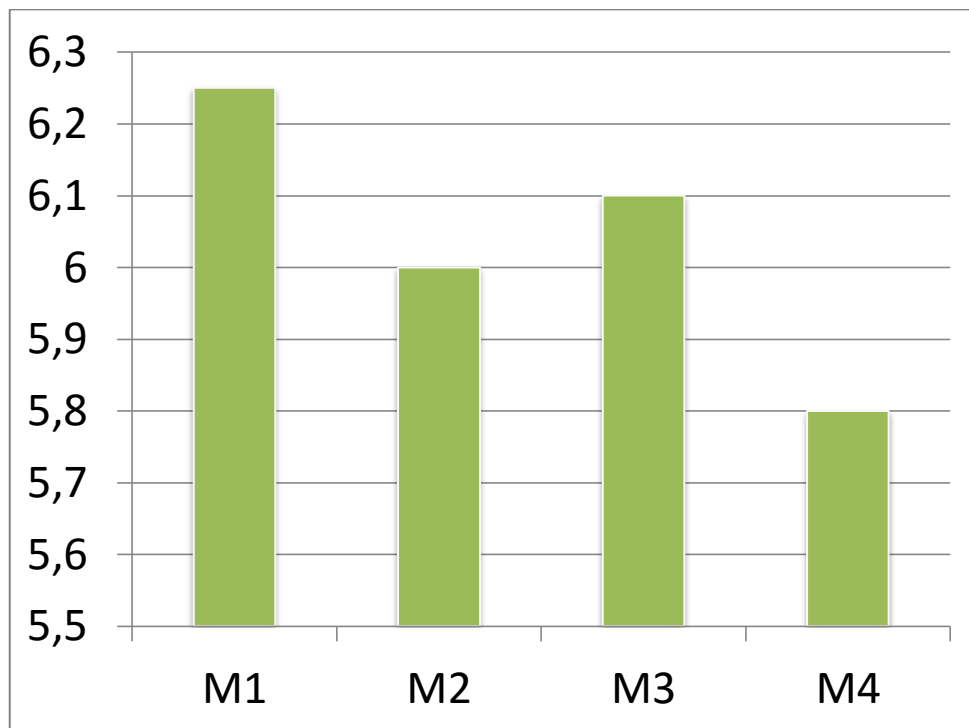


Figura 14. Resultados de aceptabilidad del sabor de las cuatro mezclas de jugos

La textura de los jugos también fue considerada en la evaluación sensorial (Figura 15). En este aspecto, la muestra número 3 (M3) fue elegida por la mayoría de los jueces con una calificación de 5.75 que la sitúa en “me gusta ligeramente” de la escala hedónica, mientras que la M4 fue la de menor puntuación.

La M1 fue la que resultó más aceptada por su dulzor (Figura 16), con un puntaje de 5.75 que en la escala corresponde a “me gusta ligeramente”, aspecto en el cuál tampoco destacó la M4.

Finalmente, otra característica tomada en cuenta para la prueba fue la aceptabilidad general (Figura 17) en la que la M1 nuevamente resultó tener la mayoría de los votos de los jueces, con una calificación de 5.75. También en este aspecto, la M4 fue la menos elegida.

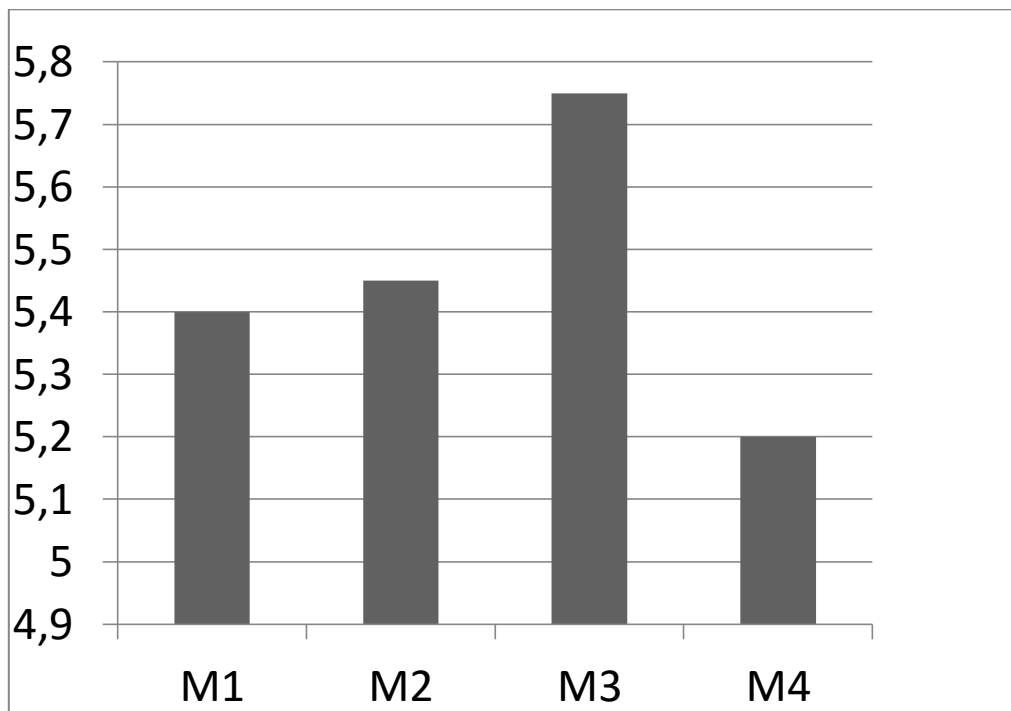


Figura 15. Resultados de aceptabilidad de la textura de las cuatro mezclas de jugos

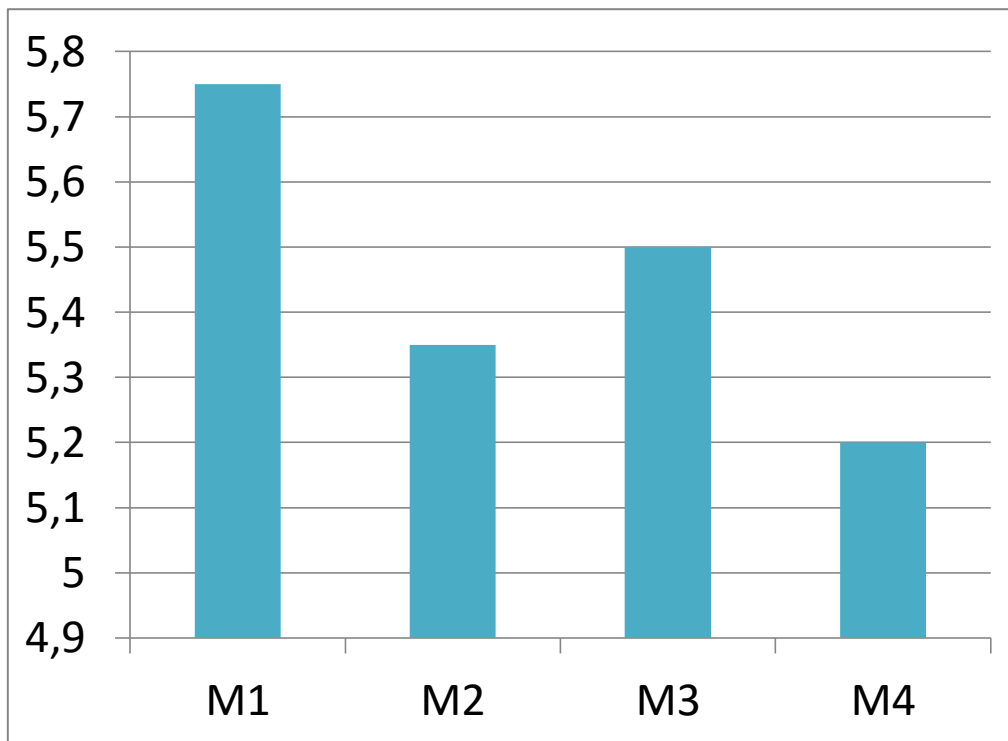


Figura 16. Resultados de aceptabilidad del dulzor de las cuatro mezclas de jugos

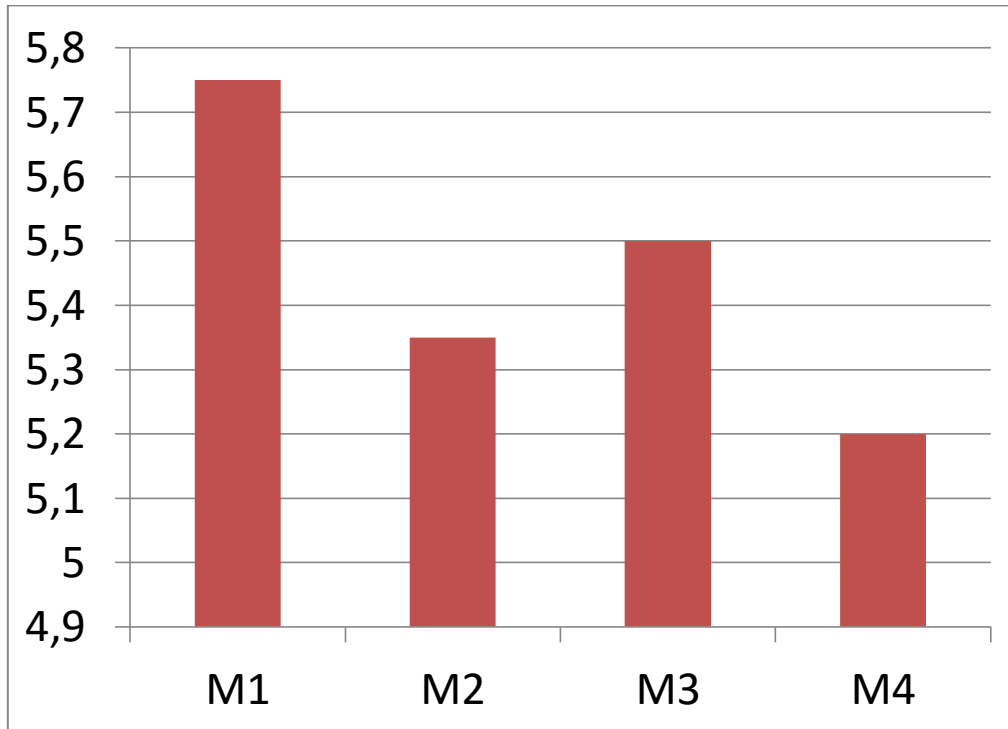


Figura 17. Resultados de aceptabilidad general de las cuatro mezclas de jugos

En resumen, la M1 es la muestra que presentó la mejor aceptación en cuanto al sabor, dulzor y aceptabilidad general. La M2 sólo destacó en el color, la M3 en textura y la M4 fue la que tuvo puntuaciones más bajas en la prueba. Esta última quedó descartada junto con las M2 y M3 que sólo tuvieron un aspecto positivo, por lo tanto, la mezcla que se empleó para las posteriores pruebas biológicas fue la M1, que también fue sometida a las determinaciones de polifenoles totales y de antocianinas monoméricas.

Además de la evaluación de las cuatro mezclas de jugo, se realizó una encuesta a las personas que participaron en la prueba con la finalidad de conocer cuáles eran las características que les parecen más deseables en los jugos de manera general, cuyos resultados se presentan en la Figura 18.

