

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



“ESTUDIO DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE Y ANTIOXIDANTE DE LAS SEMILLAS DE *Punica granatum L.* “Granada” EN DIABETES INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE EN RATAS”

Tesis presentada por la Bachiller:
Hinojosa Vera, Kathleen Fabiola

Para optar por el Título Profesional de:
Químico Farmacéutico

Asesor:
PhD. Villanueva Salas, José Antonio.

Arequipa – Perú

2020

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20190000030997
N° Trámite en Fac. 1792-2019
Fecha 23-08-2019

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: *HINOJOSA VERA, Kathleen Fabiola*

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EFECTO DEL ESTUDIO HIPOGLUCEMIANTE Y ANTIOXIDANTE DE LAS SEMILLAS DE *Punica granatum* L. "Granada" EN DIABETES INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE EN RATAS. AREQUIPA - 2019"

DICTAMINADORES: 1) *Q. F. Fernando Torres Vela* 2) *Mgter. María Elena Guillen Núñez*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad
Atentamente

Firmas :



Fecha *28-08-2019*

ASESOR: *Dr. José Villanueva Salas*

DICTAMEN DEL ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.
Atentamente

Firma



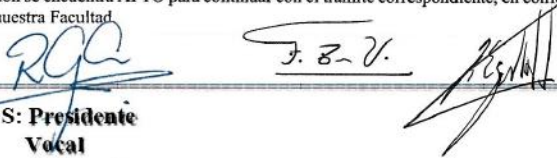
Fecha 19/07/2020

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar*
- 2) *Q. F. Fernando Torres Vela*
- 3) *Mgter. María Elena Guillen Núñez*

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, habiéndose revisado el presente Borrador de Tesis presentado por la recurrente sugerimos se cambie el título a: **"ESTUDIO DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE Y ANTIOXIDANTE DE LAS SEMILLAS DE *Punica granatum* L. "Granada" EN DIABETES INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE EN RATAS"**, luego de lo cual, consideramos que el trabajo de Investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite correspondiente, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad
Atentamente

Firma



Fecha 05/10/2020

JURADOS: **Presidente**
Vocal
Secretario

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha:

Hora:

Local: C- 402 (SUM)

DECANO

DEDICATORIA

Lo que sabemos es una gota, lo que ignoramos es un inmenso océano. La admirable disposición y armonía del universo, no ha podido sino salir del plan de un ser omnisciente y omnipotente.

Isaac Newton (1643-1727)

*Físico, filósofo, teólogo,
inventor, alquimista y
matemático inglés.*

Dedico este trabajo que es muy importante para mí a Dios por ser el pilar y guía de mi vida, sobre todo de mi carrera profesional, por darme fortaleza y perseverancia a lo largo de este camino.

A mis hermanos Katherine (†) y José David, por ser mi fortaleza e inspiración que me impulsa a seguir luchando por cumplir todos mis objetivos y metas trazadas a lo largo de mi vida.

A mis padres, David y Rosario, por su amor, apoyo y confianza puesta en mí.

A mis tíos, Efraín, Mery y Hernán, por la disposición, apoyo incondicional y fe que depositaron en mí para realizar este trabajo.

A mis mejores amigos Marjhory y Kevin, por confiar en mí y ayudarme.

A los Doctores Dario, Sandra y Paula, y mis compañeros de laboratorio Cristofer, Soledad y Florencia; por permitirme conocerlos y brindarme el cariño, confianza, apoyo y motivación en mi etapa profesional que está por empezar.

Y en general a todas las personas que he conocido, por sus enseñanzas, consejos y buenas vibras, me han ayudado a seguir creciendo en todo ámbito como persona.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco incondicionalmente a Dios por la oportunidad que me brinda de ser una buena profesional y persona en mi vida.

Agradezco a mi hermana (†) por siempre estar acompañándome en mis buenos y malos momentos y no dejar que me rindiera. A las personas que me quieren por respaldarme siempre, guiarme y apoyarme a tomar buenas decisiones durante todo este proceso.

Un agradecimiento especial a mi asesor Dr. José Villanueva Salas, por la guía, apoyo incondicional y confianza durante el desarrollo del trabajo, a las Doctoras Julitza Paredes y Jeaneth Medina por su apoyo y ayuda brindada.

A los señores Carlos Callo y César Munive, por brindarme apoyo con materiales y reactivos facilitando mi trabajo en los laboratorios.

Al señor José Aita, encargado del Bioterio de la UCSM por la guía, sugerencias y disponibilidad durante el desarrollo de la tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xvi
GLOSARIO.....	xviii
RESUMEN	xx
ABSTRACT	xxiii
INTRODUCCIÓN.....	xxvi
HIPÓTESIS.....	xxviii
OBJETIVOS	xxix
OBJETIVO GENERAL	xxix
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xxix
CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1. <i>Punica granatum</i> L. “Granada”	1
1.1. Estudio Botánico	1
1.2. Clasificación de la Especie.....	2
1.3. Hábitat	2
1.4. Composición Química.....	3
1.5. Propiedades Farmacológicas	5
2. <i>Diabetes Mellitus</i>	6
2.1. Definición.....	6
2.2. Clasificación.....	7
2.2.1. Diabetes Mellitus Tipo 1.....	7
2.2.2. Diabetes Mellitus Tipo 2.....	8
2.2.3. Diabetes Mellitus Gestacional	9

2.2.4.	Otros tipos específicos	9
2.3.	Síntomas	10
2.4.	Diagnóstico.....	10
2.5.	Factores de Riesgo	12
2.6.	Complicaciones	12
2.7.	Tratamiento	14
2.7.1.	Tratamiento No Farmacológico	14
2.7.2.	Tratamiento Farmacológico.....	14
3.	Páncreas	18
3.1.	Páncreas Exocrino	19
3.1.1.	Células acinares	19
3.1.2.	Células centrocinareas	19
3.2.	Páncreas Endocrino	19
3.2.1.	Células Beta (β)	20
3.2.2.	Células Alfa (α).....	22
3.2.3.	Células Delta (δ)	24
3.2.4.	Células Polipéptido Pancreático (PP o F).....	25
3.2.5.	Células Épsilon (ϵ).....	25
4.	Radicales Libres y Estrés Oxidativo	26
4.1.	Radicales Libres	26
4.2.	Estrés Oxidativo	27
4.3.	Antioxidantes	28
4.3.1.	Antioxidantes enzimáticos	29
4.3.2.	Antioxidantes no enzimáticos.....	29
4.3.3.	Vitamina E	30
4.4.	Estrés oxidativo en el desarrollo de Diabetes.....	31
4.4.1.	Estrés oxidativo en Diabetes Mellitus Tipo 1	32

4.4.2.	Estrés oxidativo en Diabetes Mellitus Tipo 2	33
4.4.3.	Vitamina E y Diabetes	34
5.	Diabetes Experimental	36
5.1.	Estreptozotocina (STZ)	37
5.1.1.	Definición	37
5.1.2.	Origen y características fisicoquímicas	37
5.1.3.	Mecanismo de acción.....	38
CAPÍTULO II	39
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1.	Lugar de la investigación	39
2.	Materiales	39
2.1.	Material Vegetal.....	39
2.2.	Material Biológico.....	39
2.3.	Equipos de Laboratorio	39
2.4.	Materiales de Laboratorio	40
2.5.	Material Anexo.....	40
2.6.	Tratamientos y Fármacos	41
2.7.	Reactivos de Laboratorio	41
3.	Métodos	42
3.1.	Tratamiento del Material Vegetal	42
3.1.1.	Recolección, Selección y Obtención de la Muestra.....	42
3.1.2.	Método de Estabilización - Dsecación.....	43
3.1.3.	Método de Trituración	44
3.2.	Obtención del Extracto de <i>Punica granatum L.</i> “Granada” con Diferentes Solventes.....	44
3.2.1.	Método de Extracción Continua: Equipo de Soxhlet.....	44
3.2.2.	Obtención del extracto seco: Evaporación del solvente	45

3.3.	Rendimiento de los Extractos	47
3.3.1.	Método Gravimétrico.....	47
3.4.	Análisis Fitoquímico	47
3.4.1.	Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	48
3.4.2.	Método Cromatográfico.....	49
3.5.	Determinación del contenido de Ácidos Grasos	53
3.5.1.	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) .	53
3.5.2.	Método cromatográfico.....	55
3.6.	Métodos Biológicos	56
3.6.1.	Etapas de ambientación y alimentación de animales	56
3.6.2.	Diseño experimental: grupos de investigación	57
3.6.3.	Inducción de Diabetes experimental por Estreptozotocina.....	59
3.6.4.	Elaboración y dosificación de tratamientos	60
3.6.5.	Obtención de la muestra sanguínea	60
3.6.6.	Medición de la glicemia.....	61
3.7.	Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo de DPPH	62
3.7.1.	Fundamento	62
3.7.2.	Preparación de las soluciones stock del radical DPPH y Trolox.....	63
3.7.3.	Curva de calibración	63
3.7.4.	Preparación de las muestras	64
3.8.	Análisis Estadístico	65
3.8.1.	Análisis de varianza (ANOVA).....	65
3.8.2.	Prueba de Tukey	65
CAPÍTULO III		66
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		66
1.	Obtención de los extractos de semillas de “Granada”	66
1.1.	Características organolépticas de los extractos de semillas de “Granada”	66

1.2.	Rendimiento de los extractos:	67
2.	Análisis Fitoquímico por CCF	68
2.1.	Corrida general	68
2.1.1.	Extracto de etanol	68
2.1.2.	Extracto de acetato de etilo	68
2.1.3.	Extracto de hexano.....	69
2.2.	Identificación de Flavonoides	70
2.3.	Identificación de Taninos	72
2.4.	Identificación de Alcaloides.....	72
2.5.	Identificación de Esteroles y Terpenos	73
2.6.	Resultados del análisis fitoquímico preliminar	75
3.	Determinación del Contenido de Ácidos Grasos	76
4.	Estudio del Efecto Hipoglicemiante	78
4.1.	Prueba Piloto	78
4.2.	Estudio Experimental del Efecto Hipoglicemiante de semillas de “Granada” 81	
4.2.1.	Evaluación del Peso Corporal.....	82
4.2.2.	Análisis Estadístico entre los Grupos Experimentales	83
a.	Evaluación de glucosa basal	83
b.	Evaluación de glucosa Post-STZ – Día 0	84
c.	Evaluación de glucosa Día 3	86
d.	Evaluación de glucosa Día 6	87
e.	Evaluación de glucosa Día 9	89
f.	Evaluación de glucosa Día 12	90
g.	Evaluación de glucosa Día 15	92
h.	Evaluación de glucosa Día 18	93
i.	Evaluación de glucosa Día 21	95

j.	Evaluación de glucosa Día 24	96
k.	Evaluación de glucosa Día 27	98
l.	Evaluación de glucosa Día 30	99
m.	Evaluación de glucosa Post-Tratamiento Día 33.....	101
n.	Evaluación de glucosa Post-Tratamiento Día 36.....	102
o.	Evaluación de glucosa Post-Tratamiento Día 39.....	104
p.	Evaluación de glucosa Post-Tratamiento Día 42.....	105
q.	Evaluación de glucosa Post-Tratamiento Día 45.....	107
4.2.3.	Evaluación del nivel de glucosa promedio durante el periodo de estudio. 110	
4.2.4.	Evaluación del Área Bajo la Curva de los Grupos Experimentales.....	112
5.	Ensayo DPPH: “Determinación de la capacidad antioxidante”	116
5.1.	Elaboración de la Curva de Calibración.....	116
5.2.	Determinación de la concentración de las muestras.....	118
5.3.	Porcentaje de Inhibición de DPPH en función de Trolox	119
5.4.	Porcentaje de inhibición de DPPH de las muestras.....	120
5.5.	Comparación de la Capacidad Antioxidante de las muestras	121
CAPÍTULO IV	125
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	125
1.	Conclusiones.....	125
2.	Recomendaciones	126
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ANEXOS	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Partes de Punica Granatum L. a) rama con hojas y flores; b) flor en sección longitudinal; c) estambre; d) estigma; e) fruto; f) semilla ⁽⁷⁾	1
Figura N° 2. Estructura química de Metformina	16
Figura N° 3. Partes del Páncreas.	18
Figura N° 4. Células constituyentes del Páncreas Exocrino ⁽³⁴⁾	19
Figura N° 5. Fisiología del páncreas e Histología del páncreas endocrino ⁽³⁵⁾	20
Figura N° 6. Estructura de la Insulina ⁽³⁸⁾	21
Figura N° 7. Mecanismo de acción de la Insulina ⁽³⁹⁾	22
Figura N° 8. Estructura del Glucagón.	23
Figura N° 9. Estructura de SS-14 y SS-28 ⁽³⁶⁾	25
Figura N° 10. Estructura de una molécula estable y un radical libre.	26
Figura N° 11. Estructura química de la Vitamina E.	30
Figura N° 12. Estructura química de la Estreptozotocina	37
Figura N° 13. Mecanismo de acción de Estreptozotocina.....	38
Figura N° 14. Proceso de extracción de la semilla de Granada.....	43
Figura N° 15. Semillas extraídas de Punica granatum L. "Granada"	43
Figura N° 16. Semillas de Granada secadas a temperatura ambiente.	43
Figura N° 17. Semilla de Granada triturada.	44
Figura N° 18. Equipo de Extracción por Soxhlet ⁽⁷⁹⁾	45
Figura N° 19. Equipo de Rotavapor.	46
Figura N° 20. Equipo de destilación.....	46
Figura N° 21. Muestras diluidas 1:50 para CCF.	49
Figura N° 22. Elución de la fase móvil en CCF.	51
Figura N° 23. Componentes de GC-MS.....	54
Figura N° 24. Proceso de esterificación de la muestra.	55
Figura N° 25. Reacción de trans-esterificación de ácidos grasos.....	56
Figura N° 26. Análisis de la muestra procesada en GC-MS.	56
Figura N° 27. Estandarización de animales de experimentación.	57
Figura N° 28. Administración de la Solución de STZ por vía IP.....	59
Figura N° 29. Obtención de la muestra sanguínea.	60
Figura N° 30. Glucómetro Accu-Check® Performa Nano.....	61

Figura N° 31. Reacción del radical DPPH.	63
Figura N° 32. Soluciones stock de DPPH y Trolox.	63
Figura N° 33. Soluciones patrón de la curva de calibración de DPPH.	64
Figura N° 34. Extractos de semilla de "Granada" 1. Extracto etanólico 2. Extracto de acetato de etilo 3. Extracto de hexano	66
Figura N° 35. Porcentaje de rendimiento de los extractos de "Granada".	67
Figura N° 36. Cromatofolio de la corrida general de los extractos de "Granada".	69
Figura N° 37. Cromatofolio de flavonoides de los tres extractos.	70
Figura N° 38. Cromatofolio de taninos de los tres extractos.	72
Figura N° 39. Cromatofolio de alcaloides de los tres extractos.	73
Figura N° 40. Cromatofolio de esteroides y terpenos de los tres extractos.	74
Figura N° 41. Cromatograma de GC-MS del aceite de semilla de "Granada"	76
Figura N° 42. Evolución de los niveles de glucosa promedio de los grupos experimentales a dosis 10 mg/Kg.	79
Figura N° 43. Evolución de los niveles de glucosa promedio de los grupos experimentales a dosis 20 mg/Kg.	80
Figura N° 44. Comparación de los tratamientos usados para la "Prueba Piloto".	81
Figura N° 45. Evolución de los pesos (g) promedio de los grupos de experimentación durante el periodo de tratamiento.	83
Figura N° 46. Comparación del nivel de glucosa basal (mg/dL) entre los grupos experimentales.	84
Figura N° 47. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales Post-STZ Día 0.	86
Figura N° 48. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 3.	87
Figura N° 49. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 6.	88
Figura N° 50. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 9.	90
Figura N° 51. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 12.	91
Figura N° 52. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 15.	93

Figura N° 53. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 18.	94
Figura N° 54. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 21.	96
Figura N° 55. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 24.	97
Figura N° 56. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 27.	99
Figura N° 57. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 30.	100
Figura N° 58. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 33.	102
Figura N° 59. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 36.	103
Figura N° 60. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 39.	105
Figura N° 61. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 42.	107
Figura N° 62. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 45.	108
Figura N° 63. Análisis estadístico de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales por día de toma de muestra.	109
Figura N° 64. Comparación de los niveles de glucosa promedio de los grupos de estudio durante 45 días de monitoreo.	112
Figura N° 65. Comparación de área bajo la curva (AUC) de los grupos experimentales.	113
Figura N° 66. Área bajo la curva (AUC) de los diferentes tratamientos en relación al tiempo de estudio.	114
Figura N° 67. Estándares de trolox tratados con DPPH.	116
Figura N° 68. Curva de calibración de método DPPH.	117
Figura N° 69. Datos de las muestras interpoladas en la curva de calibración.	118
Figura N° 70. Curva de calibración de porcentaje de inhibición de DPPH.	120
Figura N° 71. Porcentaje de inhibición de DPPH de las muestras en la curva.	121
Figura N° 72. Comparación de porcentaje de inhibición de las muestras.	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie	2
Tabla 2. Lista de compuestos identificados en <i>Punica granatum</i> L ⁽¹⁰⁾	4
Tabla 3. Resultados de Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa	11
Tabla 4. Ejemplos de Radicales Libres ⁽⁴⁵⁾	27
Tabla 5. Cantidades de muestra y solvente para la dilución 1:50	50
Tabla 6. Fases móviles empleadas para identificación de metabolitos ⁽⁸⁴⁾	50
Tabla 7. Formación de grupos para la prueba Piloto	58
Tabla 8. Formación de grupos para la prueba Experimental	59
Tabla 9. Preparación de la curva de calibración DPPH	64
Tabla 10. Preparación de las muestras para determinación de la actividad antioxidante por DPPH	65
Tabla 11. Características organolépticas de los extractos.	66
Tabla 12. Rendimiento de los extractos de <i>Punica granatum</i> L. "Granada"	67
Tabla 13. Rf de los flavonoides y color de fluorescencia	71
Tabla 14. Rf de los esteroides-terpenos y su coloración.	74
Tabla 15. Resultados del análisis fitoquímico preliminar.	75
Tabla 16. Determinación cuantitativa de AG en la semilla de Granada	77
Tabla 17. Evolución de los niveles de glucosa promedio del Grupo Control (+).	78
Tabla 18. Evolución de los niveles de glucosa promedio de los grupos experimentales a dosis 10 mg/Kg.	79
Tabla 19. Evolución de los niveles de glucosa promedio de los grupos experimentales a dosis 20 mg/Kg.	80
Tabla 20. Pesos (g) promedio de los animales de los grupos de experimentación durante el periodo de tratamiento.	82
Tabla 21. Comparación del nivel de glucosa basal (mg/dL) entre los grupos experimentales	84
Tabla 22. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales Post-STZ Día 0.	85
Tabla 23. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 3.	86

Tabla 24. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 6.....	88
Tabla 25. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 9.....	89
Tabla 26. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 12.....	91
Tabla 27. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 15.....	92
Tabla 28. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 18.....	94
Tabla 29. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 21.....	95
Tabla 30. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 24.....	97
Tabla 31. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 27.....	98
Tabla 32. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 30.....	100
Tabla 33. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 33.....	101
Tabla 34. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 36.....	103
Tabla 35. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 39.....	104
Tabla 36. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 42.....	106
Tabla 37. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 45.....	108
Tabla 38. Niveles de glucosa promedio de los grupos de estudio durante 45 días de monitoreo.....	111
Tabla 39. Comparación de área bajo la curva (AUC) de los grupos experimentales.....	113
Tabla 40. Calibración del método DPPH.....	117
Tabla 41. Concentración de extractos de semilla de "Granada" y vitamina E en μM TE por el método DPPH.....	118

Tabla 42. Concentración en μM ET de los extractos de "Granada" y vitamina E.	119
Tabla 43. Porcentaje de inhibición de DPPH.	119
Tabla 44. Porcentaje de inhibición de DPPH de los extractos de semilla de "Granada" y vitamina E.	120
Tabla 45. ANOVA para comparación de capacidad antioxidante de las muestras.	122
Tabla 46. Test de Tukey para comparación de capacidad antioxidante de las muestras...	122



ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1 IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL ESPECÍMEN VEGETAL	138
ANEXO N° 2 CÁLCULOS PARA LA DOSIFICACIÓN DE ESTREPTOZOTOCINA Y TRATAMIENTOS	139
ANEXO N° 3 RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE Punica granatum L. “Granada”	140
ANEXO N° 4 INFORME DE ENSAYO: PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE Punica granatum L. “Granada”.....	141
ANEXO N° 5 PRUEBA PILOTO: NIVEL DE GLUCOSA SANGUÍNEA (mg/dL) EN RATAS TRATADAS CON LOS EXTRACTOS DE Punica granatum L. “Granada” A DOSIS DE 10 mg/kg Y 20 mg/kg Y DE SU GRUPO CONTROL (+)	143
ANEXO N° 6 PRUEBA EXPERIMENTAL: PESO DE RATAS TRATADAS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	145
ANEXO N° 7 PRUEBA EXPERIMENTAL: NIVEL DE GLUCOSA SANGUÍNEA EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	147
ANEXO N° 8 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA BASAL ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES	151
ANEXO N° 9 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 0	151
ANEXO N° 10 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 3	151
ANEXO N° 11 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 6	152
ANEXO N° 12 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 9	152
ANEXO N° 13 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 12	152
ANEXO N° 14 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 15	153
ANEXO N° 15 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 18	153

ANEXO N° 16 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 21	153
ANEXO N° 17 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 24	154
ANEXO N° 18 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 27	154
ANEXO N° 19 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 30	154
ANEXO N° 20 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 33	155
ANEXO N° 21 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 36	155
ANEXO N° 22 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 39	155
ANEXO N° 23 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 42	156
ANEXO N° 24 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 45	156
ANEXO N° 25 COMPARACIÓN DEL ÁREA BAJO LA CURVA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	156
ANEXO N° 26 COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE “Granada” Y LA VITAMINA E.	157

GLOSARIO

8-OH-dG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosina difosfato

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados

ARN: Ácido ribonucleico

ARN_m: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosina trifosfato

AUC: Área bajo la curva

CCF: Cromatografía en capa fina

DM1: Diabetes *Mellitus* Tipo 1

DM2: Diabetes *Mellitus* Tipo 2

DPPH: Difenil-picrilhidrazilo

GAD: Glutamato descarboxilasa

GADPH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GCG: Gen precursor de glucagón

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

GIP: Polipéptido inhibidor gástrico

GLP-1: Péptido similar al glucagón tipo 1

GLP-2: Péptido similar al glucagón tipo 2

GLUT1: Transportador de glucosa 1

GLUT2: Transportador de glucosa 2

GLUT4: Transportador de glucosa 4

GPx: Glutación peroxidasa

GRD: Glutación reductasa

GSH: Glutación

GST: Glutación transferasa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HbA1c: Hemoglobina glucosilada

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

IFN γ : Interferón gamma

IL: Interleucina

INEI: Instituto Nacional de Estadística e Informática

INS: Gen precursor de la Insulina

IP: Intraperitoneal

LDL: Lipoproteína de baja densidad

MDA: Malondialdehído

NAD: Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NF κ B: Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Nrf2: Factor nuclear eritroide 2 – relacionado con el factor 2

PEG: Polietilenglicol

PPARG: Gen del receptor gamma activado del factor proliferador de peroxisomas

PPAR $\gamma/\beta/\delta$: Receptor gamma/beta/delta activado por el factor proliferador de peroxisomas

PPYR1: Receptor 1 del polipéptido pancreático – Receptor 4 del neuropéptido Y

Pro12Ala: Sustitución de prolina por alanina del gen PPARG

PTGO: Prueba de tolerancia oral a la glucosa

RCS: Especies reactivas de cobre

RER: Retículo endoplásmico rugoso

RIS: Especies reactivas de hierro

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especie reactivas de oxígeno

SS: Somatostatina

STZ: Estreptozotocina

TE: Equivalente trolox

TNF- α : Factor de necrosis tumoral

TRH: Tirotropina

UI: Unidades internacionales

UV: Ultravioleta

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

XOD: Xantina oxidasa

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad hipoglicemiante de las semillas de *Punica granatum L.* “Granada” en Diabetes experimental inducida por estreptozotocina en animales de experimentación y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos empleando el método DPPH. El trabajo se realizó en los laboratorios de Farmacotecnia, Farmacognosia, Laboratorio de Investigación “Proyecto Mercurio” y Bioterio de la Universidad Católica de Santa María en el periodo de Setiembre – Diciembre del 2019.

Las muestras de granada provienen de la provincia de Cusco, se realizó la identificación taxonómica en el Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín donde se confirmó su pertenencia a la especie *Punica granatum L.*

Se obtuvieron los extractos por extracción Soxhlet usando tres solventes de diferente polaridad: etanol 96°, acetato de etilo (QP) y hexano (PA); se evaluó el rendimiento, teniendo como mejor resultado el extracto de hexano y se realizó el análisis fitoquímico de los tres extractos identificando la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides y terpenos. Asimismo, se determinó el contenido de ácidos grasos de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” por el método de cromatografía de gases, identificándose la presencia de ácido oleico (65.51%), ácido linolénico (3.64%), ácido araquidónico (2.51%), ácido cis-linoleico (7.15%), ácido tricosanoico (15.18%) y ácido cis-4,7,10,13,16-docosahexenoico (6.01%).

La inducción de Diabetes experimental en ratas se realizó usando como dosis de STZ 45 mg/Kg. Mediante una prueba piloto se determinó que el extracto etanólico posee mayor actividad hipoglicemiante al presentar mejores resultados, a partir de ello se procedió al estudio experimental utilizando 18 ratas distribuidas en 6 grupos de experimentación: **Control negativo (-):** ratas normoglicémicas; **Control positivo (+):** ratas inducidas a hiperglicemia; **Tratamiento control:** ratas inducidas a hiperglicemia tratadas con vitamina E 6 mg/Kg; **Tratamiento 1:** ratas inducidas a hiperglicemia tratadas con el extracto etanólico a dosis de 20 mg/Kg; **Tratamiento 2:** ratas inducidas a hiperglicemia tratadas con el extracto etanólico a dosis de 40 mg/Kg y **Preventivo:** ratas tratadas con el extracto etanólico a dosis de 20 mg/Kg durante 15 días previos a la inducción de Diabetes y 30 días después.

Se realizaron las mediciones de los niveles de glicemia: glucosa basal, glucosa post-STZ (día 0), durante el tratamiento los días 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 y post-tratamiento 33, 36, 39, 42 y 45 días; también se evaluaron los pesos cada 5 días durante el periodo de estudio.

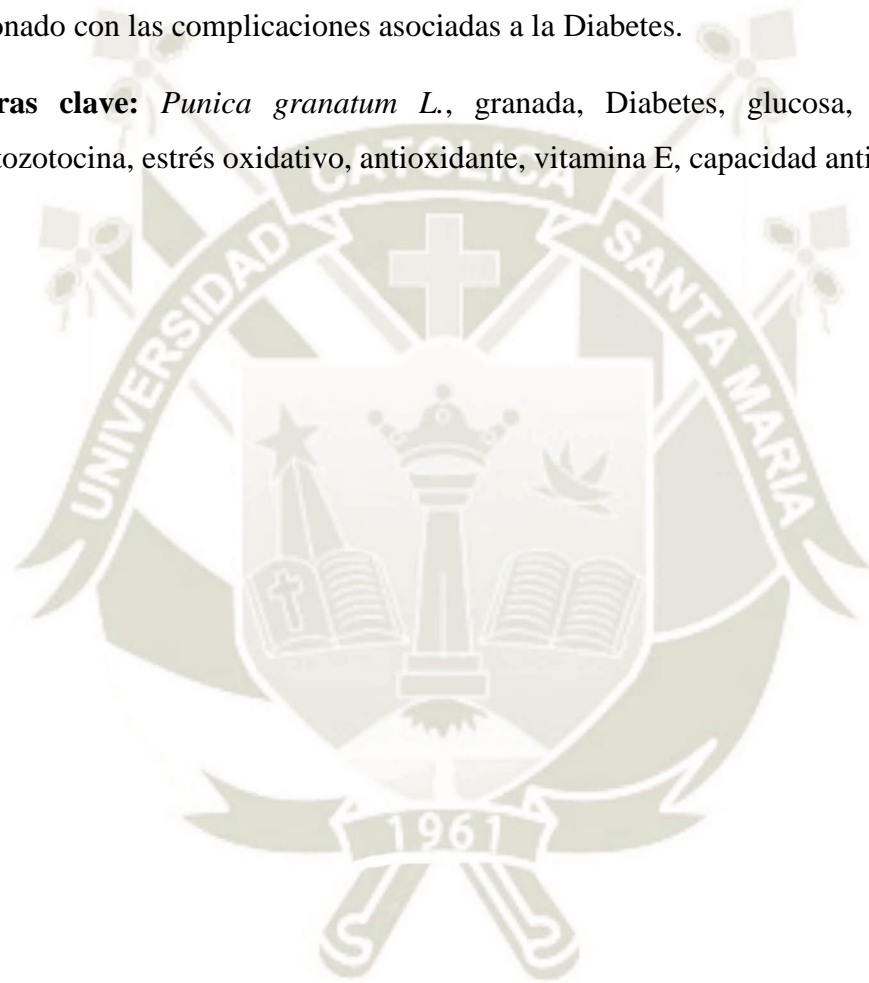
El análisis estadístico de cada grupo de estudio determinó que el mayor efecto hipoglicemiante se le confiere al extracto etanólico a dosis de 40 mg/Kg con una concentración sanguínea final de glucosa promedio de 132.33 ± 3.51 mg/dL y 72.43% de disminución de hiperglicemia, seguido del tratamiento de vitamina E con un promedio de 147 ± 1.41 mg/dL y un 69.82%. El grupo preventivo presentó 162 ± 4.36 mg/dL de glucosa y 57.81% de disminución. El tratamiento con menor efecto fue el extracto etanólico a dosis de 20 mg/Kg con 200 ± 1.41 mg/dL de glucosa y 58.88% de disminución de hiperglicemia. Además, se realizó una comparación entre los grupos de estudio donde se evaluó el AUC obteniendo como resultado que el mejor tratamiento es el Preventivo dado que los niveles de hiperglicemia post-inducción de Diabetes fueron de 384 ± 9.17 mg/dL, 21.15% menor comparado con los demás grupos obteniendo un valor total de AUC de 11289.83; seguido de la vitamina E y extracto de “Granada” a dosis de 40 mg/Kg con 11962.67 y 12311.33 AUC, y el tratamiento del extracto a dosis de 20 mg/Kg con un AUC de 13871.00 fue el de menor eficacia frente a la hiperglicemia. Se concluye que la administración del extracto etanólico antes de la inducción a hiperglicemia previene la elevación excesiva de glucosa y disminuye su nivel durante el proceso de la enfermedad.

Por otro lado, también se determinó la capacidad antioxidante de los extractos de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” por el método DPPH usando como estándar el reactivo Trolox. Los resultados demostraron que el extracto etanólico tiene un valor de 31.67%, el extracto de acetato de etilo 28.79% y el extracto de hexano 17.88% de capacidad antioxidante. Además, se obtuvo que el contenido de TE por 100 g de semillas del espécimen de estudio es de 1.17 M TE/100 g en el extracto etanólico, 2.09 M TE/100 g en el extracto de acetato de etilo y 1.35 M TE/100 g en el extracto de hexano.

Los resultados obtenidos de este estudio sugieren que el extracto etanólico de semilla de granada puede ser útil para prevenir y/o tratar la hiperglucemia asociada a Diabetes. Este efecto está asociado con la capacidad antioxidante total del extracto. La efectividad del extracto se relaciona con el contenido de flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides, terpenos y ácidos grasos. Estos metabolitos podrían actuar directa o indirectamente al inducir algunas

vías de señalización que codifican los genes detoxificantes y antioxidantes como Nrf2, suprimir el señalamiento inflamatorio por regulación negativa en NFκB, TNFα y/o la activación de la vía metabólica PPAR_{γ/β/δ}. Estos mecanismos antioxidantes, antiinflamatorios y metabólicos ejercen efecto protector sobre las células pancreáticas mejorando su funcionamiento y viabilidad celular, aumentando la secreción y sensibilidad a la insulina y mejorando la captación de glucosa. Como resultado se obtiene una evidente disminución de los niveles séricos de glucosa, evitando el fenómeno de glucotoxicidad relacionado con las complicaciones asociadas a la Diabetes.

Palabras clave: *Punica granatum L.*, granada, Diabetes, glucosa, hipoglicemiante, estreptozotocina, estrés oxidativo, antioxidante, vitamina E, capacidad antioxidante, DPPH.



ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the hypoglycemic activity of the seeds of *Punica granatum L.* "Pomegranate" in experimental Diabetes induced by streptozotocin in an experimental model and the antioxidant capacity of the extracts obtained using the DPPH method. This study was carried out in the laboratories of Pharmacotechnics, Pharmacognosy, Research Laboratory "Mercury Project" and Biotery of the Catholic University of Santa María in the period of September - December 2019.

The pomegranate samples were obtained from the province of Cusco, the taxonomic identification was performed at the Herbarium Arequipense (HUSA) of the National University of San Agustín. The pomegranate samples were classified as *Punica granatum L.*

The seed pomegranate extracts were obtained by Soxhlet extraction using three solvents of different polarity: 96 ° ethanol, ethyl acetate (CP) and hexane (AR); the yield was evaluated, having the hexane extract as the best result. The phytochemical analysis of the three extracts was carried out, by identifying the presence of flavonoids, tannins, alkaloids, sterols and terpenes. Likewise, the fatty acid content of *Punica granatum L.* "Granada" seeds was assessed by the gas chromatography method. The data showed the following fatty acid composition: oleic acid (65.51%), linolenic acid (3.64%), arachidonic acid (2.51%), cis-linoleic acid (7.15%), tricosanoic acid (15.18%) and cis-4,7,10,13,16-docosahexenoic acid (6.01%).

The experimental Diabetes in rats was induced by using a unique dose of 45 mg/Kg as STZ. Through a pilot test, it was determined that the ethanolic extract had greater hypoglycemic activity. Eighteen rats were distributed in 6 experimental groups: **Negative control (-):** normoglycemic rats; **Positive control (+):** rats induced to hyperglycemia; **Control treatment:** hyperglycemic-induced rats treated with vitamin E 6 mg/Kg; **Treatment 1:** hyperglycemic-induced rats treated with the ethanolic extract at a dose of 20 mg/Kg; **Treatment 2:** hyperglycemic-induced rats treated with ethanolic extract at a dose of 40 mg/Kg and **Preventive:** rats treated with ethanolic extract at a dose of 20 mg/Kg for 15 days prior to the induction of Diabetes and 30 days after.

Measurements of blood glucose levels were made: basal glucose, post-STZ glucose (day 0), during treatment on days 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 and post-treatment 33, 36, 39, 42 and 45 days; weights were also evaluated every 5 days during the study period.

The statistical analysis of each study group determined that the greatest hypoglycemic effect is conferred on the ethanolic extract at a dose of 40 mg/Kg with a final mean glucose concentration of 132.33 ± 3.51 mg/dL and a 72.43% decrease in hyperglycemia, followed by vitamin E treatment with an average of 147 ± 1.41 mg/dL and 69.82%. The preventive group presented 162 ± 4.36 mg/dL of glucose and a 57.81% decrease. The treatment with the least effect was the ethanolic extract at a dose of 20 mg/Kg with 200 ± 1.41 mg/dL of glucose and a 58.88% decrease in hyperglycemia. In addition, a comparison was made between the study groups where the AUC was evaluated, obtaining as a result that the best treatment is Preventive since the levels of hyperglycemia post-induction of Diabetes were 384 ± 9.17 mg/dL, 21.15% lower compared with the other groups obtaining a total value of AUC of 11289.83; followed by vitamin E and extract of “Granada” at doses of 40 mg/Kg with 11962.67 and 12311.33 AUC, and the treatment of the extract at doses of 20 mg/Kg with an AUC of 13871.00 was the one with the lowest efficacy against hyperglycemia. It is concluded that the administration of the ethanolic extract before the induction of hyperglycemia prevents the excessive elevation of glucose and reduces its level during the disease process.