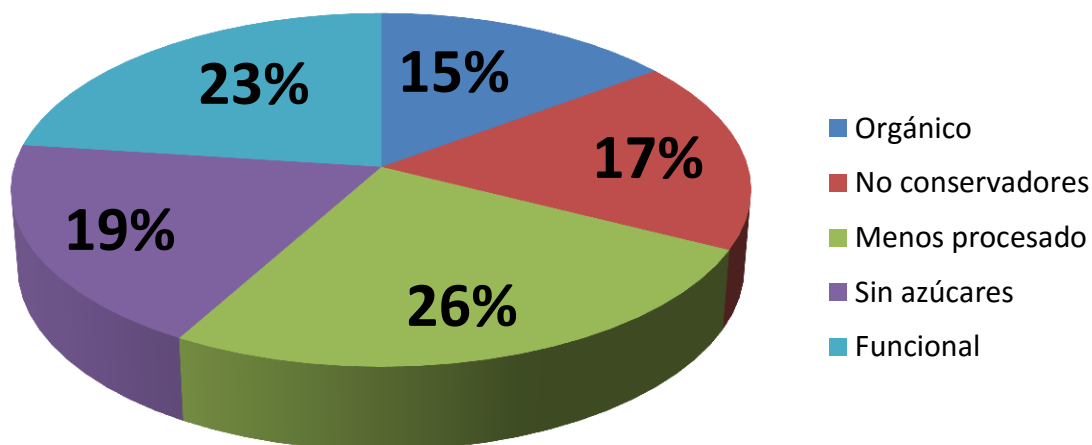


Figura 18. Características deseables en los jugos en general

Según esta encuesta, la característica más deseable en un jugo es que sea menos procesado; en segundo lugar, que el producto sea funcional; y el tercero es que sea sin

azúcares. Cabe mencionar que el jugo que es objeto del presente estudio cumple con las dos primeras características y parcialmente con la tercera.

El tratamiento con ultrasonido cumple con las funciones de extraer tanto el jugo de la fruta como los componentes bioactivos, así como reducir la carga microbiana, por lo que a escala industrial se podría volver más eficiente el procesamiento de jugo al utilizar un solo equipo que cumpla con varias funciones. Asimismo, el jugo de frutos rojos y uva es fuente natural y rica tanto en polifenoles como en antocianinas específicamente, los cuales son compuestos multifuncionales que pueden contribuir a la prevención o la mejora de cierto tipo de padecimientos, entre los cuales se encuentran algunos trastornos metabólicos como la obesidad, la diabetes y las dislipidemias.

Finalmente, el jugo no contiene azúcares añadidos, sin que esto afecte su aceptación en cuanto a sabor y dulzor. El producto no está exento de azúcares, sin embargo, sólo presenta los carbohidratos propios de los frutos con los que se elaboró. Esta es también una característica que resulta beneficiosa ya que la gran mayoría de los jugos procesados que se encuentran a la venta tienen un alto grado de azúcar añadido, constituyendo así un factor que se suma a otros existentes que son los responsables de la alta prevalencia de obesidad y sus complicaciones en nuestro país (PROFECO, 2006).

7.2 Determinación de polifenoles totales y antocianinas monoméricas en los jugos de zarzamora, uva y fresa.

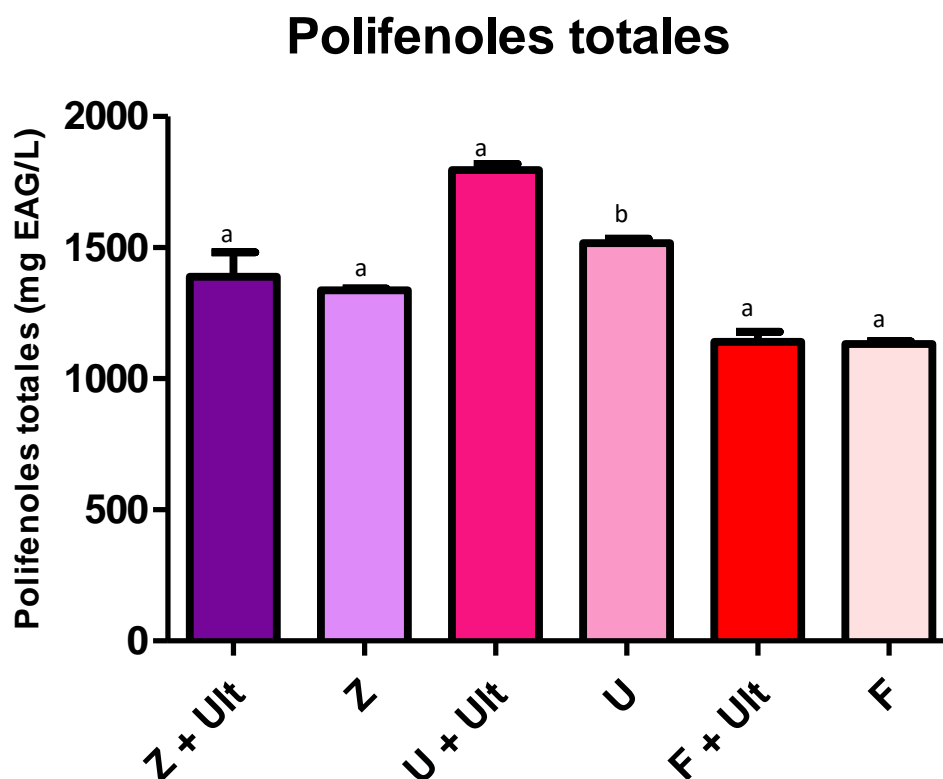


Figura 19. Contenido de polifenoles totales en los jugos de zarzamora, uva y fresa con y sin tratamiento con ultrasonido. Z+Ult = Zarzamora con tratamiento con ultrasonido; Z= Zarzamora; U+Ult= Uva con tratamiento con ultrasonido; U= Uva; F+Ult=Fresa con tratamiento con ultrasonido; F= Fresa.

Se determinó la concentración de polifenoles totales a los jugos de zarzamora, uva y fresa tanto con el tratamiento con ultrasonido como sin él (Figura 19). En los jugos de zarzamora y fresa no se observó que existiera una pérdida de estos compuestos debido a la aplicación del ultrasonido. Por otra parte, en el jugo de uva se dio un incremento en la concentración de polifenoles de un 12% en la muestra que fue procesada con respecto a la que no recibió el tratamiento ($p=0.001$).

Tomando en cuenta que la ingesta diaria recomendada de polifenoles totales es de 1 g/Kg (Clifford, 2000), un vaso (250mL) de los jugos procesados con ultrasonido tienen

el siguiente aporte: el de zarzamora 34.7%; el de uva el 44.9%; mientras que el de fresa 28.5%.

La diferencia de los resultados entre los tres jugos se debe a que las ondas de ultrasonido sufren cambios en sus propiedades (velocidad, atenuación, frecuencia, espectro, etc.) dependiendo de las características del medio a través del cual viajan (Chemat *et al*, 2011), lo que trae como consecuencia que en cada fruto actúen de manera distinta. En este caso, los tres frutos fueron sometidos a las mismas condiciones de sonicación, pero la estructura es particular para cada uno de ellos.

El incremento de los niveles de polifenoles totales en la uva, secundario a la aplicación del ultrasonido, se debe a que las ondas de ultrasonido, a esas condiciones de amplitud y de tiempo, lograron promover la extracción de aquellos compuestos que se encuentran más ligados a la matriz alimentaria y que normalmente no son susceptibles de ser separados por otros métodos convencionales (Tiwari *et al*, 2009). Probablemente, para lograr un efecto similar en los otros frutos era necesario modificar las condiciones del ultrasonido.

Con esta prueba se pudo corroborar que la aplicación del ultrasonido resulta beneficiosa para la extracción de polifenoles, no sólo porque no se dieron pérdidas con respecto a los controles sin tratamiento, sino que, como se observó con la uva, también es posible incrementar la concentración de estos compuestos en el producto final (el jugo) por su capacidad extractiva.

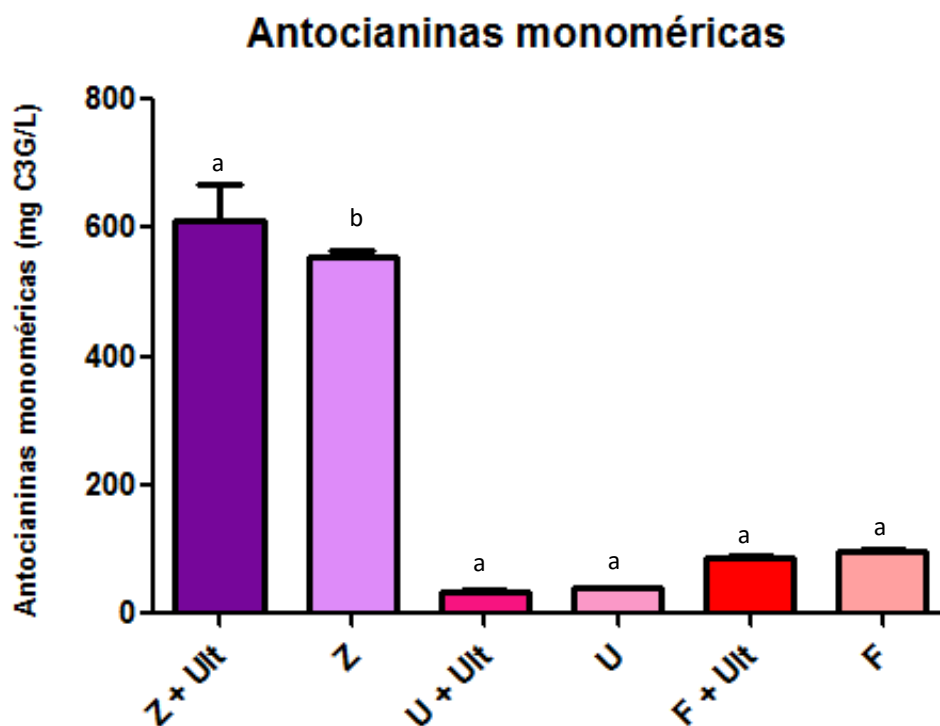


Figura 20. Contenido de antocianinas monoméricas en los jugos de zarzamora, uva y fresa con y sin tratamiento con ultrasonido. Z+Ult = Zarzamora con tratamiento con ultrasonido; Z= Zarzamora; U+Ult= Uva con tratamiento con ultrasonido; U= Uva; F+Ult=Fresa con tratamiento con ultrasonido; F= Fresa

En la determinación de antocianinas monoméricas (Figura 20) no se observaron diferencias significativas entre las cifras correspondientes a los jugos de uva y fresa procesados con ultrasonido comparados con sus controles sin él, mientras que en el jugo de zarzamora se encontró un incremento de 9.18% de antocianinas en el jugo de zarzamora con tratamiento con respecto a su control ($p=0.026$).

El motivo por el cual se encontró dicho incremento en el jugo de zarzamora pudiera ser que, de acuerdo a lo reportado por Chen *et al*, (2007), la cianidina-3-glucósido, la antocianina que se encuentra en concentración más alta en ese fruto, tiene mayor susceptibilidad a la extracción de su matriz alimentaria mediante el ultrasonido, aunque la prolongación del tiempo de sonicación y/o de la potencia puede ocasionar su degradación.

Siguiendo la recomendación de ingesta diaria de antocianinas, 2.5mg/Kg (Clifford, 2000), un vaso (250mL) de los jugos tratados con ultrasonido aportan: 87.1% el de zarzamora; 4.85% el de uva y 13.8% el de fresa.