The antioxidant capacity of *Punica granatum L.* “Granada” seed extracts was determined by the DPPH method using the Trolox reagent as standard. The results showed that the ethanolic extract has a value of 31.67%, the extract of ethyl acetate 28.79% and the extract of hexane 17.88% of antioxidant capacity. Furthermore, it was concluded that the content of TE per 100 g of seeds of the study specimen is 1.17 M TE/100 g in the ethanolic extract, 2.09 M TE/100 g in the extract of ethyl acetate and 1.35 M TE/100 g in the hexane extract.

The data obtained from this study suggest that the ethanolic extract of pomegranate-seed can be useful in preventing and/or treating Diabetes associated hyperglycemia. This effect of consistent with the total antioxidant capacity of the extract. The effectiveness of the extract is related to the content of flavonoids, tannins, alkaloids, sterols, terpenes and fatty acids. These metabolites could act directly or indirectly by inducing some signaling pathways that encode detoxifying and antioxidant genes such as Nrf2, suppressing inflammatory signaling by negative regulation in NFκB, TNFα and/or the activation of the PPAR_{γ/β/δ} metabolic

pathway. These antioxidant, anti-inflammatory and metabolic mechanisms exert a protective effect on pancreatic cells, improving their function and cell viability, increasing insulin secretion and sensitivity, and improving glucose uptake. As a result, an evident decrease in serum glucose levels is obtained, avoiding the phenomenon of glucotoxicity related to complications associated with the disease.

Keywords: *Punica granatum L.*, pomegranate, Diabetes, glucose, hypoglycemic, streptozotocin, oxidative stress, antioxidant, vitamin E, antioxidant capacity, DPPH.



INTRODUCCIÓN

El Estrés Oxidativo es el proceso de deterioro celular que depende de la producción de radicales libres, estos radicales libres se forman a partir de varias moléculas donde los derivados de la molécula de oxígeno son los que tienen más alta capacidad reactiva y mayor importancia en la patología humana. El oxígeno (O_2), molécula necesaria para la vida pluricelular, tiene la capacidad de inducir la formación de dichos radicales libres y estos a su vez presentan la capacidad de reaccionar y dañar los sistemas biológicos pudiendo provocar muerte celular y disfunción tisular por la producción de cambios en la composición química o en los elementos celulares. Sin embargo, se sabe también que los radicales libres son moléculas señalizadoras que cumplen funciones fisiológicas. En la actualidad existe un creciente interés por investigar sobre el estrés oxidativo y la capacidad antioxidante de diversas sustancias y/o metabolitos, debido a que están relacionados con las enfermedades crónicas que afectan cada vez más a la población⁽¹⁾.

La Diabetes *Mellitus* es la enfermedad crónica-metabólica porque es la más crítica del páncreas endocrino, causa la muerte y crea problemas de salud en la sociedad moderna debido a su elevada prevalencia, dado que puede afectar a personas de cualquier edad, sexo, clase social y área geográfica⁽²⁾. La causa de esta afección está caracterizada por la hiperglicemia que es debido a un funcionamiento incorrecto del páncreas (glándula encargada de producir la hormona insulina) o por una respuesta inadecuada de esta hormona frente a la glucosa⁽³⁾. Si los niveles altos de azúcar en la sangre no son controlados, las complicaciones microvasculares y neurológicas llevarán al paciente a la pérdida de la visión, amputación de los miembros inferiores, falla renal, entre otros. La Diabetes *Mellitus* se manifiesta principalmente como Diabetes *Mellitus* Tipo 1 (DM1) debido a la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas que generalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina y la Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DM2), forma clínica más frecuente, se caracteriza por la resistencia a la insulina⁽⁴⁾.

El último informe del Boletín Epidemiológico del Perú muestra que, en los últimos 3 años el número de casos registrados con Diabetes ha ido en aumento. Los datos más actualizados hasta el primer trimestre del 2019 según la INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática), hubo un incremento importante en el número de casos registrados de Diabetes en comparación con periodos similares en los dos últimos años⁽⁵⁾.

La fitoterapia y la fitofarmacología, con el paso de los años, están tomando cada vez más importancia previniendo el avance de condiciones adversas en el organismo y mejorando la calidad de vida de los consumidores; es por eso que la presente investigación tiene como objetivo estudiar la actividad hipoglicemiante de las semillas de la especie *Punica granatum L.* “Granada” en Diabetes inducida experimentalmente en ratas por estreptozotocina (STZ); se sabe por bibliografía que las semillas de dicha especie presentan como metabolitos secundarios ciertas clases de compuestos fenólicos tales como flavonoides, lignanos, cumarinas, ácido gálico, taninos, algunos alcaloides, esteroides, terpenos y ácidos grasos. Varios de estos compuestos presentan actividad antioxidante. Este trabajo permite demostrar que las semillas de *Punica granatum L.* “Granada” presentan actividad hipoglicemiante y antioxidante, dos parámetros ampliamente relacionados con la enfermedad de la Diabetes; además de ofrecer una vista amplia de no solo un tratamiento como hipoglicemiante sino también como antioxidante frente a la enfermedad pudiendo lograr la disminución de la glucosa en sangre y además actividad protectora antioxidante en las células β -pancreáticas.

HIPÓTESIS

Dado que la investigación científica le atribuye propiedades antioxidantes a *Punica granatum L.* “Granada”, es probable que el extracto de semillas de esta planta, presente un efecto hipoglicemiante en la Diabetes inducida por estreptozotocina en animales de experimentación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto hipoglicemiante del extracto de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” en hiperglicemia inducida en animales de experimentación y su capacidad antioxidante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener los extractos de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” con solventes de diferente polaridad y evaluar su rendimiento.
2. Realizar el análisis fitoquímico preliminar para determinar los grupos de metabolitos secundarios de los extractos de *Punica granatum L.* “Granada”.
3. Identificar y cuantificar los ácidos grasos presentes en el extracto de *Punica granatum L.* “Granada” mediante la técnica de cromatografía de gases.
4. Evaluar la actividad hipoglicemiante de los extractos de las semillas de *Punica granatum L.* “Granada” en animales de experimentación inducidos a hiperglicemia por estreptozotocina.
5. Comparar el efecto hipoglicemiante del extracto de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” a diferentes dosis.
6. Determinar si las semillas de *Punica granatum L.* “Granada” tienen efecto preventivo y/o curativo frente a la hiperglicemia.
7. Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de semillas de *Punica granatum L.* “Granada”.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. *Punica granatum* L. “Granada”

1.1. Estudio Botánico

Punica granatum pertenece a la familia Punicaceae, es familia de plantas más pequeña que incluye un género y dos especies, incluidas: *Punica granatum* y *Punica protopunica* ⁽⁶⁾.

Punica granatum (granada) es un pequeño árbol – arbusto que mide entre 1.5 y 5 metros de altura, posee ramas irregulares espinosas y hojas de dos aspectos: brillantes en regiones templadas y perennes en regiones frías.

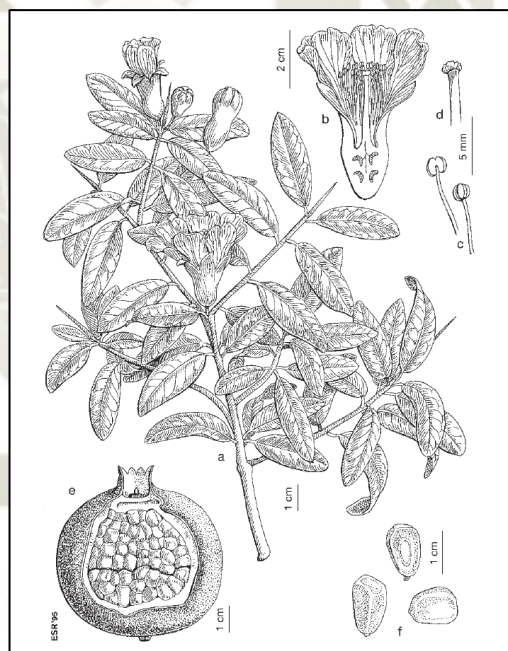


Figura N° 1. Partes de *Punica Granatum* L. a) rama con hojas y flores; b) flor en sección longitudinal; c) estambre; d) estigma; e) fruto; f) semilla⁽⁷⁾

Características de *Punica granatum* L. “Granada”:

- Hojas: las hojas son entre lanceoladas y oblongas, opuestas o subopuestas en las ramas recién crecidas y se integran en las esporas, o bien se encuentran reunidas en fascículos alternos o subpuestos, caducas, subcoriáceas, lustrosas por el haz, glabras, de un verde amarillento, atenuadas en corto pecíolo; ápice obtuso con glándula terminal.

- Flores: tiene entre una a cinco flores de 3 – 4 centímetros de diámetro, una de ellas terminal y el resto marginal, corta o sin pedúnculo, su color es rojo y raramente amarillo o blanco, inodoro y bisexual.
- Fruto: presenta un color rojo claro a amarillo verdoso y rara vez en algunas especies de color púrpura oscuro. Tiene un diámetro de 5 a 20 cm y su peso varía de menos de 200 g a más de 800 g, es esférico, coriáceo.
- Semilla: las semillas miden entre 4 a 7 mm (las desecadas), muy carnosas, translúcidas, angulosas, prismáticas, granates; se producen en grandes cantidades, son triangulares, libres de albúmina e incrustadas en arilo⁽⁷⁾.

1.2. Clasificación de la Especie

Según *United States Department of Agriculture – Natural Resources Conservation Service (Plants Data base)*, la especie se encuentra dentro de la siguiente clasificación⁽⁸⁾:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Myrtales
Familia	Punicaceae
Subfamilia	Punicoideae
Género	<i>Punica L.</i>
Especie	<i>Punica granatum L.</i>
Nombre común	Granada

1.3. Hábitat

Punica granatum L. (granada) es un pequeño árbol que es originariamente de Irán y se encuentra en el Himalaya en el norte de India, China, Estados Unidos y en toda la región del Mediterráneo. Se cultiva en toda la India y en las zonas más secas del sudeste asiático, Malaya, las Indias Orientales y África tropical. El árbol

fue introducido en América por los colonizadores españoles en 1769, iniciando en Estados Unidos – California extendiéndose por todo América.

Esta especie prefiere un clima semiárido templado a subtropical, se adaptan naturalmente a regiones con inviernos fríos y veranos calurosos. El clima húmedo afecta de forma negativa la formación de frutos. El árbol puede sufrir graves daños por temperaturas inferiores a los -10°C . El árbol se adapta bien al cultivo en contenedores y a veces fructificará en un invernadero⁽⁹⁾.

1.4. Composición Química

Los metabolitos en varias partes de la fruta y el árbol *Punica granatum L.* incluyen varios tipos de azúcares, ácidos orgánicos, flavonoides (en forma de glucósidos), antocianinas (le confieren color al fruto), ácidos grasos, alcaloides, vitaminas, etc; siendo los más abundantes los polifenoles y taninos. Los principales azúcares incluidos en el extracto de *Punica granatum L.* están compuestos de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, mientras que las vitaminas son C, B1, B2 y betacaroteno⁽⁶⁾.

- El jugo de granada contiene una alta fuente de elagitaninos, antocianinas, flavonoides y taninos hidrolizables⁽¹⁰⁾.
- La cáscara de granada contiene elagitaninos, ácido elágico, ácido gálico y glucósidos del ácido elágico. Punicalagina es el principal componente bioactivo de la cáscara de granada. Las antocianidinas están contenidas principalmente en cianidina, pelargonidina y delfinidina y flavonoides como kaempferol, luteolina y quercetina⁽¹¹⁾.
- El aceite de las semillas posee un alto contenido de ácidos grasos libres, siendo uno de los más abundantes el ácido púnico – púnico, así como el ácido linolénico y linoleico; esteroides y terpenos; además, en la semilla pulverizada se encuentran antocianinas, ácido elágico, flavonoides, lignanos, otros compuestos fenólicos y taninos⁽¹⁰⁾.
- El tallo está compuesto de algunos alcaloides como pelletierina y taninos como puniacorteína A, B, C y D⁽¹⁰⁾.

Tabla 2. Lista de compuestos identificados en *Punica granatum* L⁽¹⁰⁾.

CLASE DE COMPUESTOS	COMPUESTOS FITOQUÍMICOS	PARTE DE <i>Punica granatum</i> L.
Alcaloides	Cafeína	Piel
	Cloruro de N-(2', 5'-dihidroxifenil) piridio	Hoja
	Pelletierina	Piel, tallo
Antocianinas/antocianidinas	Cianidina y sus glucósidos	Jugo, semilla, piel
	Delfinidina y sus glucósidos	Jugo, piel
	(Epi) alzelchin-delfinidin-3-O-hexósido	Semilla
	Pelargonidina y sus glucósidos	Jugo, piel
	Vitisina A	Jugo
Ácido elágico y derivados	Ácido elágico	Jugo, piel, semilla, flor
	Glucósidos de ácido elágico y derivados	Jugo, piel
Ácidos grasos	Ácido araquídico, ácido docosadienoico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúcico, ácido gondoico, ácido linoleico, ácido linolelaídico, ácido linolénico, ácido mirístico, ácido margarico, ácido nervónico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido púnico, ácido esteárico, ácido cis-vaccénico	Semilla
Flavonoides y derivados	Apigenina y sus glucósidos	Hojas, semilla
	Catequina	Jugo, semilla, piel
	Epicatequina	Jugo, piel
	Flavan-3-ol	Jugo, piel
	Galocatequina	Piel
	Kaempferol	Piel
	Glucósidos de kaempferol	Jugo, semilla, piel
	Luteolina	Piel, fruto, semilla
	Miricetina y sus glucósidos	Jugo, semilla
	Floretina	Piel, semilla, jugo
	Quercetina y derivados	Jugo, semilla, piel
	Rutina	Jugo, piel
Taxifolina y sus glucósidos	Piel, semilla, jugo	
Lignanós	Isolariciresinol, matairesinol, medioresinol, pinioresinol, secoisolariciresinol, siringaresinol	Fruto, semilla
Ácidos orgánicos	Ácido cítrico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido málico, ácido metilmalónico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido tartárico	Jugo
	Ácido quínico	Jugo, piel

	Ácido urónico	Piel
Otros compuestos fenólicos	Acido benzoico	Piel
	Acido cafeico y sus hexósidos	Jugo, piel
	Acido cinámico	Jugo
	Coniferil 9-O-[β-d-apiofuranosil (1→6)]-O-β-d-glucopiranosido	Semilla
	Ácido gálico	Jugo, semilla, piel
	Ácido <i>p</i> -cumárico	Jugo, piel, semilla
	Ácido salicílico	Piel
	Ácido vanílico	jugo
Proantocianidinas	Procianidina B2 y B3 Arabinosa, xilosa, galactosa, glucosa, manosa, rhamnosa	Piel
Azúcares	Glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa	Jugo
Esteroles	Acetato de β-sitosterilo	Piel
	Campesterol, daucosterol, estigmasterol, β-sitosterol	Semilla
Taninos	Ácido 3,3'-Di-O-metilelagico Ácido 3,3',4'-Tri-O- metilelagico	Semilla
	Galato de epicatechina, ácido flavogalónico	Piel
	Ácido galágico	Piel, jugo
	Granatina A/B	Piel
	Punicacorteína A, B, C y D	Piel, tallo
	Punicalagina	Jugo, piel, hoja
	Punicalina α y β	Piel, jugo, hoja
Terpenos y terpenoides	Eugenol	Jugo
	Cicloartenol, escualeno	Semilla
	Camfor	Piel, cáscara
	Ácido maslínico, ácido oleanólico	Flor, semilla
	Ácido ursólico	Semilla, flor
Vitaminas	Vitamina C	Jugo
Xantonoides	Mangiferina	Piel, cáscara

1.5. Propiedades Farmacológicas

El jugo, las semillas y la cáscara son fuente de muchos nutrientes, pero el fruto entero también se puede utilizar para varios fines medicinales. Los tipos de granadas dulces suelen ser ligeramente laxantes, mientras que los tipos menos dulces son buenos en la inflamación del estómago y el dolor de corazón⁽¹¹⁾.

La granada es una fuente importante de propiedades bioactivas y se ha demostrado que posee actividad antioxidante, antibacteriana – antimicrobiana, antiinflamatoria, usos en Diabetes, enfermedad cardiaca y cáncer; por este motivo

la investigación científica se ha centrado en estas propiedades como beneficios terapéuticos, algunos de éstos son:

- El jugo fermentado de granada tiene actividad antioxidante. Los polifenoles presentan mayor actividad debido a la descomposición de los complejos de azúcares flavonoides durante la fermentación dando lugar a una alta concentración de polifenoles libres.
- Las flores de granada y semillas pueden reducir el azúcar en la sangre y los lípidos.
- Los flavonoides y taninos del jugo no fermentado pueden prevenir el crecimiento de células cancerosas.
- La cáscara de la fruta ha mostrado actividad estrogénica, se unen algunos metabolitos con los receptores de estrógenos como los flavonoides estrogénicos, incluidos kaempferol, quercetina, naringenina, luteolina, caumestrol y estrógeno débil 17- α -estradiol, por lo que inhibe la actividad estrogénica de 17- β -estradiol⁽¹²⁾.

2. Diabetes Mellitus

2.1. Definición

La Diabetes *Mellitus* se describe como un trastorno crónico metabólico endocrinológico caracterizado por episodios de hiperglicemia debido a las alteraciones o anormalidades en el metabolismo (anabolismo y catabolismo) de carbohidratos, lípidos y proteínas, su base es la insuficiente secreción de insulina o escasa movilización de glucosa por la generación de resistencia a la insulina⁽¹³⁾.

Varios procesos patogénicos, factores genéticos y ambientales están involucrados en el desarrollo de la Diabetes, enfermedad en la que se evidencia la alteración de los valores normales de glucosa sérica que oscilan entre 70 – 110 mg/dL. Estos van desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas con la consiguiente deficiencia de insulina hasta anormalidades que resultan en resistencia a la acción de la insulina que clínicamente se manifiesta en hiperglicemia. El deterioro de la secreción de insulina y los defectos en la acción

de esta hormona con frecuencia coexisten en el mismo paciente y a menudo no está claro qué anormalidad es la causa principal de la hiperglicemia^(14,15).

La hiperglicemia en pacientes con todas las formas de Diabetes está asociada con daño a largo plazo, disfunción y falla en varios órganos y sistemas del organismo, especialmente en los ojos (retinopatía), riñones (nefropatía), nervios, corazón (cardiopatía) y vasos sanguíneos (enfermedad vascular y cerebrovascular)⁽¹³⁾.

2.2. Clasificación

La clasificación de la Diabetes *Mellitus* se basa en su etiología y presentación clínica. Hay cuatro tipos o clases: Diabetes *Mellitus* Tipo 1 (DM1), Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DM2), Diabetes Gestacional y otros tipos específicos.

2.2.1. Diabetes *Mellitus* Tipo 1

Se debe a la destrucción de las células β pancreáticas, que generalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina⁽⁴⁾, actualmente se subdivide en dos tipos:

a) Diabetes Autoinmune:

Esta forma de Diabetes representa solo del 5 al 10% de las personas con la enfermedad. Mediada por los linfocitos T activados que resulta en la destrucción las células β del páncreas. Los marcadores de la destrucción inmune de estas células β incluyen autoanticuerpos de las células de los islotes de Langerhans, GAD (GAD65) y anticuerpos contra insulina IA-2 e IA-2 β . Generalmente más de uno de estos anticuerpos están presentes en el 85-90% de las personas cuando se detecta inicialmente la hiperglicemia en ayunas. La destrucción autoinmune de las células β tiene múltiples predisposiciones genéticas asociadas al genotipo HLA.

En esta forma de Diabetes, la tasa de destrucción de las células β es bastante variable, rápida en algunos individuos (principalmente bebés y niños) y lenta en otros (adultos). Estos pacientes también son propensos a otros trastornos autoinmunes como la enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, hepatitis autoinmune, miastenia grave, anemia perniciosa⁽¹⁶⁾.

b) Diabetes Idiopática:

Algunas formas de DM1 no tienen etiologías conocidas. Algunos de estos pacientes tienen insulinopenia permanente y son propensos a la cetoacidosis, pero no tienen evidencia de autoinmunidad. Los casos que se presentan son de ascendencia africana o asiática. Las personas con esta forma de Diabetes sufren de cetoacidosis episódica y exhiben diversos grados de deficiencia de insulina en diferentes momentos. Esta forma de Diabetes es fuertemente heredada, carece de evidencia inmunológica para la autoinmunidad de células β pancreáticas y no está asociada con HLA⁽¹⁴⁾.

2.2.2. Diabetes Mellitus Tipo 2

Es debido a la resistencia a la insulina o una deficiencia relativa y progresiva de la insulina (en lugar de absoluta). Representa entre el 90 y el 95% de las personas, conocida también como “Diabetes no insulino-dependiente” o “Diabetes de inicio en adultos”. Aunque no se conocen las etiologías específicas, no se produce la destrucción autoinmune de las células β del páncreas^(4,15).

La mayoría de los pacientes con esta forma de Diabetes son obesos, y la obesidad en sí misma causa cierto grado de resistencia a la insulina. La cetoacidosis rara vez ocurre espontáneamente. Esta forma de Diabetes con frecuencia no se diagnostica durante muchos años porque la hiperglicemia se desarrolla gradualmente y, en etapas más tempranas, a menudo no es lo suficientemente grave como para que el paciente note alguno de los síntomas clásicos de la Diabetes. Sin embargo, estos pacientes tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones micro y macrovasculares. La secreción de insulina es defectuosa en estos pacientes e insuficiente para compensar la resistencia a esta hormona. La resistencia a la insulina puede mejorar con la reducción de peso y/o el tratamiento farmacológico de la hiperglicemia, pero rara vez se restablece a la normalidad. El riesgo de desarrollar esta forma de Diabetes aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. A menudo se asocia con una fuerte predisposición genética, más que la forma autoinmune de la DM1⁽¹⁵⁾. Se han podido identificar hasta 28 genes asociados con DM2 que, sin embargo, sólo

explican un 10% de la susceptibilidad genética para presentar la enfermedad, uno de los hallazgos más importantes que implican la enfermedad fue el Pro12Ala del gen del PPARG que codifica un receptor nuclear PPAR γ y se expresa de modo preferente en el tejido adiposo, donde regula la transcripción de genes implicados en la adipogénesis, allí es donde se da la relación de la DM2 con la obesidad y síndrome metabólico⁽¹⁶⁾.

2.2.3. Diabetes *Mellitus* Gestacional

Es el tipo de Diabetes diagnosticado en el segundo o tercer trimestre del embarazo, su etiología se desconoce⁽¹⁷⁾. Se define como la intolerancia a la glucosa que se reconoce por primera vez durante el embarazo. En la mayoría de las mujeres que desarrollan DMG, el trastorno comienza en el tercer trimestre del embarazo. La Diabetes gestacional complica alrededor del 8-9% de todos los embarazos, aunque las tasas pueden duplicarse en poblaciones con alto riesgo de DM2. La detección clínica es importante, ya que la terapia reducirá la morbilidad y mortalidad perinatal⁽¹⁸⁾.

2.2.4. Otros tipos específicos

Son debidos a otras causas, por ejemplo, síndromes de Diabetes monogénica (como Diabetes neonatal y MODY definida como Diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes), enfermedades del páncreas exocrino (como la fibrosis quística) y fármacos o sustancias químicas. Diabetes inducida (como en el tratamiento del VIH / SIDA o después del trasplante de órganos)⁽¹⁴⁾.

Algunas otras causas se pueden considerar:

- Defectos genéticos de la función de las células beta del páncreas.
- Defectos genéticos de la acción de la insulina.
- Endocrinopatías.
- Infecciones.
- Formas infrecuentes de Diabetes autoinmune⁽¹⁹⁾.

2.3. Síntomas

La Diabetes *Mellitus* presenta síntomas característicos como:

- Poliuria
- Polidipsia
- Polifagia
- Visión borrosa
- Pérdida o ganancia de peso
- Fatiga – falta de energía
- Irritabilidad
- Infecciones
- Aftas y cistitis

Un estadio severo de Diabetes *Mellitus* conlleva al deterioro del organismo y la susceptibilidad a ciertas infecciones. Las consecuencias agudas y potencialmente mortales de la Diabetes no controlada son la hiperglicemia con cetoacidosis o el síndrome hiperosmolar no cetótico⁽¹⁵⁾.

2.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la Diabetes *Mellitus* se deberá realizar en cualquiera de las siguientes situaciones⁽¹⁷⁾:

- Presencia de sintomatología convencional: poliuria, polidipsia, polifagia, visión borrosa y además deberá presentar como glicemia basal (ayunas) mayor a 120 mg/dL y glicemia elevada en cualquier momento del día sin relación con el tiempo transcurrido desde la última comida, mayor o igual a 200 mg/dL.
- Glicemia mayor o igual a 200 mg/dL dos horas después de una carga de 75 g de glucosa durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO).

a) Prueba de tolerancia oral a la glucosa.

Determinación de la glicemia basal en ayunas y a las 2 horas post carga de 75 g de glucosa disueltos en 250 mL de agua fría. Para los niños la dosis es

de 1,75 g de glucosa/kg de peso y como dosis máxima 75g⁽¹⁴⁾. Los resultados de la prueba de tolerancia oral de glucosa se describen en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Resultados de Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa

Condición	Resultado	Diagnóstico
Glicemia 2 horas post carga	< 140 mg/dL	Tolerancia normal a la glucosa
	140 – 199 mg/dL	Intolerancia a la glucosa
	≥ 200 mg/dL	Diabetes <i>Mellitus</i>

Condiciones para efectuar la prueba:

- Alimentación previa sin restricciones y actividad física habitual, al menos tres días previos al examen.
- Suspender la administración de fármacos hipoglicemiantes (tratamiento) cinco días antes de la prueba.
- Permanecer en reposo y sin fumar antes del examen.
- No realizar la prueba en pacientes con cuadro febril, infecciones o que no cumplan con los criterios diagnósticos de la Diabetes en glicemia en ayunas (≥ 120 mg/dL)⁽¹⁴⁾.

b) Glucosa post-prandial en plasma/suero venoso.

La glucosa post-prandial se define como los niveles de glucosa en sangre a las 2 horas de la ingesta de un alimento⁽²⁰⁾.

c) Hemoglobina glucosilada (HbA1c).

Es una prueba para el control y seguimiento del tratamiento de la Diabetes. Se debe tener en cuenta que la prueba se altera en aquellas condiciones que disminuya la vida media del eritrocito (hemólisis, uremia, embarazo), anemia ferropénica, portadores de hemoglobinopatías congénitas y aquellos que hayan recibido transfusiones recientes⁽²⁰⁾.

d) Orina completa.

Evalúa la presencia de glucosuria, cuerpos cetónicos, albuminuria (proteinuria) y leucocituria⁽²⁰⁾.

2.5. Factores de Riesgo

Existen algunos factores que predisponen a las personas a padecer Diabetes, los cuales son:

- Sobrepeso u obesidad (peso 20% mayor que el peso ideal; índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 27 kg/m²).
- Antecedentes familiares de Diabetes (parientes de primer grado).
- Procedencia afroamericana, nativa de Alaska, indígena estadounidense, estadounidense de origen asiático, hispana/latina, nativa de Hawái, o de las Islas del Pacífico.
- Hipertensión arterial.
- Dislipidemia: bajo nivel de HDL-colesterol ≤ 35 mg/dL o un nivel alto de triglicéridos ≥ 250 mg/dL.
- Antecedentes de Diabetes gestacional o parto macrosómico (> 4.5 kg).
- Actividad física deficiente.
- Antecedentes de enfermedades cardiacas o accidentes cardiovasculares.
- Síndrome de ovario poliquístico.
- Edad, persona mayor de 45 años de edad⁽²¹⁾.

Toda persona que presente o no estos factores de riesgo deben hacerse un test de nivel de glucosa en sangre al menos cada tres años o empezar desde una edad más temprana para prevenir o tratar la hiperglicemia a tiempo y evitar las complicaciones futuras de la enfermedad⁽²²⁾.

2.6. Complicaciones

La Diabetes está asociada con una serie de complicaciones. Las complicaciones metabólicas agudas asociadas con la mortalidad incluyen cetoacidosis diabética por concentraciones de cuerpos cetónicos en sangre excepcionalmente altas y coma diabético como resultado de niveles extremadamente altos o bajos de glucosa en sangre. Otra complicación importante es la disfunción inmune, se desarrolla a partir de los efectos directos de la hiperglicemia en la inmunidad celular, pacientes diabéticos son más susceptibles a infecciones bacterianas y fúngicas^(23,24).

Otras de las complicaciones más preocupantes son las vasculares que se dan a largo plazo. Estas complicaciones son muy variadas y se deben al menos en parte a la elevación crónica de los niveles de glucosa en sangre, lo que conduce a daños en los vasos sanguíneos (angiopatía). Las complicaciones resultantes se agrupan en "enfermedad microvascular" (debido al daño a los vasos sanguíneos pequeños) y "enfermedad macrovascular" (debido al daño a las arterias) ⁽²⁴⁾.

Los mecanismos por los cuales se desarrolla la enfermedad vascular incluyen:

- Glicosilación de proteínas séricas y tisulares con formación de productos finales de glicación avanzada.
- Producción de superóxido.
- Activación de la proteína quinasa C, una molécula de señalización que aumenta la permeabilidad vascular y causa disfunción endotelial.
- Vías biosintéticas aceleradas de hexosamina y poliol que conducen a la absorción de sorbitol dentro de los tejidos.
- Hipertensión y dislipidemias que acompañan a la Diabetes *Mellitus*.
- Microtrombosis arterial.
- Efectos proinflamatorios y protrombóticos de la hiperglicemia y la hiperinsulinemia que deterioran la autorregulación vascular ⁽²³⁾.

Las **complicaciones microvasculares** subyacen en tres manifestaciones comunes y devastadoras de la Diabetes *Mellitus* ⁽²⁴⁾:

- Enfermedad ocular o "retinopatía".
- Enfermedad renal denominada "nefropatía".
- Daño neuronal o "neuropatía".

La enfermedad microvascular también puede afectar la cicatrización de la piel, de modo que roturas menores en la se pueden convertir en úlceras más profundas y fácilmente lograrían infectarse, particularmente en las extremidades inferiores. El control intensivo de la glucosa en plasma puede prevenir o retrasar muchas de estas complicaciones, pero puede no revertirlas una vez establecidas ⁽²³⁾.

Las principales **complicaciones macrovasculares** implican aterosclerosis de grandes vasos sanguíneos, lo que conduce a:

- Angina de pecho e infarto al miocardio.
- Ataques isquémicos transitorios y accidentes cerebrovasculares.
- Enfermedad arterial periférica.

Otras complicaciones crónicas de la Diabetes incluyen depresión, demencia y disfunción sexual ⁽²⁴⁾.

2.7. Tratamiento

2.7.1. Tratamiento No Farmacológico

Estudios realizados demuestran que las intervenciones en el estilo de vida, incluyendo la dieta y la actividad física, conducen a una reducción del 63% en la incidencia de la Diabetes en personas de alto riesgo.

Dieta

Es la base fundamental complementaria al tratamiento. Tiene un efecto positivo en la salud a largo plazo y la calidad de vida. El plan alimenticio debe establecerse de manera personalizada de acuerdo al estilo de vida del paciente y los objetivos del tratamiento con la finalidad de mantener un mejor control metabólico mediante un equilibrio entre la ingesta de alimentos, actividad física y la medicación para evitar complicaciones⁽¹³⁾.

Los pacientes con Diabetes *Mellitus* tipo 2, en su mayoría presentan sobrepeso u obesidad, por lo cual una disminución en el peso corporal ayuda a mejorar la glicemia, presión arterial y el perfil lipídico.

Ejercicio físico

La práctica de ejercicio físico adecuado ayuda a conseguir un mejor control metabólico a largo plazo mientras que va disminuyendo las concentraciones basales y post-prandiales de la glucosa; aumenta la sensibilidad a la insulina, permite reducir el peso, disminuye los factores de riesgo cardiovascular al mejorar el perfil lipídico y presión arterial ⁽²⁵⁾.

2.7.2. Tratamiento Farmacológico

El tratamiento farmacológico está dado por el uso de antidiabéticos orales para la DM2 y de insulina en el caso de DM1.

a) Sulfonilureas:

Son drogas que estimulan la secreción de insulina, independientemente del nivel de glucosa sanguínea, mediante las células del páncreas provocando un bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP donde causa desplazamiento de los gránulos secretores de la hormona a la superficie celular con expulsión de insulina al exterior por exocitosis por lo cual, se puede presentar hipoglicemia como efecto adverso más importante. También estimulan la liberación de somatostatinas, puede disminuir el glucagón, suprimir la gluconeogénesis hepática y aumentar la lipogénesis ^(20,26,27).

Se dividen en dos generaciones de fármacos:

- Primera generación:
 - Tolbutamida
 - Acetohexamida
 - Tolazaida
 - Clorpropamida
- Segunda generación
 - Glibenclamida
 - Glipizida
 - Glicazida
 - Glimepirida

b) Biguanidas:

Son compuestos que tienen 2 moléculas de guanidina, las drogas representativas de esta clase son: buformina, fenformina y metformina. Estos fármacos a nivel de la mitocondria activan el complejo enzimático proteína quinasa activada por AMP (AMPK) que inhibe la gluconeogénesis, estimula la captación de glucosa, aumentan la sensibilidad a la insulina en el tejido periférico, principalmente en el músculo estimulando la síntesis de glucógeno, a nivel gastrointestinal reduce la absorción de glucosa. Además, se ha visto que los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 aumentan su concentración en varios tejidos. Presenta también efectos

favorables sobre los lípidos con reducción de los triglicéridos, LDL, VLDL y colesterol total.

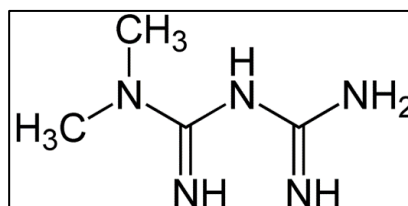


Figura N° 2. Estructura química de Metformina

Los efectos colaterales más comunes de la metformina son anorexia, náuseas, vómito, malestar abdominal y diarrea. Este fármaco es el más usado por tener menos riesgo de asociarse a acidosis láctica, siendo este el efecto colateral más serio del grupo de las biguanidas^(27,28).

c) Tiazolidinedionas o Glitazonas:

Éstas se unen al receptor PPAR γ y afecta los factores de transcripción influyen en la expresión de genes responsables para la producción de proteínas determinantes en el metabolismo de carbohidratos y lipoproteínas, esto lleva a un aumento de la GLUT1 y GLUT4 promoviendo la captación de glucosa en el musculo esquelético, tejido adiposo y en el hígado; de modo que reducen la resistencia a la insulina preferentemente en tejidos periféricos, graso y muscular, aunque también hepático, inhibiendo la gluconeogénesis hepática.

Las tiazolidinedionas presentan un costo más elevado que otros agentes utilizados para el tratamiento de la DM2. Los efectos secundarios más comunes incluyen sinusitis, faringitis e infección de tracto respiratorio.

Dentro de los fármacos representativos están la pioglitazona y rosiglitazona^(27,28).

d) Inhibidores de las α -glucosidasas:

Bloquean las enzimas α -glucosidasas, inhibiendo el desdoblamiento de los disacáridos en monosacáridos teniendo como consecuencia la disminución de la absorción de carbohidratos evitando la hiperglicemia post-prandial.

Los fármacos representantes de este grupo son: acarbosa, miglitol y voglibose; los dos primeros se encuentran disponibles en el mercado. Los efectos colaterales más frecuentes son flatulencia, dolor abdominal, diarrea; por lo que se recomienda iniciar con dosis bajas e incrementarlas paulatinamente hasta llegar a la dosis requerida. También las elevadas dosis de estos compuestos elevan los niveles de aminotransferasas, pero la función hepática retorna a lo normal cuando se suspende la administración^(27,28,20).

e) Insulina:

La insulina es necesaria para el metabolismo normal de carbohidratos, proteínas y lípidos. Medicamento es utilizada para el control del metabolismo de la glucosa sanguínea, es el tratamiento primario en todos los pacientes con DM1, en el caso de la DM2 la indicación para la terapia con insulina exógena debe incluir enfermedad o cirugía aguda, embarazo, toxicidad de glucosa, contraindicación o fracaso a los antidiabéticos orales. Se caracteriza por actuar de forma rápida durante un periodo corto⁽²⁹⁾.