7.3 Determinación de polifenoles totales y antocianinas monoméricas en los jugos comerciales

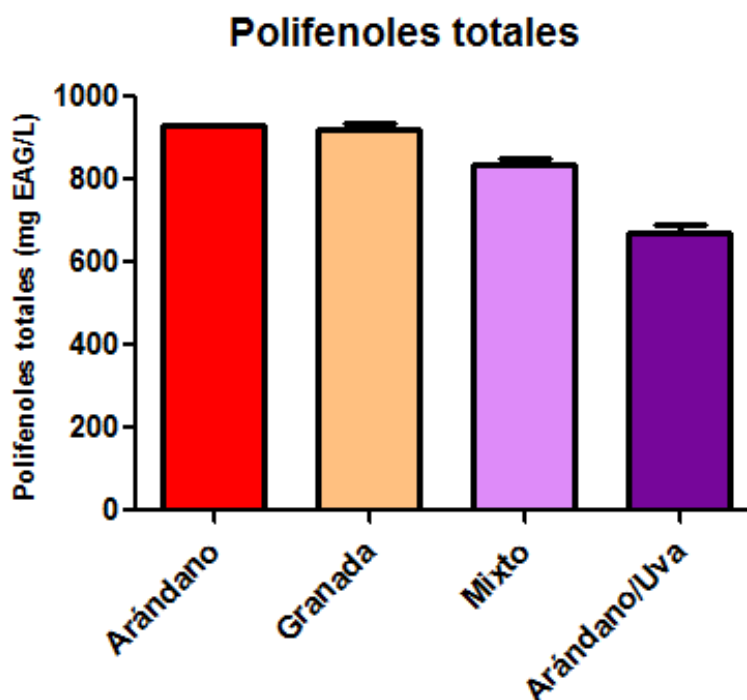


Figura 21. Contenido de polifenoles totales en los jugos comerciales de manzana con extractos de arándano, granada, frutos mixtos y mezcla de arándano y uva.

De igual manera, se determinó el contenido tanto de polifenoles totales como de antocianinas monoméricas en los jugos comerciales de manzana con extracto de arándano, granada, frutos mixtos y mezcla de arándano y uva. Estos cuatro jugos fueron seleccionados ya que en su publicidad se les presenta como productos con elevadas concentraciones de antioxidantes, sin indicar compuestos específicos, y son ampliamente distribuidos y consumidos comercialmente en México, razones por las

cuales se les tomó como referencia para la realización de las pruebas biológicas posteriores.

Los resultados de las mediciones de polifenoles totales en los jugos comerciales de manzana con extracto de arándano, granada, frutos mixtos y mezcla de arándano y uva (Figura 21) arrojaron niveles de 929, 922, 836 y 671 mg EAG/L respectivamente. Estas concentraciones resultaron entre un 20 y un 42% menores a las que se obtuvieron en los jugos de fruta con el procesamiento con ultrasonido. De tal manera que un vaso (250mL) de jugo comercial aporta entre un 16.7 y un 23.4% de polifenoles totales de acuerdo a la ingesta diaria recomendada.

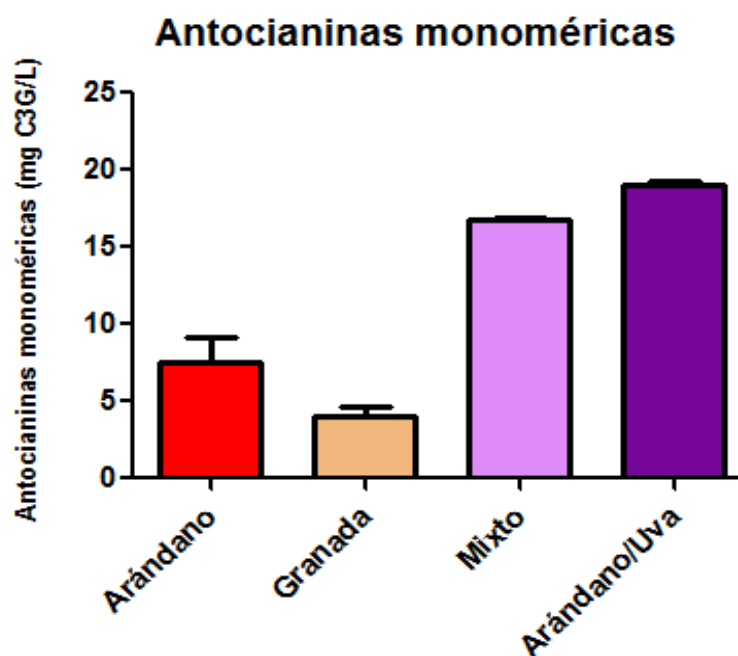


Figura 22 Contenido de antocianinas monoméricas en los jugos comerciales de manzana con extractos de arándano, granada, frutos mixtos y mezcla de arándano y uva.

Asimismo, se le midió la cantidad de antocianinas monoméricas a los jugos comerciales de manzana con extracto de arándano, granada, frutos mixtos y mezcla de arándano y uva (Figura 22). En este caso, se observaron cifras de 6, 4, 17 y 19 mg C3G/L respectivamente, concentraciones entre un 89% y 97% menores a las halladas en los jugos naturales tratados con ultrasonido, lo que supone una diferencia

considerable y significa que en el perfil fenólico de estos jugos las antocianinas ocupan un puesto muy bajo, mientras que el resto lo constituyen otro tipo de polifenoles.

De acuerdo a un reporte de la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO, 2006) en México, el 70% de los jugos comerciales presenta sustitución de los azúcares de los frutos de la que están elaborados por azúcares de otro origen, incluso algunos productos contienen menos de la tercera parte de los sólidos de la fruta original. Esto explica en parte el por qué en este tipo de jugos se observan cantidades menores de ciertos compuestos que originalmente se encuentran en concentraciones importantes en los frutos naturales. Además, prácticamente todos los jugos comerciales son sometidos a tratamientos térmicos que degradan gran parte de estas sustancias, sumado a que generalmente se almacenan a temperaturas superiores a 8°C, lo que contribuye también a la pérdida de estos compuestos funcionales.

7.4 Determinación de polifenoles totales y antocianinas monoméricas en la mezcla de jugos

Se elaboró una mezcla de los jugos que consistió en 47% de jugo de zarzamora, 47% de uva y 6% de fresa, la cual fue seleccionada de 4 formulaciones que fueron sometidas a una evaluación sensorial. Esta mezcla fue considerada el producto final debido a su contenido de polifenoles y de antocianinas monoméricas así como su aceptación por los jueces no entrenados, por lo que fue empleada en la experimentación animal. Los resultados de las determinaciones de estos compuestos se muestran en el cuadro 5.

CONCENTRACIÓN	
POLIFENOLES	
TOTALES	1260mg EAG/L
ANTOCIANINAS	
MONOMÉRICAS	306mg C3G/L

Cuadro 5. Concentraciones de polifenoles totales y de antocianinas monoméricas en la mezcla de jugos de zarzamora, uva y fresa

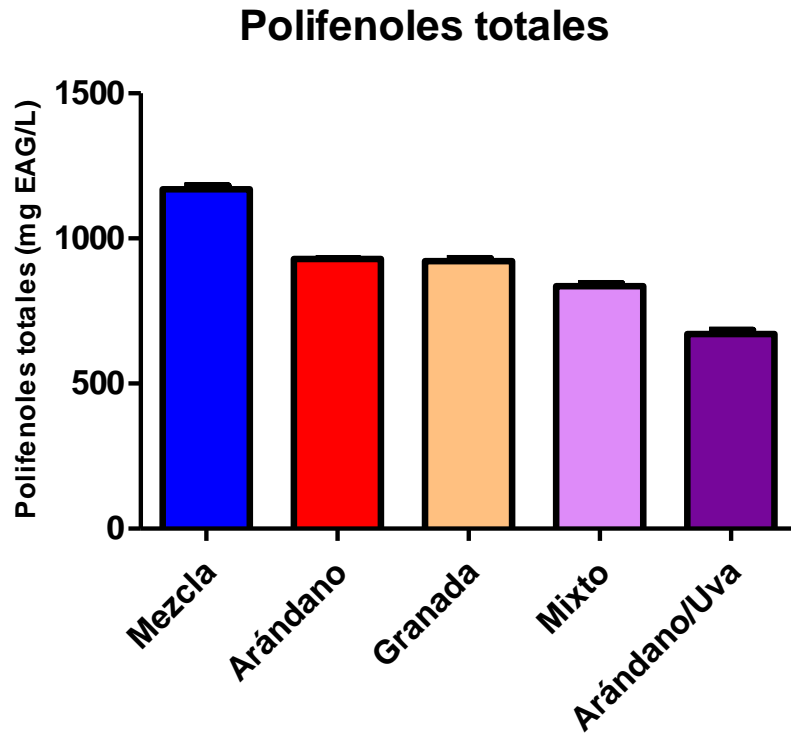


Figura 23. Contenido de polifenoles totales en la mezcla de jugos comparado con los jugos comerciales.

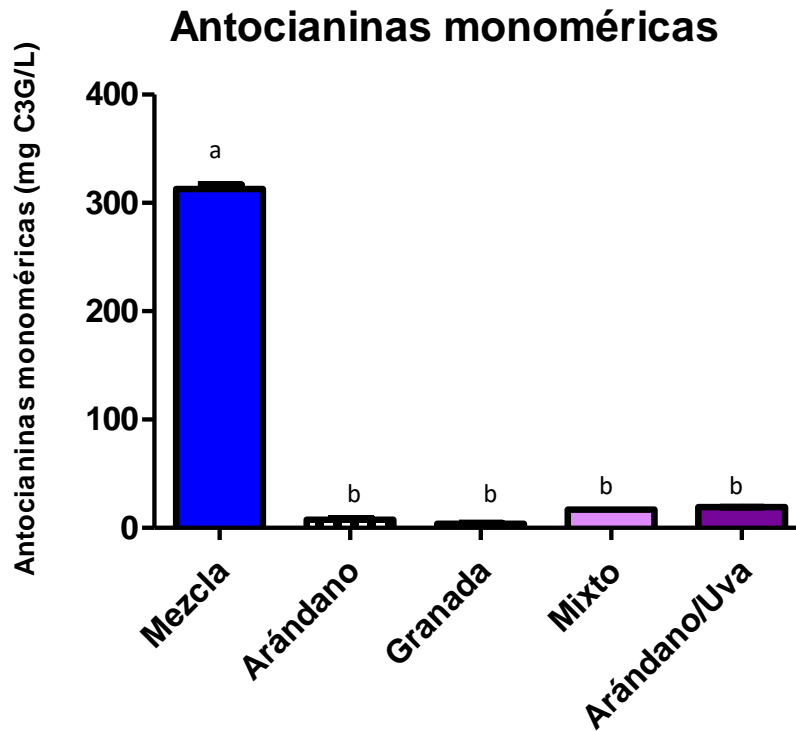


Figura 24. Contenido de antocianinas monoméricas en la mezcla de jugos comparado con los jugos comerciales

Al comparar los resultados de la mezcla de jugo de frutos rojos y uva procesado con ultrasonido con los jugos comerciales, es evidente que presenta una mayor concentración de polifenoles totales ($p=0.001$), de los cuales una parte importante la constituyen las antocianinas, que son los compuestos que presentan un mayor efecto benéfico en la prevención o en la atenuación de la diabetes ya que, como se mencionó anteriormente, se trata de moléculas multifuncionales que pueden actuar sobre diversos factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad.

Un vaso (250mL) de la mezcla de jugos aporta un 31.5% de la recomendación diaria de polifenoles, mientras que el mismo volumen provee el 43.7% del consumo de antocianinas. Las demás ventajas de esta mezcla son su aceptabilidad sensorial; no presenta azúcares añadidos; no requiere de conservadores o aditivos; está mínimamente procesado y conserva una elevada concentración de sus componentes bioactivos.

7.5 Micrografía electrónica de barrido

El fenómeno de cavitación es el responsable de los efectos del ultrasonido en los alimentos, como la disminución de la carga microbiana, la inactivación de enzimas y la extracción de compuestos con actividad biológica. Esto último sucede porque en los materiales sólidos, la alternancia entre compresión y expansión generada por las ondas de ultrasonido produce un efecto “esponja” (similar al que se observa al presionar una esponja y liberarla de manera repetida, lo cual provoca la liberación de líquido desde el interior, arrastrando también algunos otros componentes (De la Fuente *et al*, 2006). A esto se le suma también las perforaciones producidas en la matriz alimentaria por el colapso de las burbujas de cavitación.