La insulinoterapia debe iniciarse en los siguientes casos:

- Todo paciente con DM2 que presente hiperglicemia con valores entre 280 – 300 mg/dL, cetonuria o cetonemia.
- Pacientes sintomáticos con DM2 con hiperglicemia en ayunas entre 280 – 300 mg/dL. Después de 6-8 semanas se evaluará el cambio a un antidiabético oral, o bien continuar con insulina.
- Mujeres con Diabetes gestacional quienes no se han controlado, sólo con dieta⁽²⁸⁾.

En ambos tipos de Diabetes *Mellitus* considerando el control óptimo de la glicemia pre y post prandial, la insulinoterapia tiene como objetivo⁽³⁰⁾:

- Normalizar la glucosa en ayunas.
- Normalizar la glicemia post-prandial.
- Minimizar el riesgo de hipoglicemia.

- Reducir el riesgo de las complicaciones que presenta la enfermedad.
- Mantener los niveles de HbA1c entre 6-7%.
- Los niveles de glicemia en ayunas deben estar entre 70 – 120 mg/dL.
- El nivel de glicemia post-prandial debe ser menor de 160 mg/dL.

Otros fármacos para el tratamiento de Diabetes son los **inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4I)** retrasando la inactivación y degradación de GLP-1, las **meglitinidas** que se unen a ATP dependiente de K^+ , mecanismo similar de las sulfonilureas ocasionando una despolarización que abre los canales de Ca^{2+} , el aumento de calcio intracelular produce la migración de los gránulos secretores de insulina a la membrana celular donde excreta esta hormona por exocitosis. Por otro lado, los **inhibidores del cotransportador 2 de sodio y glucosa (SGLT2-I)** o glifozinas facilitan la excreción de glucosa en orina evitando su reabsorción⁽³¹⁾.

3. Páncreas

El páncreas es un órgano del aparato digestivo y del sistema endocrino en los vertebrados, localizado en la concavidad del duodeno, al que está unido por tejido conectivo y se extiende hasta el hilio del bazo. Este órgano se origina a partir de dos invaginaciones del tubo digestivo, tiene forma alargada y se divide en varias partes (*Figura N° 3*). Mide entre 15 a 20 cm de largo, 4 a 5 cm de grosor, con un peso que oscila entre 70 y 150 gramos. El páncreas se divide en una parte endocrina y otra exocrina^(32,33).

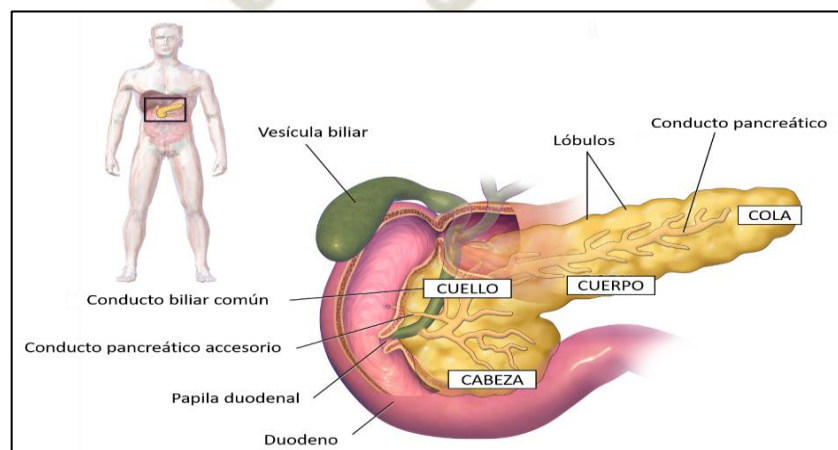


Figura N° 3. Partes del Páncreas.

3.1. Páncreas Exocrino

Constituida por numerosas porciones secretoras en forma de túbulos y acinos que desembocan en conductos excretores ramificados (conductos Wirsung y Santorini)⁽³⁴⁾. Esta porción es formada por células acinares y células centroacinares o ductales unidas por tejido conectivo con vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nerviosas (*Figura N° 4*). La secreción excretada por el páncreas exocrino se le conoce como “jugo pancreático”⁽³⁵⁾.

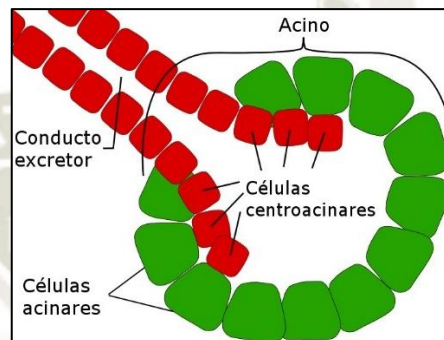


Figura N° 4. Células constituyentes del Páncreas Exocrino⁽³⁴⁾.

3.1.1. Células acinares

Sintetizan y liberan enzimas digestivas como tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas, nucleasas, amilasas y lipasas; responsables de la digestión de los macronutrientes: carbohidratos, proteínas y lípidos⁽³⁴⁾.

3.1.2. Células centroacinares

Sintetizan y liberan una solución buffer rica en bicarbonato, cuya función es neutralizar el pH ácido del contenido duodenal⁽³⁴⁾.

3.2. Páncreas Endocrino

La parte endocrina del páncreas se encuentra de forma dispersa entre la parte exocrina rodeada por ductos y acinos. Las células endocrinas se agrupan formando los denominados islotes pancreáticos o de Langerhans, cada islote posee una red capilar y está encapsulado por colágeno. El páncreas adulto contiene aproximadamente un millón de islotes, su diámetro es de 150 μm , se distribuyen por todo el páncreas, sin embargo, son más numerosos hacia la cola. Además, constituyen entre 5 a 20% de la masa celular pancreática.

En los islotes pancreáticos se diferencian 5 tipos de células principales^(35,36)
(Figura N° 5):

- Células Beta (β)
- Células Alfa (α)
- Células Delta (δ)
- Células PP
- Células Épsilon (ϵ)

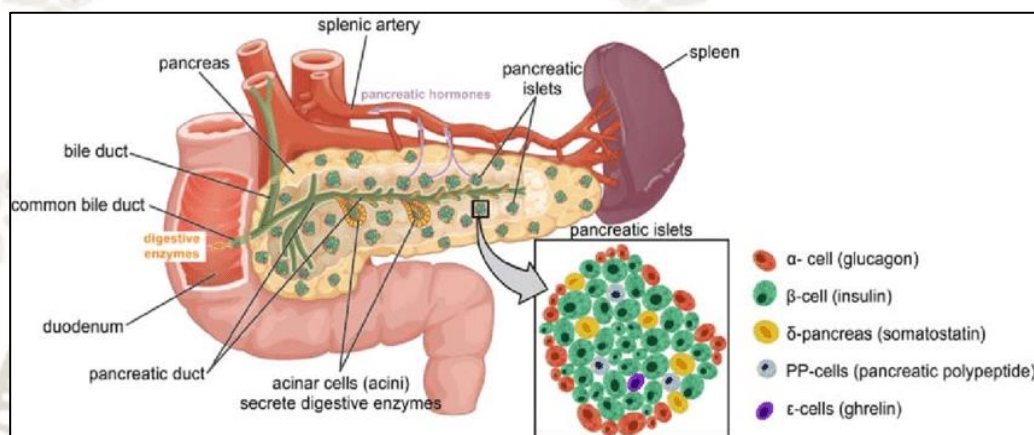


Figura N° 5. Fisiología del páncreas e Histología del páncreas endocrino⁽³⁵⁾.

3.2.1. Células Beta (β)

Son células que producen y liberan insulina y amilina en relación 100:1, hormonas que regulan el nivel de glucosa en la sangre, facilitando el uso de la glucosa por parte de las células y retirando el exceso de esta que se almacena en el hígado en forma de glucógeno, producen además tirotrópina (TRH), constituyen alrededor del 60 a 70% de las células de los islotes pancreáticos⁽³⁷⁾.

Insulina

Es una proteína con dos cadenas peptídicas A y B de 21 y 30 aminoácidos respectivamente, unidas por puentes disulfuro que provienen de los grupos de cisteína de ambas cadenas⁽³⁸⁾. La estructura se muestra en la *Figura N° 6*.

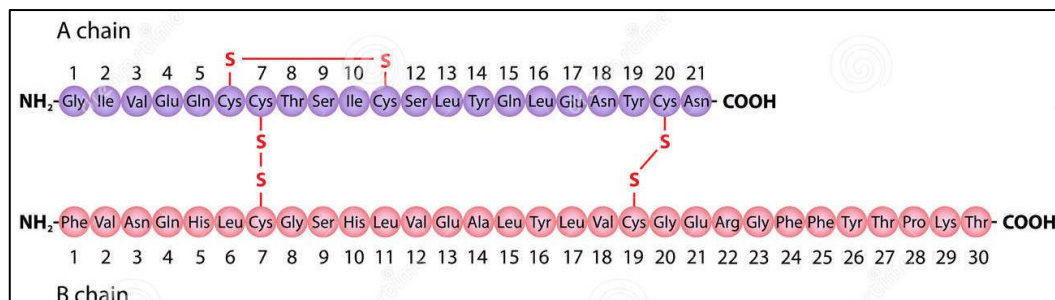


Figura N° 6. Estructura de la Insulina⁽³⁸⁾.

- **Síntesis y secreción:**

En las células diana como hígado, músculo y tejido adiposo se inicia la transducción de señales para la producción de insulina. La “preproinsulina” se sintetiza en el ribosoma del retículo endoplasmático rugoso (RER), codificada por el gen *INS*, localizado en el cromosoma 11p15.5, esta primera forma de insulina se rompe para dar una cadena más corta con dos enlaces intracatenarios mediante puentes disulfuro, esta molécula se denomina “proinsulina” que es almacenada en los gránulos de secreción y mediante la separación de una parte de la cadena que se denomina péptido C se convierte en “insulina”.

La insulina es secretada mediante exocitosis en respuesta a un incremento de glucosa en sangre, se secreta a la vena porta hepática alcanzando el hígado directamente. Sin embargo, también ocurre una liberación sostenida y lenta independiente de la cantidad de glucosa sanguínea. Su vida media es de 10 minutos aproximadamente^(38,35).

- **Mecanismo de acción**

El receptor de la insulina es una proteína tetramérica compuesta de 2 subunidades α y 2 subunidades β situado en la membrana celular del tejido hepático, muscular y adiposo.

Las subunidades β son las que poseen función catalítica y las subunidades α tienen función regulatoria sobre las β al mantenerlas inhibidas. Al unirse la insulina, las subunidades α pierden su función inhibitoria y las subunidades β ejercen su acción catalítica tirosín-cinasa donde ambas subunidades se transfosforilan en 6 o 7

residuos de tirosina dándose así el efecto biológico de la insulina. La regulación negativa sobre la respuesta biológica a la insulina se da por la fosforilación de serina y treonina de las subunidades β ⁽³⁹⁾. Este mecanismo biológico se muestra en la *Figura N° 7*.

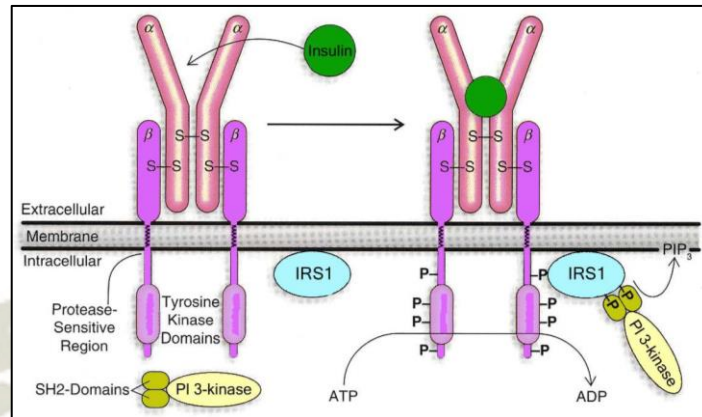


Figura N° 7. Mecanismo de acción de la Insulina⁽³⁹⁾.

- **Efectos:**

- En el hígado:

Estimula el almacenamiento de glucosa por medio de la síntesis de glucógeno. Además, induce la síntesis de triglicéridos y VLDL.

Inhibe la glucogenólisis y la cetogénesis.

- En los músculos:

Incrementa la síntesis de glucógeno al aumentar la captación de glucosa en el musculo esquelético. También estimula la síntesis de proteínas al aumentar el transporte de aminoácidos.

- En el tejido adiposo:

Favorece la síntesis de triglicéridos estimulando la producción de acetyl-CoA (al acelerar la glucólisis) y también estimula la síntesis de ácidos grasos (componentes de los triacilglicerolos) a partir de la acetyl-CoA. Aumenta el transporte de glucosa⁽³⁸⁾.

3.2.2. Células Alfa (α)

Representan entre 10 y 20% de células del islote y se distribuyen de forma periférica. Estas células sintetizan y liberan glucagón de sus gránulos secretores. El glucagón aumenta el nivel de glucosa sanguínea al estimular

la formación de este carbohidrato a partir del glucógeno almacenado en hepatocitos. También tiene efecto en el metabolismo de las proteínas y grasas. La liberación del glucagón es inhibida por la hiperglicemia⁽³⁶⁾.

Glucagón

Hormona peptídica lineal que contiene 29 aminoácidos con un peso molecular de 3485 dalton, es sintetizado por las células alfa en los islotes de Langerhans (*Figura N° 8*)⁽³⁷⁾.

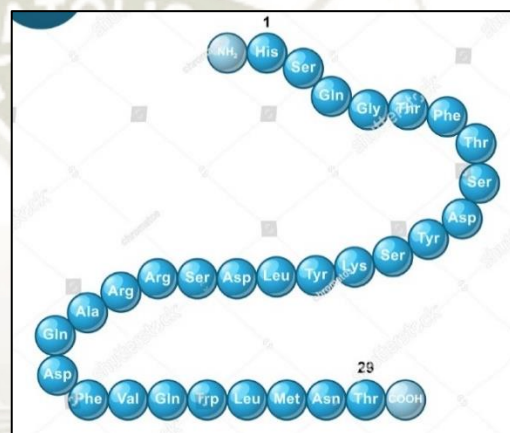


Figura N° 8. Estructura del Glucagón.

- **Síntesis y secreción:**

El glucagón es producto de la maduración de ARN de un precursor inicial denominado “preproglucagón”, este se origina del gen *GCG* localizado en el cromosoma 2. Cuando ocurre la transducción de ARN se origina el “proglucagón” (forma inactiva del glucagón) que se procesa por medio de una ruptura proteolítica dando lugar al glucagón y péptidos biológicamente inactivos. El gen del proglucagón es expresado también en el intestino delgado por las células L, donde la proteólisis forma péptidos similares al glucagón llamados también “enteroglucagón”, tales como GLP-1, GLP-2 y la oxintomodulina.

El glucagón es secretado por las células alfa del páncreas y el principal estímulo para su liberación son los niveles bajos de glucosa en la sangre, aunque también es debido al aumento de concentraciones de aminoácidos. Esta secreción está modulada por

los péptidos intestinales GLP-1 que la inhibe y la oxintomodulina y GIP que la aumenta^(40,41).

- **Efectos:**

El glucagón ejerce su acción principalmente sobre el hígado y tejido adiposo:

- Efecto hiperglicemiante debido a que estimula la glucogenólisis e inhibe la glucogenogénesis y glucólisis.
- En el hígado estimula la captación de aminoácidos para aumentar la producción de glucosa.
- Induce la gluconeogénesis y a consecuencia da lugar a su efecto cetogénico permitiendo la oxidación de ácidos grasos.

Además, ejerce también efecto sobre musculo liso induciendo relajación intestinal aguda⁽⁴¹⁾.

3.2.3. Células Delta (δ)

Constituyen alrededor de 5 a 10% de las células de los islotes. Poseen gránulos secretores más grandes que liberan somatostatina (SS), neurohormona peptídica y neurotransmisora, que regula de forma negativa la producción y liberación de la insulina por las células β , así como la producción y liberación de glucagón por las células alfa. La regulación mutua de la actividad secretora de las células α , β y δ se le conoce como regulación paracrina⁽³⁶⁾.

Somatostatina

Es un péptido de 14 y 28 aminoácidos que posee estructura cíclica por una unión intramolecular de puentes disulfuro entre residuos de cisteína⁽³⁶⁾ (*Figura N° 9*).

- **Síntesis y secreción:**

Hormona sintetizada por neuronas hipotalámicas, células delta del páncreas y células endocrinas de la mucosa gastrointestinal. Su precursor inicial es la “preprosomatostatina” que se transforma en “prosomatostatina” dentro el aparato de Golgi, luego esta

prohormona es dividida generando como productos finales somatostatina 14 (SS-14) y somatostatina 28 (SS-28), hormonas biológicamente activas⁽⁴²⁾.

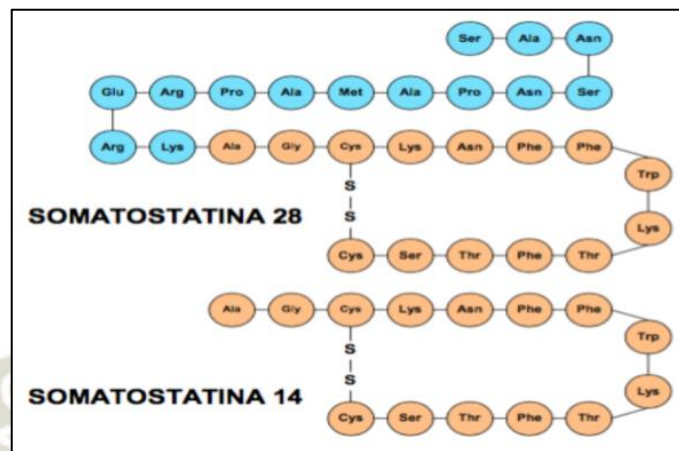


Figura N° 9. Estructura de SS-14 y SS-28⁽³⁶⁾.

La secreción de SS está regulada por niveles altos de glucosa, aminoácidos, glucagón, ácidos grasos libres y hormonas gastrointestinales como secretina, gastrina⁽⁴³⁾.

- **Efectos:**

Inhibe la secreción de glucagón, insulina y polipéptido pancreático en el páncreas, por medio de la regulación paracrina.

Disminuye la secreción de enzimas digestivas y buffer bicarbonato a nivel del páncreas exocrino⁽⁴²⁾.

3.2.4. Células Polipéptido Pancreático (PP o F)

Se encuentran en la periferia del islote. Producen y liberan el polipéptido pancreático que controla y regula la secreción exocrina del páncreas, además reduce el vaciamiento gástrico y la actividad motora del intestino por acción en el receptor PPYR1⁽³⁶⁾.

3.2.5. Células Épsilon (ϵ)

Produce y libera grelina, hormona que induce la sensación de hambre, modula la relajación receptiva de las fibras musculares lisas externas del tracto gastrointestinal. La hormona que se produce por estas células es liberada al torrente sanguíneo y transportadas al hígado y estómago⁽³⁶⁾.

4. Radicales Libres y Estrés Oxidativo

Los radicales libres dentro de un sistema biológico son importantes para la función celular, la defensa y la supervivencia de los seres vivos. Sin embargo, un exceso de estos conlleva al desarrollo de Estrés Oxidativo, fenómeno común que está asociado con el desarrollo de enfermedades crónicas metabólicas - degenerativas y le atribuye un papel crucial tanto en el inicio como en la progresión de la Diabetes y complicaciones asociadas^(3,44).

4.1. Radicales Libres

Se denominan radicales libres a aquellas moléculas que poseen un electrón desapareado en su orbital más externo. Su inestabilidad les confiere una capacidad de reacción muy elevada, por lo que son capaces de actuar en los sistemas biológicos produciendo cambios en la composición química o en la estructura de los elementos celulares que los hace incompatibles con la vida⁽⁴⁵⁾.

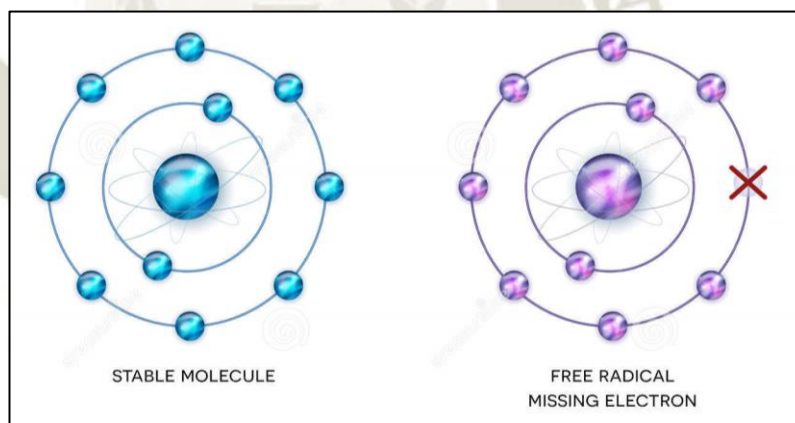


Figura N° 10. Estructura de una molécula estable y un radical libre.

Estos radicales libres reaccionan con especies químicamente estables tomando un electrón de estas moléculas para aparear el suyo resultando la génesis de otro radical, esta reacción se da en cadena por el tiempo corto de vida media de los radicales libres que se conoce como “formación en cascada”, se pueden generar a nivel intracelular y extracelular⁽⁴⁶⁾. Dentro de las principales sustancias prooxidantes se conocen: Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), de nitrógeno (RNS), de hierro (RIS), de cobre (RCS) y cloro (RCIS); sin embargo, los derivados de la molécula del oxígeno (O_2) son los que tienen mayor importancia en la patología humana (Tabla N° 4). En cantidades moderadas, las ROS están

involucradas en una serie de procesos fisiológicos que producen las respuestas celulares deseadas participando en la fagocitosis, síntesis de colágeno y prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas, favorecen la quimiotaxis, entre otros. Sin embargo, grandes cantidades de ROS en un sistema biológico pueden conducir al daño celular de lípidos, membranas, proteínas y ADN^(47,48).

Tabla 4. Ejemplos de Radicales Libres⁽⁴⁶⁾.

Radical Libre	Nombre	Molécula diana
O_2^-	Superóxido	Enzimas
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno	Ácidos grasos insaturados
$OH\cdot$	Hidroxilo	Todas las moléculas
$R\cdot$	R-ilo	Ácidos grasos insaturados
$RO\cdot$	R-oxilo (alcoxilo)	Ácidos grasos insaturados
$ROO\cdot$	R-dioxilo (peroxilo)	Ácidos grasos insaturados
$ROOH\cdot$	Hidroperóxido	Ácidos grasos insaturados
$O\cdot$	Singlete de oxígeno	Diferentes moléculas
$NO\cdot$	Nitroxilo	Diferentes moléculas
$ONOO\cdot$	Peroxinitrato	ADN

4.2. Estrés Oxidativo

Se describe como un desequilibrio entre el balance de sustancias prooxidantes y los mecanismos antioxidantes de las células y los tejidos, es el resultado de la producción excesiva de radicales libres oxidativos y ROS asociadas, o una disminución en las defensas antioxidantes endógenas, o ambas. El resultado de este desequilibrio es la modificación de la estructura y función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado, lo que conduce a una disfunción celular ocasionando metabolismo energético alterado, señalización celular alterada, mecanismos de transporte celular deteriorados y actividad biológica disfuncional general, activación inmunológica e inflamación; promoviendo daño potencial en el organismo^(1,45,46).

El daño celular producido por estas sustancias prooxidantes afecta a diferentes macromoléculas:

- **Lípidos:**

Se conoce como peroxidación lipídica o lipoperoxidación a la degradación oxidativa de los lípidos donde se ven afectadas las estructuras que poseen abundantes ácidos grasos poliinsaturados, alterando la permeabilidad de la membrana produciendo edema y muerte celular⁽⁴⁶⁾.

- **Proteínas:**

Los radicales libres ocasionan la oxidación de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina, metionina, prolina, arginina, lisina y cisteína; como consecuencia se produce la conversión de un aminoácido por otro o forman grupos carbonilo lo que da lugar al envejecimiento celular⁽⁴⁹⁾.

- **Ácido desoxirribonucleico (ADN):**

Las mutaciones son fenómenos provocados por acción de los radicales libres que conllevan a la pérdida de la expresión o síntesis de proteínas por daño a un gen específico, modificación oxidativa de las bases nitrogenadas, deleciones y fragmentaciones. El daño ocasionado puede inactivar también algunos genes supresores de tumores conduciendo a la iniciación, progresión, o ambas de la carcinogénesis⁽⁴⁹⁾.

Ha sido comprobado que el estrés oxidativo se relaciona con la mayoría de enfermedades crónicas tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, Diabetes, enfermedades inflamatorias y urolitiasis, ya sea como causa primaria o factor asociado en el progreso de la enfermedad⁽³⁾.

4.3. Antioxidantes

Un antioxidante es definido como un captador de radicales libres, tiene la capacidad de donar electrones para neutralizar estas sustancias previniendo o retardando la oxidación de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos; actúan como *scavengers* con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante^(45,50).

Según su naturaleza, los antioxidantes se clasifican en dos grupos⁽⁵¹⁾:

4.3.1. Antioxidantes enzimáticos

Son enzimas capaces de eliminar o neutralizar especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, consideradas como la primera línea de defensa del organismo frente a los radicales libres. Dentro de ellas encontramos la catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y el sistema glutatión⁽⁵¹⁾.

- **Catalasa:**

Se encuentra en elevada concentración en hígado y riñón, posee función catalítica y peroxidativa formando parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa frente a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁽⁴⁶⁾.

- **Superóxido dismutasa (SOD):**

Su distribución en el organismo es amplia. Se encuentra formada por enzimas metaloides: Cu-SOD, Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD que contienen cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn) y hierro (Fe) en su sitio activo. Estas enzimas actúan dismutando el oxígeno para formar H_2O_2 con la finalidad de proteger al organismo contra el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)⁽⁴⁶⁾.

- **Sistema Glutatión:**

Incluye glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRD), glutatión transferasa (GST) y glutatión (GSH). Principal antioxidante celular que reacciona con las ROS. La GPx degrada los peróxidos en el sistema nervioso y cataliza la descomposición de H_2O_2 y peróxidos orgánicos, la GRD cataliza la reducción del glutatión oxidado manteniendo el nivel de GSH en la célula y la GST conjuga el GSH en varios compuestos orgánicos, estos tienen la finalidad de reducir hidroperóxidos⁽⁵²⁾.

4.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

Son la segunda línea de defensa del organismo. Impiden la formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno eliminando el inicio y propagación de la cascada de reacciones que generan radicales libres⁽⁴⁹⁾.

- **Endógenos:**

Dentro de ellos se encuentran glutatión, NADPH, ácido úrico, ácido dihidrolipoico, melatonina, Co-enzima Q (ubiquinol), tocoferoles, ácido ascórbico, carotenos, albúmina, ceruloplasmina y ácidos grasos; son biosintetizados por el organismo humano, pero también están contenidos dentro de la dieta⁽⁵⁰⁾.

- **Exógenos:**

Son moléculas que provienen de la dieta capaces de reaccionar con los radicales libres previniendo los efectos adversos de las especies reactivas. Se clasifican esencialmente en⁽⁵³⁾:

- Vitaminas antioxidantes: ácido ascórbico (vitamina C), alfa tocoferol (vitamina E) y beta caroteno (pro-vitamina A)
- Carotenoides: luteína, zeaxantina, licopeno.
- Polifenoles: flavonoides, antocianinas, taninos, lignanos, cumarinas, quinonas.
- Glucosinolatos como los isotiocianatos y compuestos orgánicos azufrados.

4.3.3. Vitamina E

Se denomina vitamina E a un grupo de ocho estereoisómeros liposolubles: alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ) tocoferol y sus correspondientes tocotrienoles. Todos estos compuestos tienen un anillo aromático “cromano” con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide (*Figura N° 11*), si esta cadena es saturada, los isómeros son tocoferoles, y si es insaturada se denomina tocotrienoles⁽⁵⁴⁾.

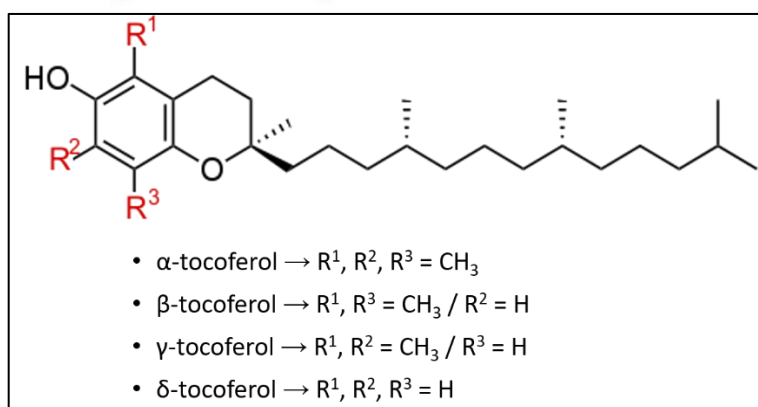


Figura N° 11. Estructura química de la Vitamina E.

Dentro de estos compuestos de la Vitamina E, la forma con mayor actividad biológica es el **α -tocoferol** y constituye el estándar de comparación con el resto de antioxidantes liposolubles. Es el principal antioxidante de las membranas celulares, su actividad se debe al poder reductor del grupo hidroxilo (-OH) de su anillo cromano impidiendo que los radicales peroxilo (ROO \cdot) y alcoxilo (RO \cdot), principales causantes de la peroxidación lipídica, oxiden sustancias orgánicas evitando la formación en cascada de radicales libres. Para ambos radicales al reaccionar con la vitamina E hacen que esta se convierta en radical tocoferilo (Vitamina E - O \cdot) y luego pase a su forma reducida de la vitamina E (Vitamina E - OH) por mecanismos regeneradores manteniendo el equilibrio redox. La función *in vivo* de la vitamina E está dada sobre orgánulos y tejidos que contienen abundantes ácidos grasos poliinsaturados en su estructura, con la finalidad de evitar su degradación oxidativa^(53,54).

La vitamina E se encuentra naturalmente presente en los aceites vegetales siendo esta su principal fuente, frutos secos como maní, avellanas, almendras, girasol; hortalizas de hojas verdes, ciertos cereales y productos fortificados con esta vitamina. La cantidad recomendada de consumo para un adulto es de 15 mg o 22.4 UI por kilogramo de peso, la fuente puede provenir de alimentos o de suplementos que contienen vitamina E⁽⁵⁵⁾.

En los últimos años se ha investigado que la vitamina E previene y/o puede ser usada como tratamiento para enfermedades neurodegenerativas, anemia, angina de pecho, asma, aterosclerosis, cáncer, Diabetes, enfermedad renal, enfermedad hepática, dislipidemias, artrosis y artritis; y para sus complicaciones asociadas⁽⁵⁶⁾.

4.4. Estrés oxidativo en el desarrollo de Diabetes

Las células beta son susceptibles a EO por la baja expresión de antioxidantes intracelulares comparado con las células de otros tejidos del organismo. Frente a condiciones de EO, el daño celular afecta la función de las células pancreáticas debido al deterioro en la expresión de enzimas antioxidantes por lo que las vuelve más sensibles al ataque de ROS y RNS. Las ROS y RNS son productos del

metabolismo celular, reconocidas por su doble papel como especies beneficiosas y nocivas. Por ejemplo, ROS como H_2O_2 y O_2^- y RNS como NO^* , intervienen en el proceso de transducción de señales en las células beta del páncreas y regulan la secreción de insulina estimulada por la presencia de glucosa; sin embargo, una excesiva síntesis de estos radicales libres promueve disfunción mitocondrial y metabólica teniendo como principal consecuencia la reducción de la secreción de insulina y su señalización en tejidos diana. Además, ocurre disfunción de las células beta e intolerancia a la glucosa que puede conducir finalmente al estado de enfermedad diabética^(44,49,45).

Existe una creciente evidencia de que el exceso de generación de ROS y RNS en gran parte es debido a la hiperglicemia que causa estrés oxidativo en una variedad de tejidos lo cual se encuentra estrechamente asociado con la inflamación crónica de estos, cumpliendo un rol importante en las complicaciones asociadas a la enfermedad. Múltiples vías de señalización contribuyen al desarrollo de efectos adversos generados por la glucotoxicidad⁽⁵⁷⁾.

4.4.1. Estrés oxidativo en Diabetes Mellitus Tipo 1

Células del sistema inmunológico como linfocitos, macrófagos y neutrófilos; por medio de la respuesta inflamatoria con la producción de ROS y RNS eliminan los agentes patógenos. En la DM1 por influencia de los factores ambientales, la dieta y un desequilibrio en el sistema oxidante/antioxidante ocasiona respuestas inmunitarias inapropiadas de los linfocitos autorreactivos a antígenos desencadenando un ataque autoinmune a las células β pancreáticas. Este ataque inicia y contribuye con la progresión de la enfermedad. La inflamación causada en las células beta se asocia con niveles elevados de citoquinas proinflamatorias como interleucina (IL) 1β , IL-6, IL-10, IL-17, Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) y el Interferón gamma (IFN γ) que se unen con sus receptores de membrana activando las vías de señalización intracelular. Estudios han demostrado que IL- 1β sola o asociada a TNF- α e IFN γ , son potentes supresores de la secreción de insulina y promueven la disfunción y muerte celular de las células beta, de esta manera se activan diferentes vías de señalización, como por ejemplo el Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ B), generando

nuevamente la formación de ROS, RNS y citoquinas que contribuyen a un mayor estrés oxidativo el cual de nuevo induce inflamación y muerte celular; mecanismo que se produce de forma cíclica^(49,58).

4.4.2. Estrés oxidativo en Diabetes Mellitus Tipo 2

Como ya se conoce la DM2 es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglicemia crónica secundaria a la resistencia a la insulina. Esto representa una disminución en la respuesta de los tejidos a la acción de la insulina, principalmente en el tejido muscular, hepático y adiposo.

Existen fallas en la regulación del metabolismo, lo que causa una exposición crónica de las células beta al aumento de la glucosa, ácidos grasos libres (FFA) y citoquinas como la IL-1 β , esto resulta en estrés oxidativo o inducción de estrés del RE en las células del páncreas, donde el aumento de la producción de ROS altera el equilibrio oxidante/antioxidante haciendo que se produzca la oxidación de proteínas, carbohidratos y lípidos; teniendo como resultado una condición prooxidativa, esta es la que desencadenará el inicio de la enfermedad conduciendo a la activación de vías de señalización de la muerte celular en donde se tiene como resultado la reducción eventual de la masa de las células β del páncreas.

Con la disminución de las células beta y a consecuencia la resistencia a la insulina, la generación de hiperglicemia hace que se potencie el estrés oxidativo en las células pancreáticas, esto es conocido como mecanismo de **glucotoxicidad**. La producción excesiva de radicales libres por la cadena mitocondrial reduce la actividad de la enzima Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), al inhibir su actividad hay un aumento en las concentraciones de glucosa en sangre, origina una reacción en cadena en la que se reduce la concentración de NADPH y esto conduce a una reducción de los mecanismos antioxidantes.

Varios estudios han demostrado que, en presencia de hiperglicemia, los ácidos grasos libres pueden provocar la muerte de las células β pancreáticas a través de la apoptosis. La elevada concentración de FFA en el páncreas aumentan la secreción de insulina, pero esto ocurre con niveles

elevados de glucosa durante un tiempo prolongado lo que ocasiona disfunción celular, teniendo como consecuencia la inhibición de la secreción de insulina, inhibición de los genes de diferenciación celular de las células pancreáticas y activación de la apoptosis, todo este proceso se denomina **lipotoxicidad** ^(59,60,61).

4.4.3. Vitamina E y Diabetes

Se conoce que el estrés oxidativo contribuye a la progresión de la Diabetes *Mellitus* causando daño a órganos y tejidos, dentro de los que podemos incluir páncreas, cerebro, ojos, nervios periféricos y riñones. Se sabe también que la vitamina E, en especial el α y γ tocoferol, son las sustancias liposolubles que poseen gran actividad antioxidante.