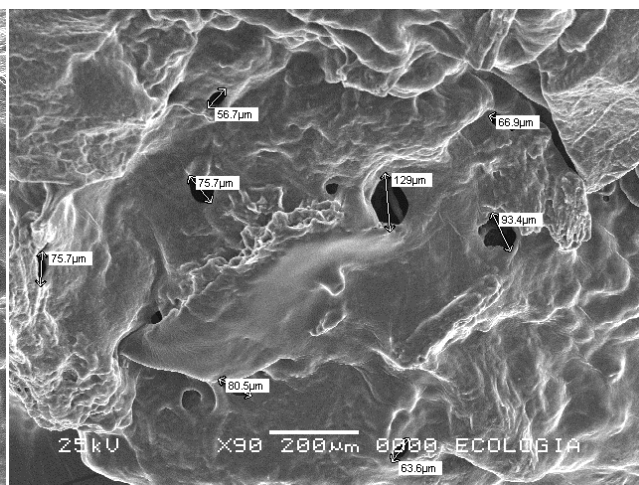
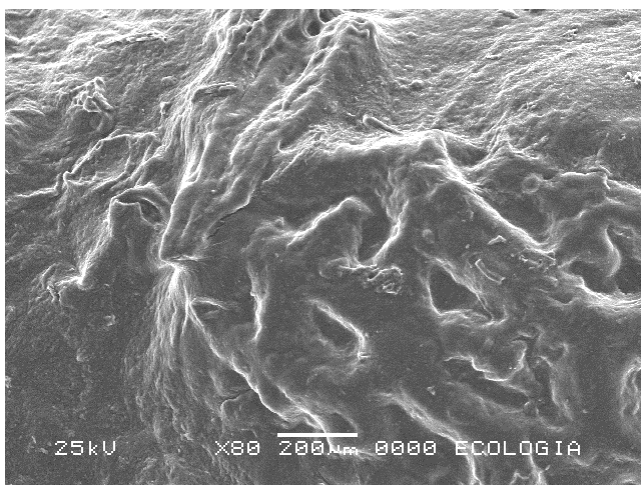


Figura 25 A.- Micrografía electrónica de barrido de la zarzamora sin tratamiento con ultrasonido

Figura 25 B.- Micrografía electrónica de barrido de la zarzamora con tratamiento con ultrasonido

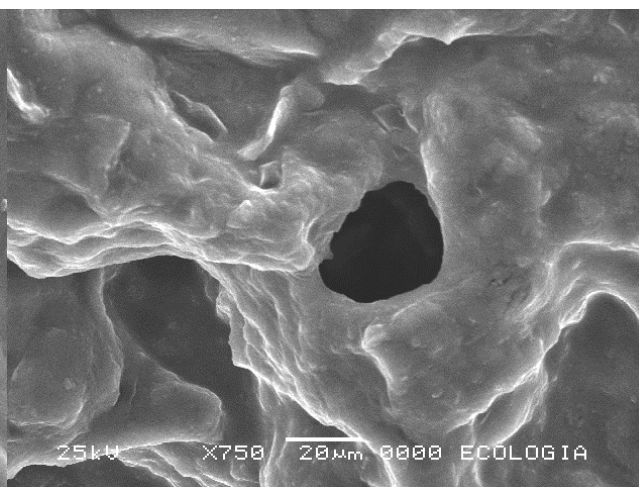
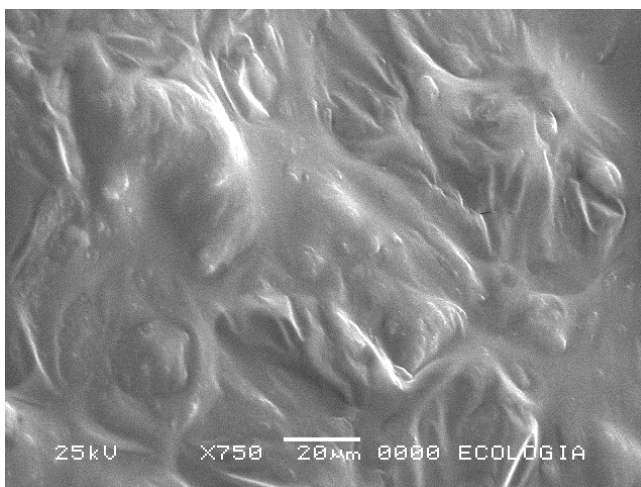


Figura 26 A.- Micrografía electrónica de barrido de la uva sin tratamiento con ultrasonido

Figura 26 B.- Micrografía electrónica de barrido de la uva con tratamiento con ultrasonido

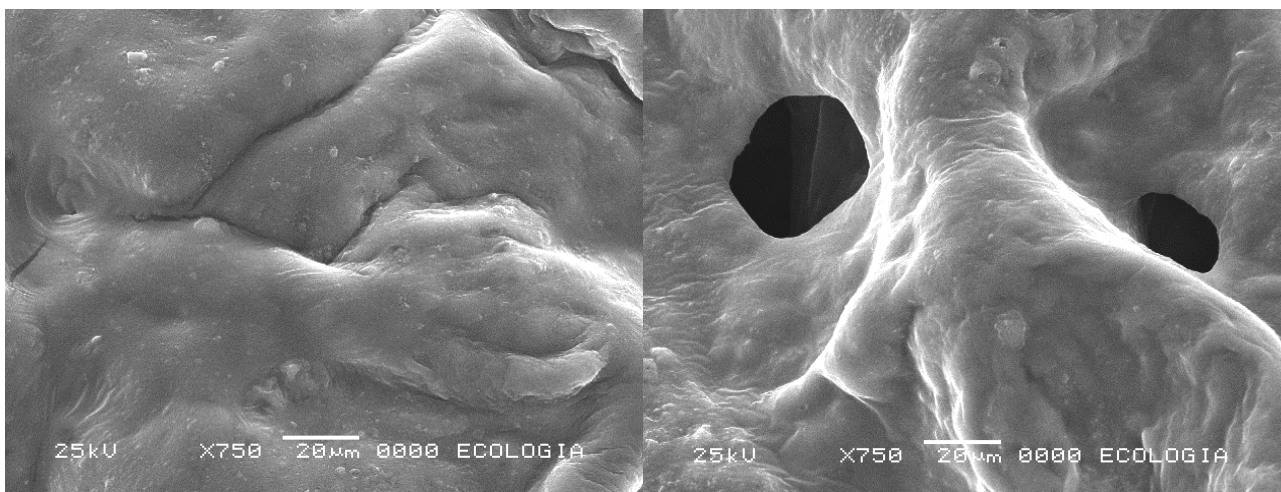


Figura 27 A.- Micrografía electrónica de barrido de la fresa sin tratamiento con ultrasonido

Figura 27 B.- Micrografía electrónica de barrido de la fresa con tratamiento con ultrasonido

En las muestras de frutos que no recibieron tratamiento con ultrasonido (Figuras 25A, 26A y 27A) solamente se observan ligeras variaciones en el relieve, zonas de valles que se alternan con regiones de elevación poco pronunciada y/o pequeñas depresiones.

Por otra parte, las muestras de frutos que fueron sometidas a la acción del ultrasonido (Figuras 25B, 26B y 27B), además de las características microestructurales propias de éstos, se encontraron microperforaciones de dimensiones variables y que se presentan de manera constante sobre gran parte de la superficie de las muestras. Dichos orificios se produjeron por el efecto de cavitación provocado por la acción de las ondas del ultrasonido. En la muestra de zarzamora tratada con ultrasonido se observaron agujeros de entre 20 y 76 μm de diámetro; en la muestra de uva fueron de entre 37 y 131 μm ; y en la de fresa fue de entre 36 y 110 μm .

Las microperforaciones no se produjeron únicamente en la superficie de los frutos, sino que también hacia el interior de los mismos. Esto fue posible observarlo gracias a que en ciertas regiones de algunas muestras se originaron cavernas durante el manejo de éstas, las cuales permitieron la visión del microscopio hacia las capas internas, confirmando así la presencia de orificios también en zonas más profundas (Figura 28).

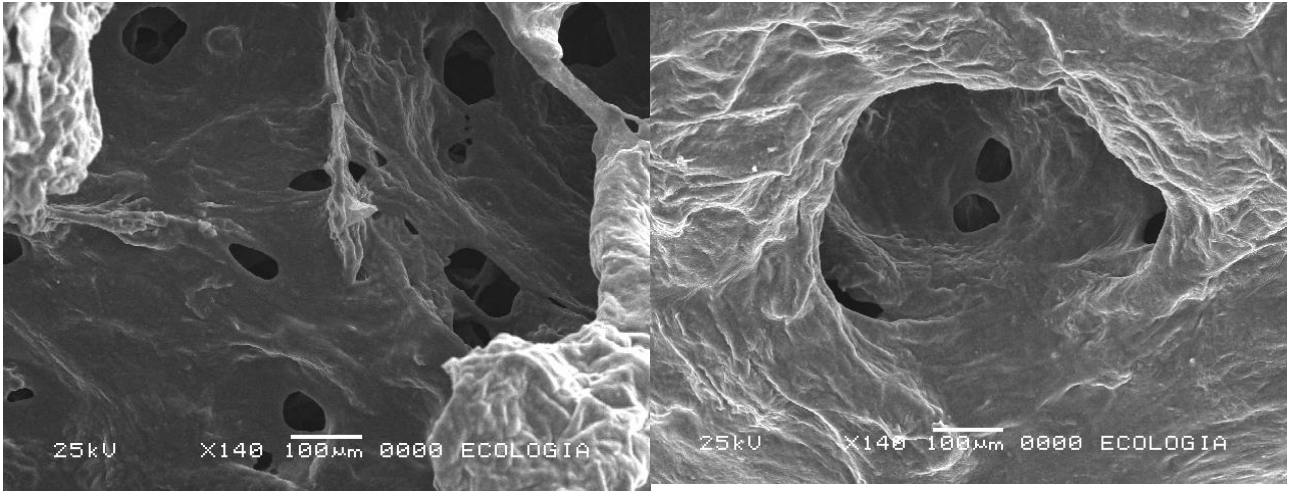


Figura 28.- Micrografías electrónica de barrido de fresa (izquierda) y uva (derecha) tratadas con ultrasonido mostrando microperforaciones en capas internas de las muestras.

7.6 Pruebas biológicas

7.6.1 Peso corporal

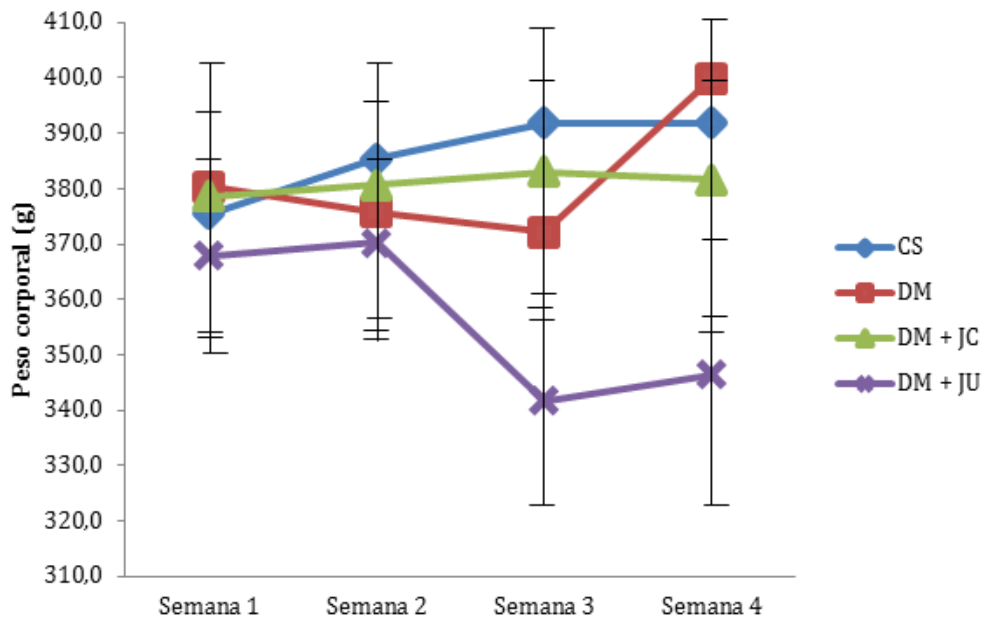


Figura 29. Registro del peso corporal de las ratas en el periodo de experimentación. CS= Control sano; DM= Diabetes sin tratamiento; DM+JC= Diabetes con tratamiento con jugo comercial; DM+JU= Diabetes con tratamiento con jugo con ultrasonido

Durante el periodo de experimentación con animales que duró 4 semanas, se llevó un registro del peso de manera semanal (Figura 29). En este se pudo observar como el grupo de control sano (CS) tuvo un incremento constante de peso de los 375 g hasta los 390 g a la tercera semana, permaneciendo alrededor de esa cifra hasta el final del experimento ($p=0.0001$).

El grupo de ratas con diabetes inducida sin tratamiento (DM) no presentó diferencia significativa en el peso corporal a lo largo de la prueba ($p=0.563$), al igual que las ratas diabéticas que recibieron jugo comercial (DM + JC) ($p=0.8926$) y el grupo que recibió el jugo de frutos rojos y uva procesado con ultrasonido (DM + JU) ($p=0.1425$). Esto se debió a la alta variación en el peso que existía entre los individuos de cada grupo.

En otros estudios se ha relacionado la ingesta de antocianinas con la disminución de peso corporal, ya que estas sustancias pueden activar factores de transcripción del tipo PPAR, que están implicados, entre otras funciones, en el metabolismo lipídico y la regulación del peso corporal (Seymour *et al*, 2011).

7.6.2 Inducción de diabetes mellitus tipo 2

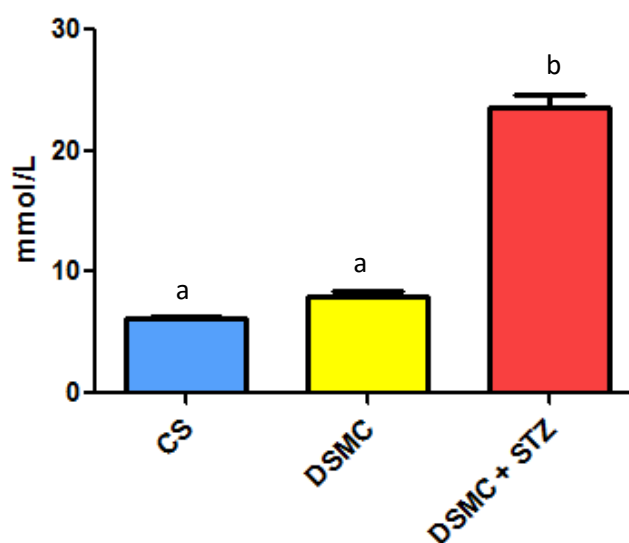


Figura 30. Niveles de glucosa plasmática en ratas con diabetes inducida. CS= Control sano; DSMC= Dieta modificada; DSMC+STZ= Dieta modificada y estreptozotocina

Para lograr la inducción de la diabetes mellitus se empleó la metodología de Guo *et al* (2010), la cual consistía en la administración de una dieta modificada durante 4 semanas y una posterior inyección de estreptozotocina. Las ratas fueron divididas en 3 grupos: el grupo control sano al que no se le indujo diabetes; un grupo al cual se le administró únicamente el alimento modificado y el tercer grupo al que además de la dieta se le aplicó la inyección con estreptozotocina (Figura 30).

Después de 4 semanas, el grupo de animales a los cuales se les alimentó con la dieta modificada no presentó una diferencia significativa con respecto al grupo de control sano ($p=0.246$). Sin embargo, está reportado que este tipo de dietas causan resistencia a la insulina durante ese lapso de tiempo, aunque no siempre se produce sintomatología, ya que el páncreas aun puede compensar la hiperglucemia con una elevación en la liberación de insulina (Skovsø, 2014).

Por otra parte, el grupo al que además del alimento modificado se le aplicó la estreptozotocina tuvo una diferencia considerable en la concentración de glucosa plasmática en comparación con los grupos anteriores ($p=0.001$). La dieta con elevado contenido de azúcar y grasas predispone a la aparición de la diabetes en las ratas, pero el curso de la enfermedad se acelera por la acción de la estreptozotocina, tal como describe Guo *et al* (2010).

7.6.3 Concentración plasmática de glucosa

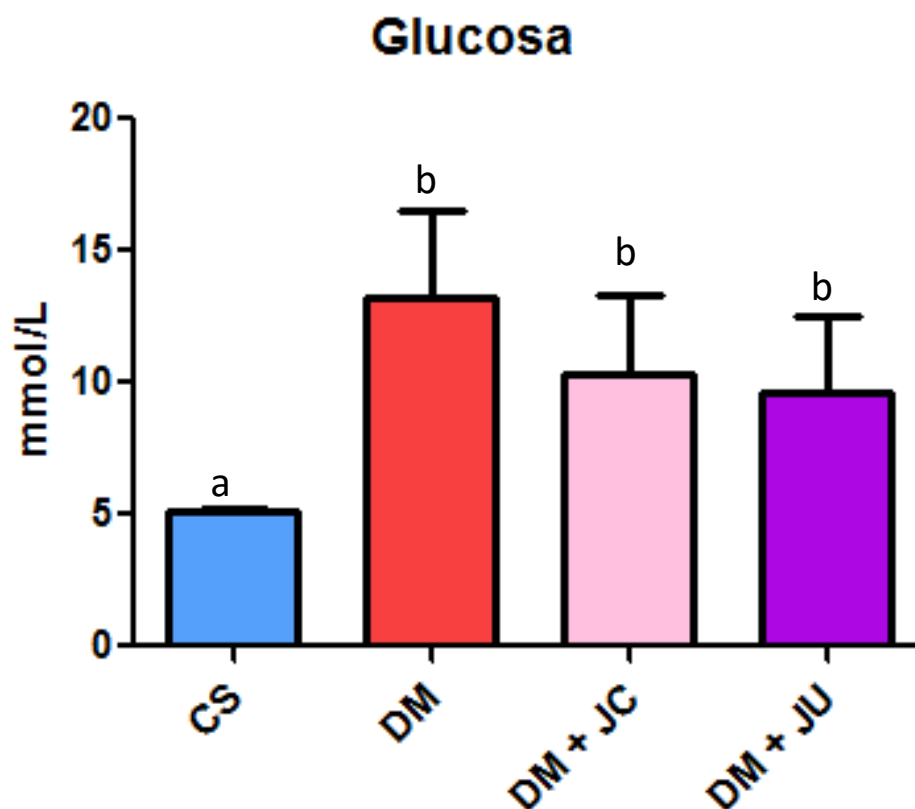


Figura 31. Niveles de glucosa plasmática en ratas. CS= Control sano; DM=Diabetes; DM+JC= Diabetes con tratamiento con jugo comercial; DM+JU= Diabetes con tratamiento con jugo con ultrasonido

A las ratas del experimento se les midió el nivel de glucosa plasmática (Figura 31). Los tres grupos con diabetes inducida mostraron diferencias significativas con respecto al grupo de control sano ($p=0.0067$), sin embargo no hubo diferencias entre los grupos de control diabético y los que recibieron tanto jugo comercial como el jugo de frutos rojos procesado con ultrasonido ($p>0.05$).

Pese a que no se observa una disminución de la glucemia plasmática de los grupos diabéticos con tratamientos en comparación con el grupo de control con diabetes, se puede ver que tampoco existió un incremento de estas cifras secundario a la administración de los jugos, a pesar de su alto contenido de azúcar. Es posible que de haberse prolongado el período de experimentación se hubiera observado un efecto hipoglucemiante.

Algunos estudios (Bahadoran *et al*, 2013; Hokayem *et al*, 2013; Pandey *et al*, 2014) sugieren que los compuestos fenólicos, especialmente antocianinas presentes en algunos frutos, incluidos los usados en el presente trabajo, tienen una acción hipoglucemiante al ser consumidos por pacientes diabéticos. Dicho efecto parece contrarrestar el elevado contenido de azúcares presentes en el producto y evitar que éstos induzcan un incremento en los niveles de glucosa. Este es uno de los principios responsables de la llamada “paradoja francesa”, fenómeno observado en ese país, donde el consumo de dietas con elevado contenido de lípidos y carbohidratos no tienen un alto impacto en la incidencia de obesidad y diabetes debido a la alta ingesta de compuestos fenólicos entre la población (Pandey *et al*, 2014)

7.6.4 Perfil de lípidos (triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL)

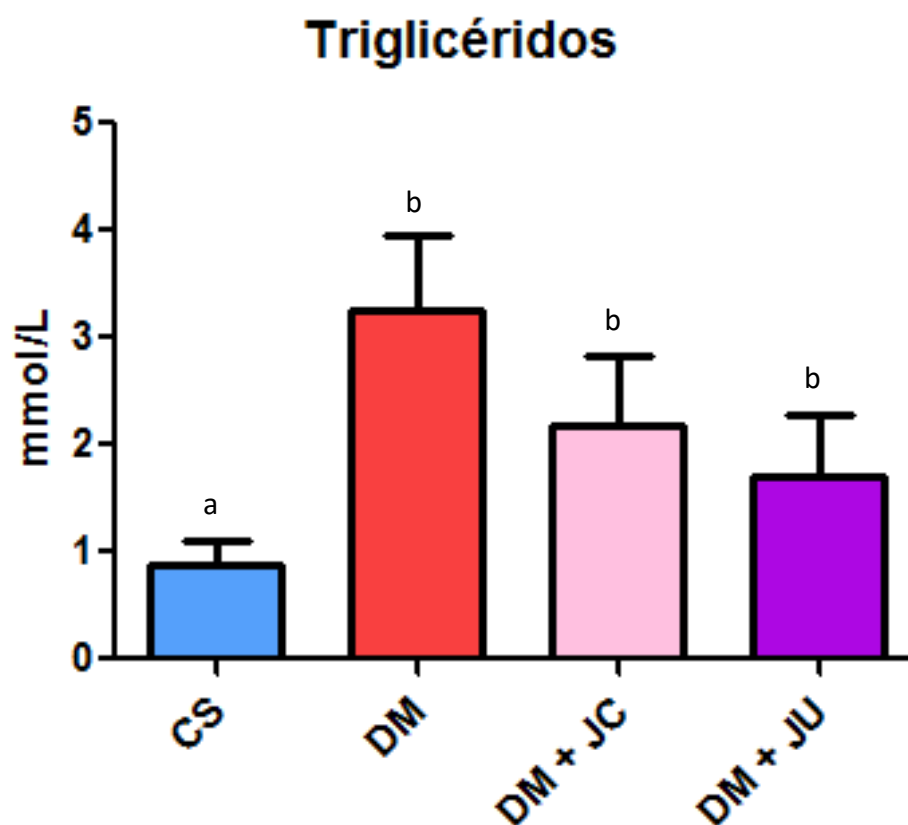


Figura 32. Niveles de triglicéridos en ratas. CS= Control sano; DM=Diabetes; DM+JC= Diabetes con tratamiento con jugo comercial; DM+JU= Diabetes con tratamiento con jugo con ultrasonido