Estudios han confirmado que existe relación entre el bajo nivel de vitamina E y el mayor riesgo de padecer Diabetes *Mellitus*. El α -tocoferol puede ser utilizado como protector frente a la enfermedad. Análisis indicaron que a dosis altas de vitamina E, mayor a 400 UI por día, suplementada por largos periodos, alrededor de 12 semanas, redujeron significativamente el nivel de HbA1c y la concentración de insulina en ayunas, sugiriendo que la vitamina E podría posiblemente mejorar la acción de la insulina y eliminación de glucosa en individuos con Diabetes *Mellitus*. Otros estudios indican que la suplementación con vitamina E reduce significativamente el riesgo de eventos cardiovasculares como infarto al miocardio, derrames cerebrales y muerte por estas causas ^(54,62).

La protección que ejerce la vitamina E contra el estrés oxidativo:

- **Concentraciones intracelulares de ROS**

El tratamiento con vitamina E se usa principalmente para la inhibición de la oxidación de LDL en la aterosclerosis y para la reducción de radicales superóxido $O_2^{\cdot-}$ en el hígado (dosis dependiente). Además, reduce las concentraciones de glucosa, insulina y peróxido H_2O_2 en el plasma a largo plazo ⁽⁶³⁾.

- **Peroxidación lipídica**

Dado que la vitamina E se encuentra en la membrana celular su función principal es reducir la peroxidación lipídica. Se observó en un

modelo animal que las células endoteliales bajo condiciones de hiperglicemia presentaban mayor cantidad de F₂-isoprostanos y malondialdehído (MDA), marcadores de esta afección. En ratas diabéticas inducida por estreptozotocina (STZ) al ser tratadas con vitamina E presentaron una reducción significativa de F₂-isoprostanos en plasma y orina, además de disminuir las LDL y VLDL. Se llegó a la conclusión que la vitamina E no solo reduce el estrés oxidativo y el daño que este puede ocasionar, sino también previene los efectos biológicos nocivos causados por los productos de peroxidación lipídica^(64,65).

- **Oxidación de proteínas**

Bajo condiciones de EO, las proteínas sufren alteración de su estructura y como consecuencia afecta su función. El uso de antioxidantes como vitamina E disminuye los niveles de proteínas oxidadas, esto se mide por cuantificación del contenido de carbonilo en las proteínas con 2,4-dinitrofenilhidrazina; al parecer esta vitamina ayuda a reducir el contenido de carbonilo dando como resultado una disminución de microangiopatía desarrollada a consecuencia de DM1. En la DM2 puede inhibir la glicación de la hemoglobina por inhibición de la formación de MDA^(64,66).

- **Daño al ADN**

La Diabetes *Mellitus* está muy relacionado al riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer ya que el aumento del estrés oxidativo causa oxidación del ADN principalmente en los tejidos mitóticos, ocasionando de esta forma mutaciones en los genes, como producto de la oxidación se obtiene 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG), biomarcador de oxidación de ADN y de posible desarrollo de carcinogénesis. La oxidación del ADN *in vivo* puede proporcionar evidencia de que la vitamina E reduce potencialmente la mutación en los tejidos por una disminución de 8-OH-dG en pacientes que padecen DM1 o DM2⁽⁶⁷⁾.

Existen evidencias de que la vitamina E además de ser un antioxidante primario de la membrana celular, influye también en el sistema de defensa

antioxidante endógeno que está regulado por el Factor Nuclear Eritroide 2 – relacionado con el factor 2 (Nrf2) activándolo. La vía Nrf2 se activa como respuesta antioxidante frente a niveles elevados del RL, tiene efecto protector frente a diversas enfermedades dentro de ellas la Diabetes *Mellitus*, la inducción de esta vía impide la proliferación en cascada de ROS sobre las células endoteliales y en el páncreas incrementa las enzimas antioxidantes, en ambos casos evita que haya producción de citoquinas y chemoquinas inducidas por $\text{NO}\cdot$ y H_2O_2 . También la activación de Nrf2 hace que la insulina proteja a las células endoteliales del cerebro humano frente a la hiperglicemia. La activación de esta vía por la vitamina E podría estar dada por un mecanismo indirecto de protección contra el estrés oxidativo producido por los niveles elevados de glucosa, donde favorecería la disminución de la degradación de proteínas y confiriéndole mayor estabilidad al ARN_m estimulando la transcripción de este para codificar enzimas antioxidantes como GPx y SOD; es por ello que se ha demostrado la influencia de esta vitamina sobre el sistema de defensa antioxidante endógeno. Además, actúa como ligando sobre $\text{PPAR}_{\gamma/\beta/\delta}$, aumentando la captación de glucosa por las células musculares, adipocitos y hepatocitos disminuyendo la hiperglicemia. Sin embargo, esta vía también ejerce protección sobre las células beta mediante la inhibición de $\text{NF}\kappa\text{B}$ y $\text{TNF}\alpha$ disminuyendo su inflamación. Estos mecanismos le confieren a la vitamina E efectos protectores frente a la Diabetes y sus complicaciones^(68,69,70,71).

5. Diabetes Experimental

El uso de agentes químicos para producir DB permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético en animales de experimentación.

Existen varias clases de agentes químicos:

- Los primeros son sustancias con citotoxicidad específica que destruyen a las células β del páncreas y causan un estado de deficiencia primaria de insulina como la estreptozotocina o aloxano.

- El segundo grupo lo constituyen agentes que actúan sobre las células beta, pero no las destruyen. Este es el caso de asociación de nicotinamida con STZ o aloxano.
- Una tercera clase incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitan al páncreas y como consecuencia se produce la Diabetes. Este último grupo incluye a las hormonas antagonistas de la insulina y anticuerpos anti-insulina⁽⁷²⁾.

5.1. Estreptozotocina (STZ)

5.1.1. Definición

Es una sustancia selectiva de las células beta, que en ciertas especies de animales causa *Diabetes Mellitus*, es usado también como agente antineoplásico por su acción citotóxica sobre las células beta del páncreas. Se fija a la membrana celular de las células β causando deficiencia de insulina, hiperglicemia, polidipsia y poliuria como síntomas principales de la enfermedad⁽⁷³⁾.

La sensibilidad de la STZ para inducir DB varía según la cepa, sexo, edad, estado nutricional y especie del animal; así como también influye la dosis y la vía de administración para el tipo de DB que se desea inducir⁽⁷⁴⁾.

5.1.2. Origen y características fisicoquímicas

Llamado estreptozotocina, es un antibiótico producido por *Streptomyces achromogenes*. Tiene como nombre químico N-(metil-nitrosocarbamoil)- α -D-glucosamina, fórmula $C_8H_{15}N_3O_7$ y peso molecular de 265.22 g/mol⁽⁷⁴⁾. Su estructura química se muestra en la *Figura N° 12*. La presentación es en forma de polvo cristalino, soluble en alcohol, cloruro de sodio y medianamente soluble en agua. El contacto de la sustancia disuelta con la luz hace que se degrade y pierda efectividad⁽⁷⁶⁾.

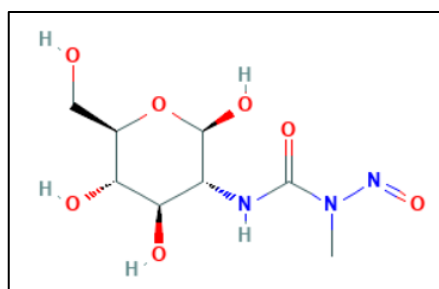


Figura N° 12. Estructura química de la Estreptozotocina

5.1.3. Mecanismo de acción

La STZ ingresa por medio del transportador de glucosa (GLUT2) a las células beta del páncreas. Su acción intracelular induce cambios en el ADN de estas células provocando su fragmentación, siendo el principal mecanismo la alquilación de ADN, este está relacionado con el resto de nitrosoúrea de la STZ. Sin embargo, este compuesto luego de ser metabolizado dentro de la célula, con ayuda de la NO sintasa dona NO que ingresa a la mitocondria donde inhibe el ciclo de Krebs ocasionando la desfosforilación de ATP, a consecuencia hay un aumento de xantina oxidasa (XOD), enzima que cataliza la reacción que da lugar a la formación del anión O_2^- , H_2O_2 y radicales $OH\cdot$. La acción sinérgica de NO y ROS forman también peroxinitrato $ONOO\cdot$ altamente tóxico, todos estos radicales libres contribuyen a la fragmentación de ADN⁽⁷⁷⁾.

El daño ocasionado al ADN activa la poli ADP-ribosilación causando una disminución de los niveles del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) y de ATP al disminuir tanto su síntesis como incrementar su hidrólisis, causando daño en los islotes de Langerhans con posterior inhibición de la síntesis y secreción de insulina. Este daño no puede ser reparado fisiológicamente llevando a cabo la destrucción de estas células. Por lo tanto, se afirma que la activación de la poli ADP-ribosilación por las especies reactivas formadas de nitrógeno y oxígeno es el principal mecanismo de diabetogenicidad de la STZ^(48,78).

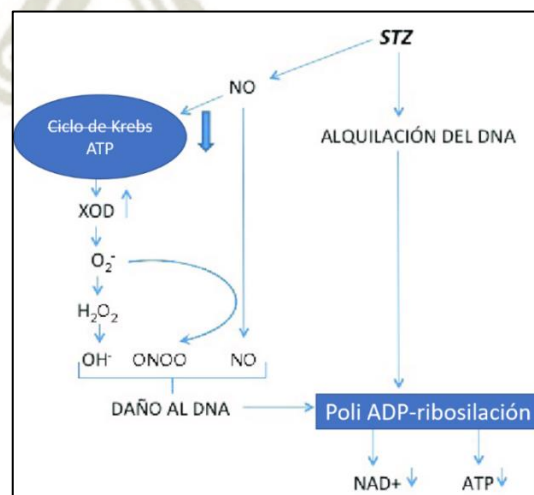


Figura N° 13. Mecanismo de acción de Estreptozotocina

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de la investigación

Esta investigación fue realizada en el Bioterio de la Universidad Católica de Santa María; la actividad antioxidante, la obtención de extractos y las pruebas cromatográficas en los laboratorios H-203 (Farmacotecnia), H-102 (Farmacognosia) y H-202 (Laboratorio de Investigación “Proyecto Mercurio”), Laboratorios de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas entre los meses de Setiembre – Diciembre del 2019.

2. Materiales

2.1. Material Vegetal

- Semillas de *Punica granatum L.* “Granada”, procedentes del “Mercado Central”, Provincia Cusco, Cusco – Perú.

2.2. Material Biológico

- Ratas machos Wistar, con un peso entre 220 – 305 g de 4 meses de edad, procedentes del Bioterio de la Universidad Católica de Santa María.

2.3. Equipos de Laboratorio

- Balanza analítica dual Sartorius.
- Balanza para pesar ratas.
- Cabina para UV 254/366 nm Camag.
- Cocina eléctrica.
- Cromatógrafo en fase gaseosa acoplado a espectrofotómetro de masas GCMS-QP2010 SE Shimadzu
- Equipo de extracción Soxhlet.
- Equipo de Rotavapor Scilogex RE100-Pro.
- Espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis.
- Estufa Memmert.
- Glucómetro Accu-Check® Performa Nano.

- Licuadora.
- Tiras reactivas Accu-Check® Performa Nano.

2.4. Materiales de Laboratorio

- Baguetas
- Beakers de 50 mL, 100 mL y 250 mL
- Capilares
- Cuba cromatográfica
- Espátula
- Fiolas de 5 mL y 50 mL
- Fiolas de 5 mL, 10 mL y 25 mL ámbar
- Gradilla para tubos de ensayo
- Llaves para soporte universal
- Matraces Erlenmeyer 250 mL
- Micropipeta de 200 μ L y de 1000 μ L (Eppendorf)
- Mortero de porcelana
- Pinzas
- Pipetas de 2 mL, 5 mL y 10 mL
- Pizetas
- Probeta de 100 mL
- Propipeta
- Soporte universal
- Tips azules (1000 μ L) y amarillos (250 μ L)
- Tubos de ensayo
- Tubos Eppendorf 1.5 mL

2.5. Material Anexo

- Agujas N° 18
- Algodón
- Barbijos
- Cúter
- Frascos de vidrio
- Frascos de plástico

- Frascos ámbar
- Guantes de nitrilo
- Hilo
- Jaulas metálicas
- Jeringas 1 mL, 3 mL, 5 mL y 10 mL
- Marcador indeleble
- Ollas de metal
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Regla
- Sonda orogástrica
- Sprayador

2.6. Tratamientos y Fármacos

- Extractos de hojas de *Punica granatum L.* “Granada” (etanol, acetato de etilo y hexano)
- DL- α - tocoferol acetato Q.P. (Merck)
- Aceite vegetal

2.7. Reactivos de Laboratorio

- 2-aminoetil difenil borinato Q.P. (Sigma)
- Acetato de Etilo Q.P. (Merck)
- Acetona P.A. (Merck)
- Ácido acético glacial P.A. (Merck)
- Ácido fórmico P.A. (Merck)
- Ácido sulfúrico concentrado P.A. (Merck)
- Agua destilada
- Anhídrido acético
- Cloroformo P.A. (Merck)
- Cloruro de aluminio 1%
- Cloruro férrico 3%
- Dietilamina Q.P. (Sigma)
- Dietiléter P.A. (Merck)

- DPPH, free radical P.A. (Calbiochem)
- Estreptozotocina Q.P. (Merck Millipore)
- Etanol 96° Q.P. (J.T. Baker)
- Etanol absoluto P.A. (J.T. Baker)
- Formol 10%
- Hexano P.A. (J.T. Baker)
- Metanol Q.P. (Merck)
- Nitrato de bismuto P.A. (Merck)
- Polietilenglicol – 4000 Q.P. (Himedia)
- Reactivo de Dragendorff
- Sílica gel 60 F₂₆₄ (Merck)
- Tolueno P.A. (Merck Millipore)
- Trolox P.A. (Calbiochem)
- Yoduro de potasio P.A. (Merck)

3. Métodos

3.1. Tratamiento del Material Vegetal

3.1.1. Recolección, Selección y Obtención de la Muestra

El fruto de la especie botánica *Punica granatum L.* “Granada” fueron recolectados en la provincia de Cusco en el “Mercado Central”, trasladados a la ciudad de Arequipa para su identificación taxonómica en el Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín. (Anexo N° 1).

Una vez identificado taxonómicamente el fruto de *Punica granatum L.* “Granada” se procedió a escoger los frutos en mejor estado, descartando aquellos que estaban demasiado inmaduros o maduro, contaminados con material extraño o malogrados.

Se procedió cortar el fruto y extraer las semillas contenidas en la pulpa mediante el licuado en baja velocidad, se coló la mezcla obtenida para eliminar la pulpa y el jugo, el procedimiento se repitió por 3 veces con el fin de asegurar que solo se obtengan las semillas enteras que

posteriormente fueron lavadas con agua destilada. El procedimiento se muestra en la *Figura N° 14 y 15*.



Figura N° 14. Proceso de extracción de la semilla de Granada.



Figura N° 15. Semillas extraídas de Punica granatum L. "Granada".

3.1.2. Método de Estabilización - Deseccación

Obtenida la unidad vegetal, para evitar la degradación de las sustancias activas de *Punica granatum L.* "Granada" se dejó secar las semillas por 3 días a temperatura ambiente manteniéndose en completa oscuridad (*Figura N° 16*).



Figura N° 16. Semillas de Granada secadas a temperatura ambiente.

3.1.3. Método de Trituración

La trituración se realizó en una licuadora, hasta la obtención de un polvo con un grado de trituración moderado, evitando llegar al estado de pasta o mantequilla dado por el alto contenido de ácidos grasos en las semillas.



Figura N° 17. Semilla de Granada triturada.

3.2. Obtención del Extracto de *Punica granatum* L. “Granada” con Diferentes Solventes

3.2.1. Método de Extracción Continua: Equipo de Soxhlet

- **Fundamento:**

La extracción Soxhlet ha sido (y en muchos casos, continúa siendo) el método estándar de extracción exhaustiva y por agotamiento de sustancias bioactivas de muestras sólidas más utilizado desde el siglo pasado, y actualmente, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción⁽⁷⁹⁾.

En esta técnica, la extracción de muestra sólido – líquido; la muestra sólida es finamente pulverizada y se coloca en un cartucho de material poroso que se sitúa en la cámara del extractor Soxhlet. Se agrega el solvente en un balón, este alcanza su temperatura de ebullición llegando al condensador de reflujo, el solvente condensado cae gota a gota sobre el cartucho que contiene la muestra sólida extrayendo los analitos solubles. Una vez que el nivel del condensado en la cámara extractora alcanza la parte superior del sifón lateral, el solvente con los analitos disueltos asciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el solvente⁽⁸⁰⁾.

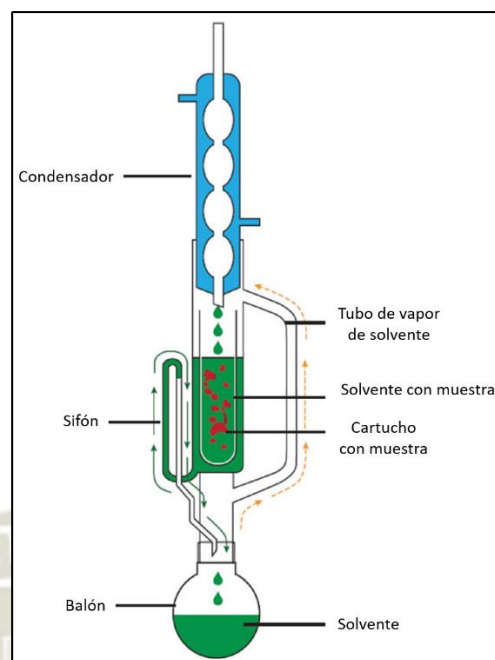


Figura N° 18. Equipo de Extracción por Soxhlet⁽⁷⁹⁾.

- **Procedimiento:**

Se pesó 10 gramos de las semillas pulverizadas de Granada y se empaquetó en un cartucho de papel filtro, posteriormente este cartucho fue colocado en el Soxhlet. En el balón de añadieron 150 ml de solvente (etanol, acetato de etilo y hexano), se armó el equipo de Soxhlet sobre baño María regulando la temperatura para cada solvente y se realizó la extracción en 5 ciclos. El solvente con las sustancias bioactivas se almacenó en un frasco ámbar hermético para evitar la contaminación y alteración por la luz.