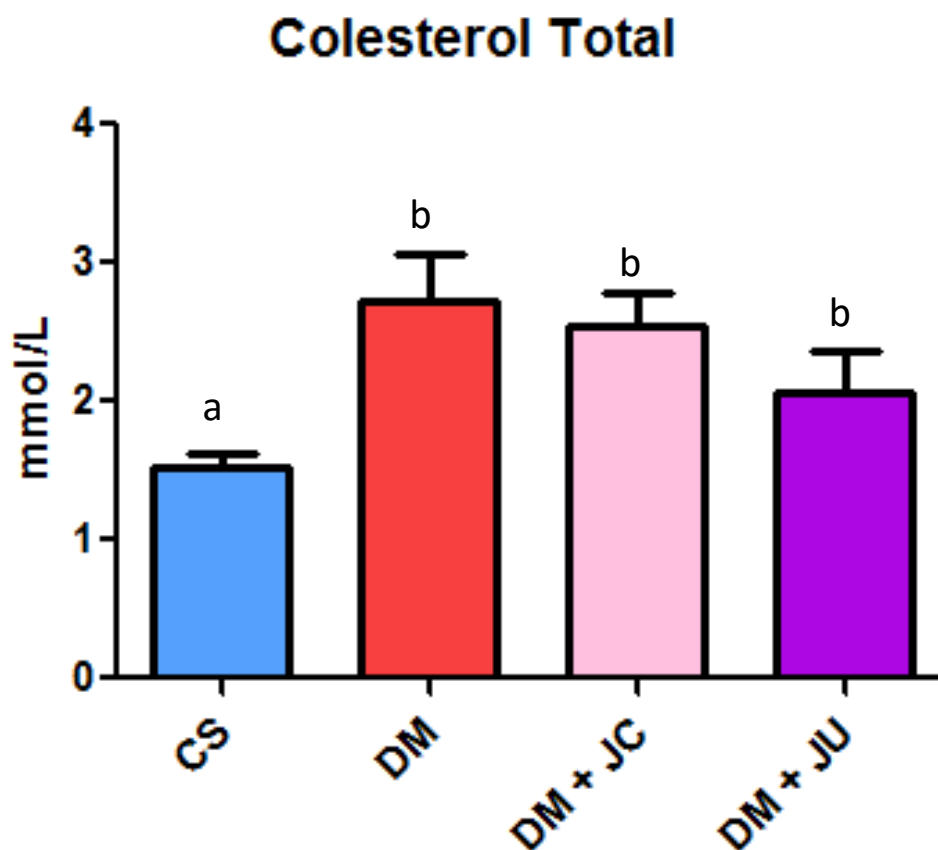


Figura 33. Niveles de colesterol total en ratas. CS= Control sano; DM=Diabetes; DM+JC= Diabetes con tratamiento con jugo comercial; DM+JU= Diabetes con tratamiento con jugo con ultrasonido

Se determinaron las cifras de triglicéridos y colesterol total en plasma en los cuatro grupos experimentales (Figuras 32 y 33). Al igual que en el caso de la glucosa, hay diferencias significativas únicamente entre el grupo de control sano y los tres grupos con diabetes inducida ($p=0.0218$), pero no existe diferencia entre los grupos a los que se les indujo diabetes ($p<0.05$). De la misma forma, para el colesterol sólo hubo diferencia entre el primer grupo y el resto ($p=0.0036$). Los tratamientos con jugos, tanto comercial como procesado con ultrasonido, no mostraron tener un efecto en el descenso de los niveles de triglicéridos y de colesterol en sangre, aunque tampoco se observa un incremento de éstos con respecto al control enfermo.

Autores como Jayaprakasam *et al* (2006) han encontrado una asociación directa entre el consumo de antocianinas y la regulación de los triglicéridos y del colesterol debido a su acción reguladora en el metabolismo lipídico.

Por otra parte, se analizaron los nivel de colesterol HDL y LDL, en los cuales no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos ($p=0.8704$ y $p=0.5264$ respectivamente) (Figuras 34 y 35).

El tiempo de experimentación corto también pudo haber influido en estos parámetros, ya que está demostrado que las antocianinas contribuyen a disminuir el colesterol LDL, cuyo incremento está altamente relacionado con la aparición de enfermedades cardiovasculares, y a elevar la concentración de colesterol HDL, que, por el contrario, se le reconoce como un factor protector frente al mismo tipo de padecimientos (Qin *et al*, 2009).

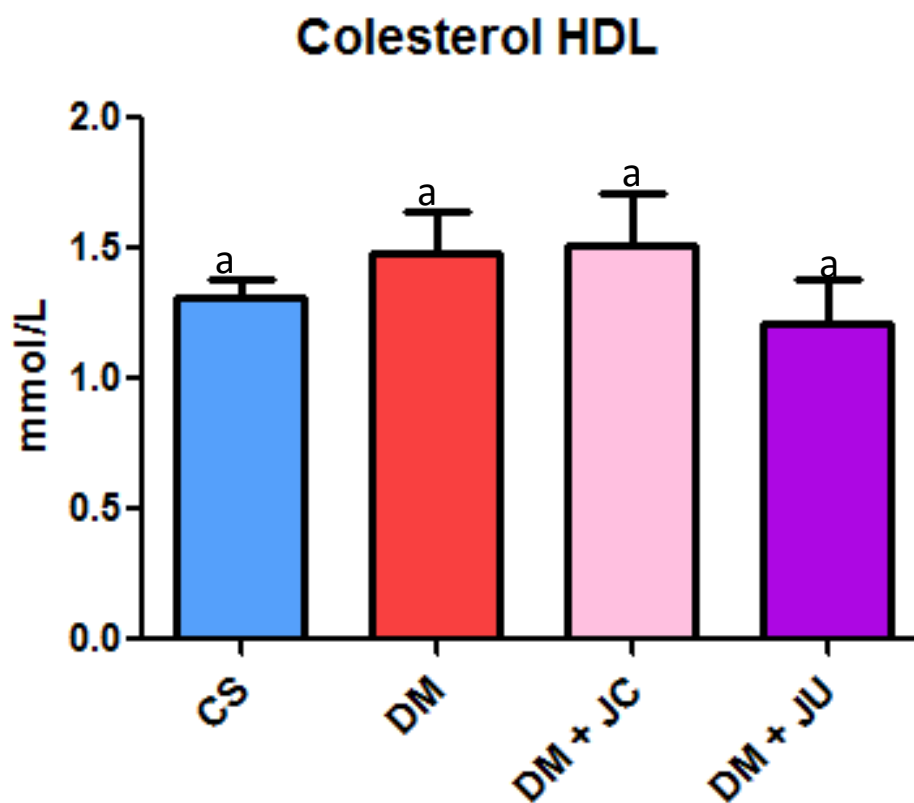


Figura 34. Niveles de colesterol HDL en ratas. CS= Control sano; DM=Diabetes; DM+JC= Diabetes con tratamiento con jugo comercial; DM+JU= Diabetes con tratamiento con jugo con ultrasonido.

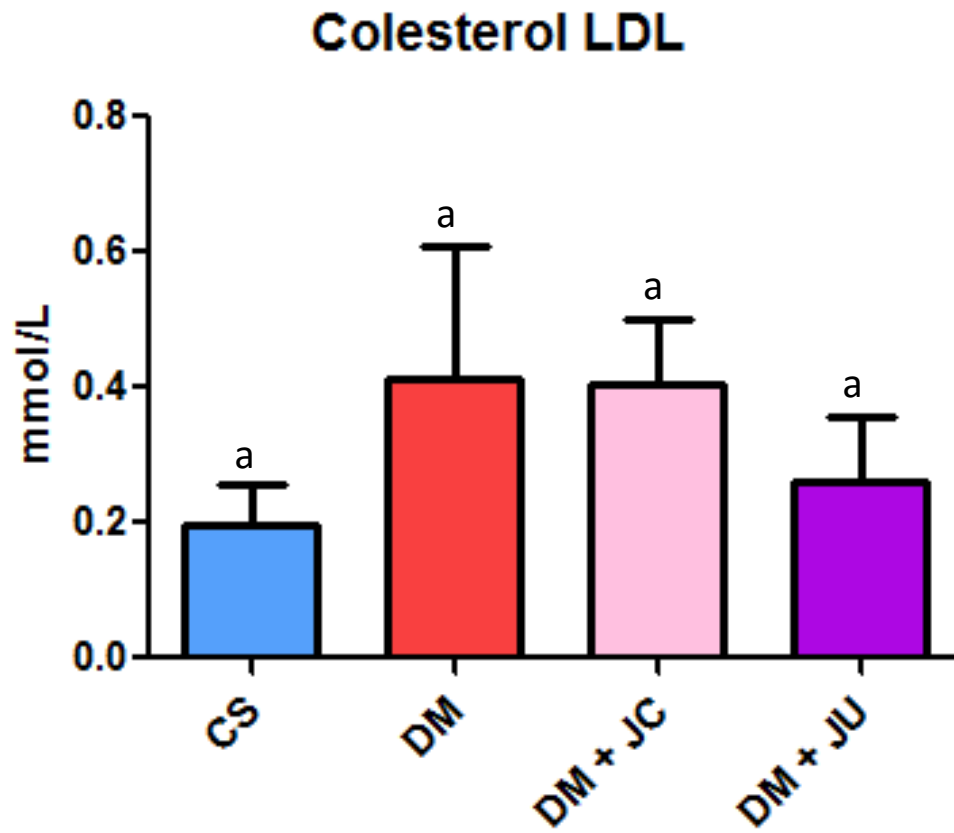


Figura 35. Niveles de colesterol LDL en ratas. CS= Control sano; DM=Diabetes; DM+JC= Diabetes con tratamiento con jugo comercial; DM+JU= Diabetes con tratamiento con jugo con ultrasonido.

7.6.5 Peso de tejido adiposo abdominal, epididimal y pericárdico

	Abdominal	Epididimal	Pericárdico
Control Sano	8.54 ^a	6.64 ^a	0.45 ^a
Control Enfermo	11.68 ^a	9.41 ^a	0.51 ^a
Jugo Comercial	13.22 ^a	10.27 ^a	0.39 ^a
Jugo Ultrasonido	10.19 ^a	8.76 ^a	0.55 ^a

Cuadro 6. Peso de tejido adiposo abdominal, epididimal y pericárdico

Posterior al sacrificio de las ratas, se extrajeron algunos de los órganos, los cuales fueron pesados para conocer las diferencias entre cada uno de los grupos experimentales y si éstas eran atribuibles a alguna de las condiciones en particular.

En el caso de los tejidos adiposos abdominal, epididimal y pericárdico (Cuadro 6), no hubo diferencia significativa entre ninguno de los grupos ($p=0.2152$; $p=0.2558$; $p=0.3205$ respectivamente).

Seymour *et al* (2011) han descrito que existe una tendencia a la disminución de adiposidad cuando son suministradas antocianinas, ya que estos compuestos regulan el metabolismo lipídico, incluido su almacenamiento en los adipocitos.

7.6.6 Peso de órganos

	Corazón	Riñones	Hígado	Páncreas
Control Sano	0.94 ^a	2.19 ^a	9.74 ^a	1.14 ^a
Control Enfermo	0.92 ^a	2.39 ^a	13.63 ^b	0.62 ^b
Jugo Comercial	0.93 ^a	2.15 ^a	13.51 ^b	0.64 ^b
Jugo Ultrasonido	0.92 ^a	2.29 ^a	13.48 ^b	0.64 ^b

Cuadro 7. Peso de corazón, riñones, hígado y páncreas

	Testículos	Bazo	Glándulas Adrenales	Pulmones
Control Sano	5.36 ^a	0.63 ^a	0.06 ^a	1.65 ^a
Control Enfermo	5.23 ^a	0.51 ^a	0.07 ^a	1.5 ^a
Jugo Comercial	4.89 ^a	0.54 ^a	0.06 ^a	1.72 ^a
Jugo Ultrasonido	4.67 ^a	0.58 ^a	0.07 ^a	1.52 ^a

Cuadro 8. Peso de testículos, bazo, glándulas adrenales y pulmones

Se encontraron cambios significativos únicamente en dos órganos: el hígado ($p=0.0358$) y el páncreas ($p=0.0123$) (Cuadro 7).

El peso del hígado fue un 39% mayor en los grupos a los que se les indujo la diabetes, es decir, en el grupo de control enfermo, el que recibió jugo comercial y el de jugo procesado con ultrasonido. Este incremento en masa puede explicarse debido a

una condición muy común en la diabetes llamada esteatosis o hígado graso (Figura 43), la cual consiste en la deposición de grasa en este órgano y está relacionada con la condición de resistencia a la insulina (Valenti *et al*, 2013). Esto puede complicarse con el paso del tiempo y evolucionar a cirrosis o incluso carcinoma (Bugianesi *et al*, 2002). Esta acumulación lipídica es mayor al 5% del peso del hígado y provoca un desequilibrio entre la deposición de triglicéridos, la oxidación y la síntesis de lipoproteínas (Cohen *et al*, 2011).

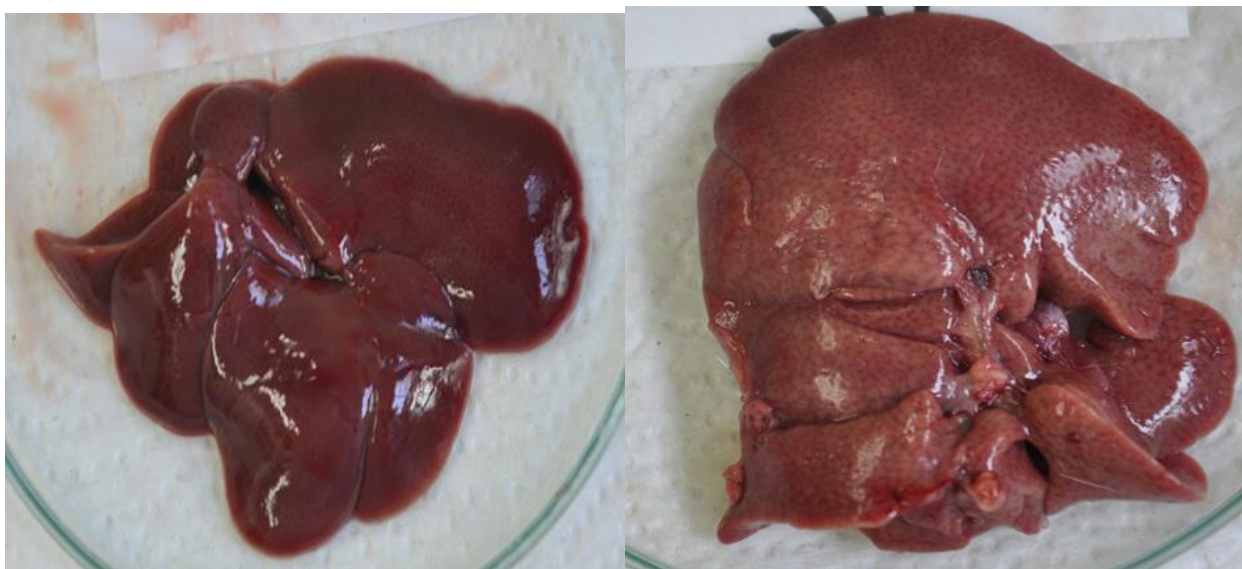


Figura 36. Comparación entre un hígado de rata sano (izquierda) y uno graso (derecha).

Por otra parte, se observó una disminución significativa del peso del páncreas en los grupos con diabetes inducida con respecto al control sano. Esta disminución se debe a que estos grupos de ratas recibieron la administración por vía intraperitoneal de estreptozotocina, la cual es un agente químico que reduce la funcionalidad pancreática y además produce necrosis en este órgano (Szkudelski, 2001).

El peso del páncreas disminuyó en promedio un 55% de su masa, lo cual, según datos de Skovsø (2014), corresponde al equivalente humano de diabetes mellitus tipo 2 con más de 15 años de evolución. Cabe señalar que dicha cifra no rebasa el 60% de

daño que es el mínimo producido en la diabetes tipo 1, hecho que apoya la efectividad del modelo empleado para la inducción específica de diabetes tipo 2.

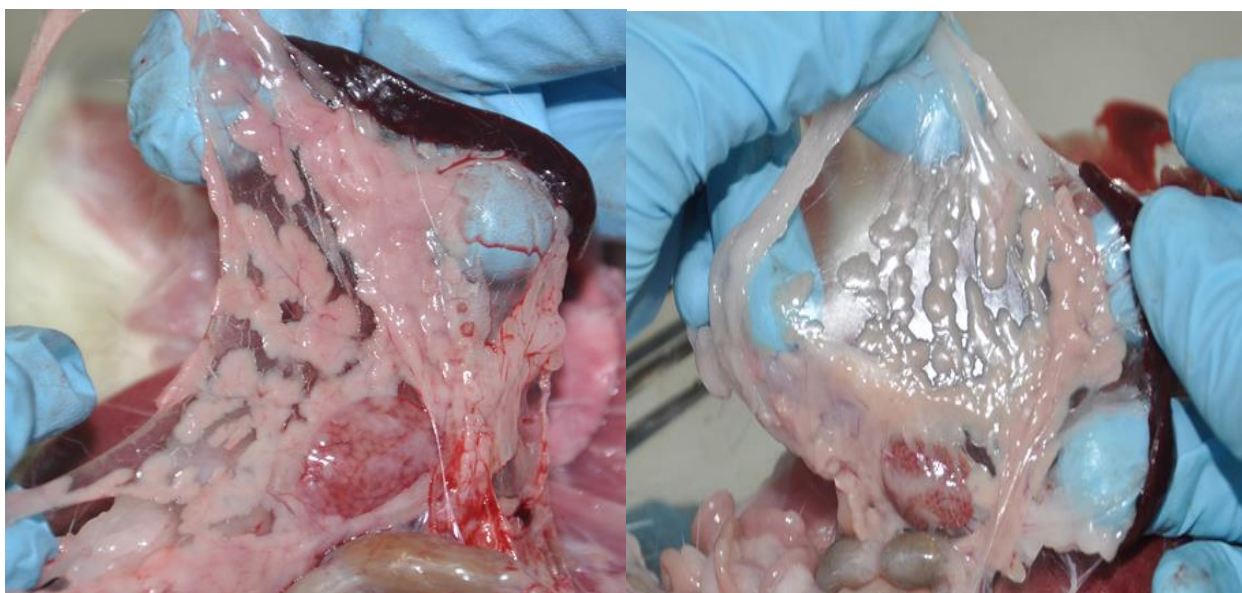


Figura 37. Comparación entre un páncreas de rata sano (izquierda) y uno diabético (derecha).

CONCLUSIONES

- El procesamiento con ultrasonido permite una mejor conservación de los compuestos fenólicos, ya que no se observó degradación de polifenoles ni de antocianinas.
- El ultrasonido puede mejorar la extracción de algunos compuestos en los alimentos. En este trabajo hubo incremento del 12% de polifenoles de la uva y un 9.18% de aumento en las antocianinas monoméricas de la zarzamora.
- La microscopía electrónica sugiere que el fenómeno de cavitación originado por el tratamiento con ultrasonido produce microperforaciones y otros efectos sobre

la matriz alimentaria, lo que permiten la extracción de agua y de compuestos con actividad biológica.

- La administración del jugo de frutos rojos y uva procesado con ultrasonido no produjo un incremento en los niveles de glucosa, triglicéridos ni colesterol durante el tiempo de experimentación. Sin embargo no hubo una disminución de los parámetros bioquímicos.
- La elevada hiperglucemia que presentaban las ratas así como el corto tiempo de experimentación pudieron ser los factores predominantes por los que no se lograron observar los efectos benéficos que varios autores han reportado que poseen las antocianinas en la diabetes mellitus tipo 2.

REFERENCIAS

- Ahrén, B. (2005).** Type 2 diabetes, insulin secretion and β -cell mass. *Current Molecular Medicine*, 5, 275–286.
- Badui Dergal, S. (2006).** *Química de los alimentos*. México: Pearson.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., & Azizi, F. (2013).** Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord*, 12(1), 43.
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M. A., & Bertelli, D. (2004).** Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *Journal of Food Science*, 69(3), FCT164-FCT169.
- Buřičová, L., Andjelkovic, M., Čermáková, A., Réblová, Z., Jurček, O., Kolehmainen, E., ... & Kvasnička, F. (2011).** Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, blackberry, and raspberry leaves. *Czech J. Food Sci*, 29(2), 181-189.
- Cornejo, J., Jiménez, A., Meckes M., Rojas, G., Nicasio, P., Tortoriello, J., said, S., Mata, B. (2006).** Pharmacological potential from Rubus liebmanii micro-propagated and the callus biomass. *Pharmacologyonline* 3:454-461.
- Cárcel, J. A., García-Pérez, J. V., Benedito, J., & Mulet, A. (2012).** Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 200-207.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. D. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009).** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.
- Chacón, Luis E. (2011).** Aplicación de tecnologías alternativas para el procesamiento de jugos de fruta. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Ciencia Cierta No.27.
- Chemat, F., & Khan, M. K. (2011).** Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, G., Hu, X., Wu, J., Wang, Z. (2007)** Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of

anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, *Ultrason. Sonochem.* 14 (2007) 767–778.

Cheng, L. H., Soh, C. Y., Liew, S. C., & Teh, F. F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chemistry*, 104, 1396–1401.

Clifford, M.N. (2000). Anthocyanins- nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Food Science and Agriculture* 80: 1063-1072.

Cohen, J. C., Horton, J. D., Hobbs, H. H. (2011). “Human fatty liver disease: old questions and new insights,” *Science*, vol. 332, no. 6037, pp. 1519–1523

Collado, Jacinta. (2011). Identificación de polifenoles en zumos de frutas rojas. Máster en Ingeniería Ambiental y de Procesos Químicos y Biotecnológicos. Universidad Politécnica de Cartagena. Colombia.

Coronel, Y., & Stalynn, R. (2015). Rendimiento de tres variedades de fresa (*Fragaria vesca* L) bajo dos tipos de cobertura de suelos en sistemas de microtúneles.

Costa, M. G. M., Fonteles, T. V., de Jesus, A. L. T., Almeida, F. D. L., de Miranda, M. R. A., Fernandes, F. A. N., & Rodrigues, S. (2013). High-intensity ultrasound processing of pineapple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 997-1006.

Cruz, B. (2013). Actividad biológica de los extractos etanólicos de dos especies de zarzamora en *Artemia franciscana* Kellogg 1906. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México.

Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2010). Química de alimentos de Fennema. Artmed.

De la Fuente, S., Riera, E., Acosta, V.M., Blanco, A., Gallego-Juárez, J.A. (2006). Food drying process by power ultrasound. *Ultrasonics* 44, e523–e527

Del Valle, Graciela; González, Alberto; Báez, Reginaldo. (2005). Antocianinas en uva (*vitis vinífera* L.) y su relación con el color. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 28, número 004. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. México.

Edirisinghe, I., Banaszewski, K., Cappozzo, J., Sandhya, K., Ellis, C. L., Tadapaneni, R., ... & Burton-Freeman, B. M. (2011). Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin. *British journal of nutrition*, 106(06), 913-922.

- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2002).** Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine reviews*, 23(5), 599-622.
- Feshani, A. M., Kouhsar, S. M., & Mohammadi, S. (2011).** Vaccinium arctostaphylos, a common herbal medicine in Iran: molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxan-diabetic Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 67–74.
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2014).** Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of functional foods*, 7, 54-66.
- Fox, B. A., & Cameron, A. G. (1999).** *Ciencia de los alimentos, nutrición y salud*. Limusa.
- García, J. R. (2011).** Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México.
- Garzón, Astrid G. (2008).** Anthocyanins as Natural Colorants and Bioactive Compounds. A Review. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. AA 14490 Bogotá, Colombia.
- Ghafoor, K. A. S. H. I. F., Al-Juhaimi, F., & Choi, Y. H. (2011).** Effects of grape (*Vitis labrusca* B.) peel and seed extracts on phenolics, antioxidants and anthocyanins in grape juice. *Pakistan Journal of Botany*, 43(3), 1581-1586.
- González, G. (2008).** Aplicaciones del ultrasonido para la estabilización de sistemas alimentarios. Programa de Ingeniería de Producción Agroindustrial. Facultad de Ingeniería, Universidad de La Sabana. Campus Universitario del Puente del Común, Km. 21 Autopista Norte. Chía, Cundinamarca, Colombia.
- Guo, H., Ling, W., Liu, C., Hu, Y., Xia, M., Feng, X., & Xia, X. (2007).** Effect of anthocyaninrich extract from black rice (*Oryza sativa* L. indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62, 1–6.
- Guo, Z., Zheng, C., Qin, Z., & Wei, P. (2011).** Effect of telmisartan on the expression of cardiac adiponectin and its receptor 1 in type 2 diabetic rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(1), 87-94.
- Hager, T. J., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2008).** Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of

processed blackberry products, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(3), 689-695

Haminiuk, C. W., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits—an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023-2044.

Helrich, K. Official Methods of Analysis of the AOAC, 1990. Association of the Official Analytical Chemists.

Hernández, G. B. (2014). Aplicación de tecnologías emergentes para elaborar un jugo rico en antioxidantes naturales a partir de uva y frutos rojos.

Hokayem, M., Blond, E., Vidal, H., Lambert, K., Meugnier, E., Feillet-Coudray, C., ... & Sauvinet, V. (2013). Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes care*, 36(6), 1454-1461.

Iglesias, J. (2009). Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca. Tesis de doctorado. Dirección de Química analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Química. Universidad de Santiago de Compostela.

Jayaprakasam, B., Olson, L. K., Schutzki, R. E., Tai, M. H., & Nair, M. G. (2006). Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(1), 243-248.

Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933.

Koolman, J., & Röhm, K. H. (2004). Bioquímica: texto y atlas. Ed. Médica Panamericana.

Kuldiloke, J. (2002). Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices. Dissertation der Technischen Universität Berlin.

Le Roith, D., & Zick, Y. (2001). Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes care*, 24(3), 588-597.

- León López, L., Guzmán-Ortíz, D. L. A., García Berumen, J. A., Chávez Marmolejo, C. G., & Peña-Cabriales, J. J. (2014).** Consideraciones para mejorar la competitividad de la región " El Bajío" en la producción nacional de fresa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(4), 673-686.
- Liu, Y., Jin, Q., Shan, L., Liu, Y., Shen, W., & Wang, X. (2008).** The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 402–407
- López, I. (2009).** Identificación, dinámica poblacional y parasitoides de dos lepidópteros plaga de zarzamora, *Rubus fruitcosus* L., en tres regiones productoras del estado de Michoacán. Tesis de Licenciatura en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.
- Mason T. J. 1990.** A survey of commercially available sources of ultrasound suitable for sonochemistry. In *Sonochemistry: The Uses of Ultrasound in Chemistry*, Mason, T.J., (Ed.), The Royal Society of Chemistry: Cambridge, pp. 60–68.
- Mason, T. J., Lorimer, J. P., Baters, D. M., & Zhao, Y. (1994).** Dosimetry in sonochemistry: the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1, 91–95
- Mason, T.J., 1998.** Power ultrasound in food processing. The way forward. In: Povey, M.J.W., Mason, T.J. (Eds.), *Ultrasound in Food Processing*. Chapman & Hall, London, pp. 105–126.
- Mazza G., Miniati E. 1993.** Anthocyanins in fruits, vegetables and grains, CRC Press.
- McDougall, G. J., & Stewart, D. (2005).** The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *BioFactors*, 23, 189–195.
- Márquez, G. (2011).** Capacidad antioxidante y caracterización estructural de las antocianinas de los frutos rojos de *Prunus doméstica* L., *Ficus carica* L. y *Vitisvinífera* L. c.v. "red globe" cultivados en Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Escuela de Postgrado. Lima, Perú.
- Martineau, L. C., Couture, A., Spoor, S., Benhaddou-Andaloussi, A., Harris, C., Meddah, B., Leduc, C., Burt, A., Vuong, T., Le, P. M., Prentki, M., Bennett, S. A., Arnason, J. T., & Haddad, P. S. (2006).** Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine*, 13, 612–623.

- Martínez, M.A. (2005).** Flavonoids. Tesis doctoral en la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquía, Colombia.
- Mathews C, K van Holde, & K Ahern. (2002).** Bioquímica. 3ra. Edición. Madrid: Adison Wesley Pearson Education.
- Mendivil Anaya, C. O., & Sierra Ariza, I. D. (2005).** Acción insulínica y resistencia a la insulina: aspectos moleculares. *Rev. Fac. Med.(Bogotá)*, 53(4), 235-243.
- Mori, K., Sugaya, S., Gemma, H. (2005).** Decreased Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Química de alimentos*. 47:4009-4017.
- Nizamutdinova, I. T., Jin, Y. C., Chung, J., Shin, S. C., Lee, S. J., Seo, H. G., Lee, J. H., Chang, K. C., & Kim, H. J. (2009).** The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 1419–1429.
- O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010).** Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 358–367.
- Ojeda, Hernán. (2007).** Los compuestos fenólicos de la uva. Ing. Agr., M.S., Dr. Técnico de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza del INTA Mendoza, Argentina (1993-2003). Actualmente en INRA UnitéExpérimentale de Pech Rouge, 11430 Gruissan, Francia. *Revista Enología* no. 4. Año IV septiembre-octubre.
- Olivares, R. J. A., & Arellano, P. A. (2008).** Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev Educ Bioquím UNAM*, 27, 9-18.
- Organización Mundial de la Salud. (2012).** Diabetes. Temas de Salud. Disponible en línea en http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/ (consultado el 5 de junio de 2014).
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2014).** Role of red grape polyphenols as antidiabetic agents. *Integrative Medicine Research*, 3(3), 119-125.
- Petti, S., & Scully, C. (2009).** Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of dentistry*, 37(6), 413-423.

- Qin, Y., Xia, M., Ma, J., Hao, Y., Liu, J., Mou, H., ... & Ling, W. (2009).** Anthocyanin supplementation improves serum LDL-and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *The American journal of clinical nutrition*, 90(3), 485-492.
- Quiñonez, M., Miguel, M., Aleixandre, A. (2012).** Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Instituto de Investigación en Ciencias de Alimentación (CIAL, CSIC-UAM). *Nutrición Hospitalaria*. 27:76-89. Madrid, España.
- Rangkadilok, N., Worasuttayangkurn, L., Bennett, R. N., & Satayavivad, J. (2005),** Identification and quantification of polyphenolic compounds in longan (*Euphoria longana* Lam.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1387-1392
- Reed, M. J., Meszaros, K., Entes, L. J., Claypool, M. D., Pinkett, J. G., Gadbois, T. M., & Reaven, G. M. (2000).** A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*, 49(11), 1390-1394.
- Rein, M. (2005).** **Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins.** Helsinki: University of Helsinki. pp. 10–14.
- Reyes-Carmona, J., Yousef, G. G., Martínez-Peniche, R. A., & Lila, M. A. (2005).** Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *Journal of food science*, 70(7), s497-s503.
- Roy, M., Sen, S., & Chakraborti, A. S. (2008).** Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: Implication for glycation-induced hemoglobin modification. *Life Sciences*, 82, 1102–1110
- Rzedowski J., Rzedowski G. C. (2005).** Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 135 Rosaceae. Instituto de Ecología A.C. y CONABIO, Morelia, Michoacán, 655-672.
- Sakakibara, M., Wang, D., Takahashi, R., Takahashi, K., & Mori, S. (1996).** Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 444–448.

- Salleh-Mack, S.Z., Roberts, J.S., (2007).** Ultrasound pasteurization: the effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Ultrasonics Sonochemistry* 14: 323–329.
- Sancho, R. A. S., & Pastore, G. M. (2012).** Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Research International*, 46(1), 378-386.
- Santos, F. F., Rodrigues, S., & Fernandes, F. A. (2009).** Optimization of the production of biodiesel from soybean oil by ultrasound assisted methanolysis. *Fuel processing technology*, 90(2), 312-316.
- Santos-Buelga, C., Mateus, N., & De Freitas, V. (2014).** Anthocyanins. Plant pigments and beyond. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(29), 6879-6884.
- Sasaki, R., Nishimura, N., Hoshino, H., Isa, Y., Kadowaki, M., Ichi, T., Tanaka, A., Nishiumi, S., Fukuda, I., Ashida, H., Horio, F., & Tsuda, T. (2007).** Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochemical Pharmacology*, 74, 1619–1627.
- Seymour, E. M., Tanone, I. I., Urcuyo-Llanes, D. E., Lewis, S. K., Kirakosyan, A., Kondoleon, M. G., ... & Bolling, S. F. (2011).** Blueberry intake alters skeletal muscle and adipose tissue peroxisome proliferator-activated receptor activity and reduces insulin resistance in obese rats. *Journal of medicinal food*, 14(12), 1511-1518.
- Siriwoharn, T., & Wrolstad, R. E. (2004).** Polyphenolic composition of Marion and Evergreen blackberries. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE-CHICAGO-*, 69, FCT233-240.
- Skovsø, S. (2014).** Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of diabetes investigation*, 5(4), 349-358.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T. (2005).** Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1), 200-213.
- Soria Saborio, M. B. (2015).** Caracterización fitoquímica de genotipos mexicanos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) (Doctoral dissertation).

- Süntar, I., Koca, U., Keles, H., & Akkol, E. K. (2011).** Wound healing activity of *Rubus sanctus* Schreber (Rosaceae): preclinical study in animal models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Szkudelski, T. (2001).** The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research*, 50(6), 537-546.
- Temple, N. J. (2000).** Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutrition Research* 20:449-459.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2009).** Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *Journal of Food Engineering*, 93(2), 166-171.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., & Cullen, P. J. (2009).** Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3), 700-704.
- Fossen, T., Rayyan, S., & Andersen, Ø. M. (2004).** Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry*, 65(10), 1421-1428.
- Valenti, L., Riso, P., Mazzocchi, A., Porrini, M., Fargion, S., & Agostoni, C. (2013).** Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Veberic, R., Slatnar, A., Bizjak, J., Stampar, F., & Mikulic-Petkovsek, M. (2015).** Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 509-517.
- Virkamäki, A., Ueki, K., & Kahn, C. R. (1999).** Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 103(7), 931-943.
- Bugianesi, E., Leone, N., Vanni, E. (2002)** "Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma," *Gastroenterology*, vol. 123, no. 1, pp. 134-140, 2002.
- Wang, W. D., & Xu, S. Y. (2007).** Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82(3), 271-275.

- White, S. A., James, R. F. L., Swift, S. M., Kimber, R. M., & Nicholson, M. L. (2001).**
Human islet cell transplantation—future prospects. *Diabetic medicine*, 18(2), 78-103.
- Wilson, E. (2010).** Polifenoles: Antioxidantes por excelencia. Profitocoop. Sarmiento 1113 1º A- Buenos Aires, Argentina.
- Zhang, D. L., Gu, L. J., Liu, L., Wang, C. Y., Sun, B. S., Li, Z., & Sung, C. K. (2009).**
Effect of Wnt signaling pathway on wound healing. *Biochemical and biophysical research communications*, 378(2), 149-151.