Se utilizó el equipo de rotavapor para evaporar el solvente etanólico a condiciones de temperatura de 45°C y vacío, para los solventes acetato de etilo y hexano se utilizó un equipo de destilación al vacío en baño María regulando la temperatura.

3.2.2. Obtención del extracto seco: Evaporación del solvente

Para evaporar el solvente, el “extracto etanólico” fue llevado al equipo de rotavapor. Se utilizó una temperatura de 45°C y formación de vacío por

medio de la bomba para tratar de evaporar por completo el solvente hasta llegar a un volumen reducido. El proceso se observa en la *Figura N° 20*.



Figura N° 19. Equipo de Rotavapor.

De forma diferente, el solvente de los extractos de “acetato de etilo” y “hexano” fue evaporado utilizando un equipo de destilación (*Figura N° 20*) con formación de vacío. Para el “extracto de acetato de etilo” se utilizó una temperatura de 45°C y para el “extracto de hexano” la temperatura usada fue 38°C.



Figura N° 20. Equipo de destilación.

Para ambos casos de evaporación del solvente, rotavapor y equipo de destilación, se tuvo cuidado en que la muestra llegue a ebullición.

3.3. Rendimiento de los Extractos

3.3.1. Método Gravimétrico

- **Fundamento:**

Se basa en la determinación de la diferencia del peso al evaporar todo el solvente del extracto obtenido. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{\text{Peso del Extracto Seco}}{\text{Peso de la Muestra Seca}} \times 100$$

- **Procedimiento:**

El balón que se utilizó para la evaporar el solvente del extracto se pesó previamente. Luego de la evaporación del solvente, se volvió a pesar el balón con el extracto libre de solvente obtenido y por diferencia de peso se obtiene la cantidad de extracto puro. Teniendo el peso de la muestra seca y del extracto puro se calculó el porcentaje de rendimiento.

3.4. Análisis Fitoquímico

Las plantas producen un amplio espectro de metabolitos secundarios, los cuales participan en sus mecanismos de defensa contra la depredación por microorganismos, insectos y herbívoros. Estos metabolitos son compuestos que no se asocian directamente a los procesos de crecimiento y desarrollo, si no que les confieren a las plantas propiedades biológicas. El estudio de estas propiedades ha sido el punto de partida para la búsqueda de nuevos fármacos, antibióticos, insecticidas y herbicidas. El tipo de compuestos con actividad biológica detectados en plantas puede verse afectado por varios factores, entre ellos, la técnica usada para obtener el extracto y el tipo de solvente empleado para la reconstitución del mismo. Existe una diversidad de técnicas que se usan para elucidar la naturaleza química de estos metabolitos, que van desde los llamados análisis de screening (análisis preliminar) o análisis fitoquímico, hasta los más avanzados, que utilizan equipos muy específicos⁽⁸¹⁾.

3.4.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

- **Fundamento**

Es un método físico que separa diversos componentes químicos de una muestra determinada. Para el caso del extracto de hojas, tallos, raíz, flores, semillas o fruto; separa los metabolitos secundarios de estas. Emplea una fase móvil que es líquida y la fase estacionaria es una capa delgada de material que es por lo general Sílica gel. Esta capa de material se conoce como adsorbente. La fase móvil se conoce como el solvente y transporta los solutos a través de la fase estacionaria. Las sustancias que presentan mayor afinidad por la fase estacionaria se mueven más lentamente porque pasan más tiempo en el adsorbente, y las que tienen mayor afinidad por la fase móvil migran con mayor velocidad a través del adsorbente. Por lo tanto, los compuestos con diferentes polaridades pueden separarse entre sí por la interacción diversa de los solutos con el adsorbente y la fase móvil⁽⁸²⁾.

- **Adsorbentes**

Para la elección de un adsorbente se debe tomar en cuenta el tamaño de partícula, la polaridad, debe ser inerte para evitar la descomposición de los componentes de las muestras. Los adsorbentes Sílica gel (SiO_2) y alúmina (Al_2O_3) son los más utilizados por presentar carácter polar⁽⁸³⁾.

- **Sistema de elección de eluyente**

La elección del eluyente depende de la polaridad que presente el/los componentes que se desean separar, se puede utilizar un solvente único o una mezcla de varios solventes de diferente polaridad pero que sean miscibles entre sí⁽⁸⁴⁾.

Principales eluyentes más utilizados en orden creciente de polaridad:

- n-Hexano
- Tetracloruro de carbono
- Benceno

- Éter dietílico
- Diclorometano
- Cloroformo
- 2-Propanol
- Acetato de etilo
- Metanol
- Acetona
- Etanol
- Ácido acético
- Agua

- **Factor de Referencia (Rf)**

Es el valor numérico que permite la identificación de sustancias. Considera la distancia recorrida en un cromatograma con un método cromatográfico dado.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

3.4.2. Método Cromatográfico

- **Procesamiento de muestras**

De los extractos puros obtenidos por cada tipo de disolvente se diluyeron 1:50. Con una micropipeta se tomó 100 μ L de muestra y se diluyó hasta 5 mL de solvente, cada extracto utilizó el mismo solvente en el que fue extraído respectivamente (*Tabla 5*).



Figura N° 21. Muestras diluidas 1:50 para CCF.

Tabla 5. Cantidades de muestra y solvente para la dilución 1:50.

Muestra	Solvente
100 μ L extracto puro de etanol	Etanol csp. 5 mL
100 μ L extracto puro de acetato de etilo	Acetato de etilo csp. 5 mL
100 μ L extracto puro de hexano	Hexano csp. 5 mL

- **Fase estacionaria**

El adsorbente utilizado fueron placas de Sílica gel 60 F₂₆₄, se cortó cuidadosamente cada placa en dimensiones de 10 cm por 4 cm, dejando 1 cm de distancia en el extremo inferior trazándose una línea donde va la muestra sembrada. Con los capilares de punta fina se procede a sembrar en banda aplicando 10 siembras por cada tipo de extracto. Entre cada extracto sembrado se dejó una separación de 0.5 cm con la finalidad de evitar la mezcla de estos, se dejó secar la placa a temperatura ambiente para luego ser colocada en la cuba cromatográfica con la fase móvil correspondiente.

- **Fase móvil**

La elección de la fase móvil estuvo determinada por el tipo de metabolito a identificar. Constó de una mezcla de solventes de diferente polaridad y en distintas proporciones. Las diversas fases móviles utilizadas para determinar los grupos metabolitos secundarios en las muestras, se muestran en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Fases móviles empleadas para identificación de metabolitos⁽⁸⁵⁾.

Metabolitos	Solventes	Proporción
Corrida general	Tolueno : Acetato de etilo	93 : 7
Flavonoides	Cloroformo : Acetona : Ácido fórmico	75 : 16.5 : 8.5
Taninos	Metanol : Agua	70 : 30
Alcaloides	Tolueno : Acetato de etilo : Dietilamina	70 : 20 : 10
Esteroles y terpenos	Tolueno : Cloroformo : Etanol	40 : 40 : 10

- **Desarrollo cromatográfico**

Se colocó la placa con las muestras sembradas en la cuba cromatográfica que previamente debe contener la fase móvil

correspondiente para la separación de cada clase de metabolito. Se esperó la elución de la fase móvil a través de la Sílica gel hasta que llegue a una altura de aproximadamente 1 cm antes de llegar al extremo superior, se retiró la placa y se trazó una línea para marcar el ascenso de la fase móvil (*Figura N° 22*). Se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente pueda ser observada en la lámpara UV y añadirle los reactivos reveladores que identificarán la clase de componentes que contienen las muestras.



Figura N° 22. Elución de la fase móvil en CCF.

- **Reactivos reveladores:**

- **Aminoetil difenil borinato 1% + Polietilenglicol-4000 5%**

Composición:

- Aminoetil difenil borinato 1%
Aminoetil difenil borinato.....1 g
Metanol csp.....100 mL
- Polietilenglicol-4000 5%
Polietilenglicol-4000.....5 g
Etanol csp.....100 mL

Procedimiento:

- Primero pulverizar la placa con la solución de aminoetil difenil borinato, dejar secar y luego pulverizar con la

solución de polietilenglicol-4000 para intensificar la emisión de fluorescencia a 365 nm en la lámpara de UV.

Detección:

- Flavonoides como flavonoles y flavonas, emiten fluorescencia amarillo, verde, anaranjado y celeste.

- **Cloruro férrico 1%**

Composición:

Cloruro férrico.....1 g

Etanol csp.....100 mL

Procedimiento:

- Se pulveriza la placa con la solución preparada y dejar secar.

Detección:

- Taninos dan coloración azul o morado.

- **Reactivo de Dragendorff**

Composición:

- Solución A

Nitrato de bismuto.....0.85 mg

Ácido acético glacial.....10 mL

Agua destilada csp.....50 mL

- Solución B

Yoduro de potasio.....5 g

Agua destilada csp.....30 mL

Procedimiento:

- Mezclar ambas soluciones, A y B, en proporción 1:1, tomar 1 mL de la mezcla, añadir 2 mL de ácido acético glacial con 10 mL de agua. Pulverizar sobre la placa sembrada y dejar secar.

Detección:

- Alcaloides dan coloración rojo o anaranjado.

- **Reactivo de Liebermann-Burchard**

Composición:

Anhidrido acético.....5 mL
 Ácido sulfúrico cc.....5 mL
 Etanol absoluto.....50 mL

Procedimiento:

- Mantener la solución en hielo y pulverizar sobre la placa, llevar a estufa a 110°C por un periodo de 5 a 10 minutos.

Detección:

- Esteroides y triterpenos, generando manchas color violeta, lila, crema y rojo.

3.5. Determinación del contenido de Ácidos Grasos

3.5.1. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

- **Fundamento**

- Cromatografía de gases

Método usado para la separación de componentes de una muestra donde estos deben ser volátiles o semivolátiles térmicamente estables a temperaturas entre 350 – 400°C.

Al inyectarse la muestra, esta pasa por la fase móvil que por lo general es un gas inerte, comúnmente se usa helio (He). En esta fase, los componentes de la muestra pasan por la columna que se encuentra dentro de un horno programado a cierta temperatura y presión. Cada sustancia química presente en la muestra tiene una diferente afinidad por la fase estacionaria o la fase móvil lo que permite su separación. Los componentes retenidos por la fase estacionaria se moverán lentamente en la fase móvil y los que presentan afinidad por la fase móvil migrarán a mayor velocidad en esta; la velocidad de migración o tiempo de retención de cada componente dependerá de la columna que se utilice, el eluyente, la temperatura y presión; los componentes una vez separados pueden analizarse tanto

cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de detectores^(86,87).

- Espectrometría de masas

Técnica analítica usada para determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa con la formación de un espectro propio para cada sustancia. Permite la identificación de sustancias químicas y su concentración en ppm o ppb debido a su gran sensibilidad, proporcionando además información estructural de la molécula⁽⁸⁶⁾.

El espectrómetro ioniza la muestra por impacto electrónico, método más usado, se bombardea la muestra con electrones a cierta cantidad de energía. Una vez ionizada la sustancia, esta se conduce hacia el sistema colector de campos eléctricos o magnéticos para poder evaluar la intensidad y velocidad de desplazamiento de los iones respecto a su masa; el detector amplifica las señales de los iones produciendo un espectro de masas característico para cada compuesto químico⁽⁸⁸⁾.

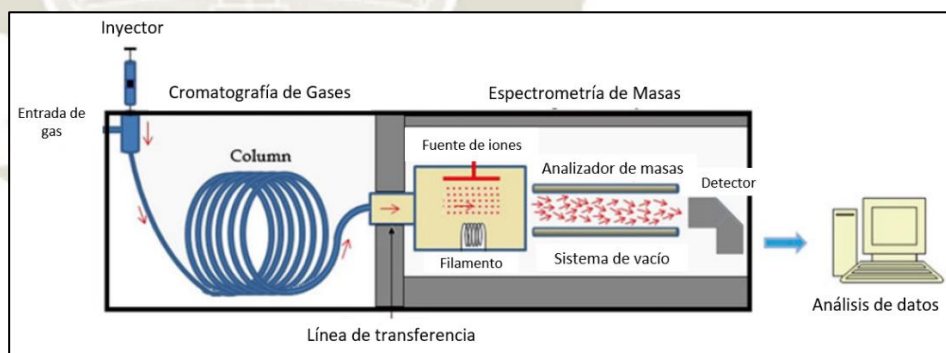


Figura N° 23. Componentes de GC-MS.

La *Figura N° 23* muestra los componentes del cromatógrafo de gases acoplado a espectrofotómetro de masas.

La combinación este tipo de análisis al permitir la separación, detección, identificación y/o cuantificación de compuestos orgánicos; hace que esta sea una técnica de alta sensibilidad y especificidad. Luego de la separación de las sustancias, para identificar cada una de

ellas se realiza una comparación del cromatograma del compuesto de la muestra con el de la sustancia pura, siempre que las condiciones para la obtención de ambos sean idénticas⁽⁸⁹⁾.

3.5.2. Método cromatográfico

Este estudio fue realizado por el “Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad” de la Universidad Católica de Santa María.

- **Procesamiento de muestra**

Se utilizó el “extracto de hexano” por ser el que presenta mayor pureza para compuestos lipofílicos a comparación de los otros extractos, etanol y acetato de etilo.

Se tomó una alícuota de la muestra y se procedió a realizar el proceso de derivatización, “trans-esterificación”, de los ácidos grasos a ésteres (*Figura N° 24*).



Figura N° 24. Proceso de esterificación de la muestra.

La reacción de esterificación es un proceso químico, donde la muestra es tratada con metanol (CH_3OH) y trifluoruro de boro (BF_3) obteniendo como producto final el éster del ácido graso, la reacción química se observa en la *Figura N° 25*. La mezcla de ésteres obtenida es analizada posteriormente por GC-MS.

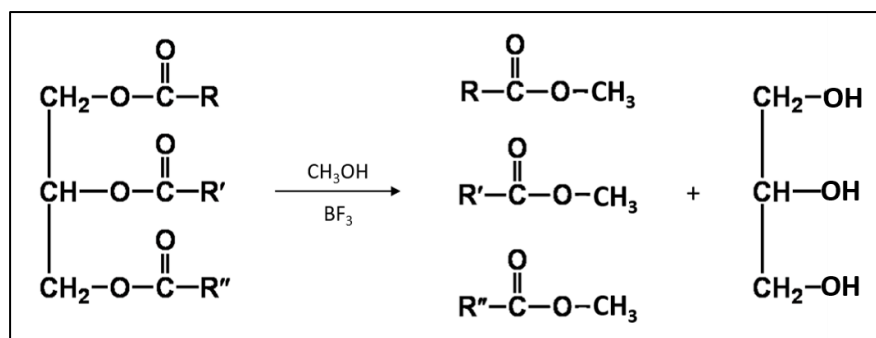


Figura N° 25. Reacción de trans-esterificación de ácidos grasos.

- **Desarrollo cromatográfico**

Los ésteres obtenidos de la muestra del extracto de hexano, al ser compuestos volátiles, son inyectados al cromatógrafo de gases para su separación y son identificados por el detector espectrómetro de masas, emitiendo el perfil de ácidos grasos del extracto vegetal. En la *Figura N° 26* se observa el cromatógrafo de gases donde se analizó la muestra.



Figura N° 26. Análisis de la muestra procesada en GC-MS.

3.6. Métodos Biológicos

3.6.1. Etapa de ambientación y alimentación de animales

Los animales de experimentación fueron sometidos a un periodo de estandarización por 7 días previos a la experimentación teniendo en cuenta las condiciones ambientales y la alimentación consistió en una mezcla de maíz, trigo, cebada y agua (*Figura N° 27*).

Se procedió a la formación de los grupos de experimentación por distribución aleatoria, los animales fueron marcados con fucsina en diferentes zonas del cuerpo y colocados en jaulas acondicionadas.

Las ratas se mantuvieron en ayunas, con acceso libre al agua antes de empezar el experimento.

Se pesó cada animal con el fin de determinar la dosis a administrar de STZ, extractos: etanólico, acetato de etilo y hexano, y de DL- α - tocoferol acetato.



Figura N° 27. Estandarización de animales de experimentación.

3.6.2. Diseño experimental: grupos de investigación

Se utilizaron ratas machos Wistar, con un peso entre 220 – 235 g de 4 meses de edad para los grupos de estudio: Piloto y Experimental.

- **Grupo Piloto**

En el grupo piloto se utilizaron 14 ratas distribuidas al azar formando 7 grupos de 2 ratas cada uno. En la *Tabla 7* se muestran los grupos y su descripción.

Tabla 7. Formación de grupos para la prueba Piloto.

N° de Grupo	Nombre del Grupo	Condiciones
1	Control positivo (+)	Inducción de Diabetes
2	Extracto etanol I	Ratas diabéticas + extracto 10 mg/kg
3	Extracto acetato de etilo I	Ratas diabéticas + extracto 10 mg/kg
4	Extracto de hexano I	Ratas diabéticas + extracto 10 mg/kg
5	Extracto etanol II	Ratas diabéticas + extracto 20 mg/kg
6	Extracto acetato de etilo II	Ratas diabéticas + extracto 20 mg/kg
7	Extracto de hexano II	Ratas diabéticas + extracto 20 mg/kg

- **Grupo Experimental**

Para el grupo experimental se utilizaron 18 ratas distribuidas al azar formando 6 grupos de 3 ratas cada uno (Tabla 8).

- Grupo 1: Control negativo (-)

Ratas Normoglicémicas sin inducción de Diabetes, se les administró aceite vegetal, vehículo de los tratamientos.

- Grupo 2: Control positivo (+)

Ratas a las que se les administró STZ para producir Diabetes. Este grupo no recibió ningún tratamiento, solo se administró el vehículo al igual que el Grupo 1.

- Grupo 3: Tratamiento control

Ratas hiperglicémicas por inducción de Diabetes con STZ, recibieron como tratamiento vitamina E (DL- α - tocoferol acetato) a una dosis de 6 mg/Kg.

- Grupo 4: Tratamiento 1

Ratas hiperglicémicas por inducción de Diabetes con STZ, tratadas con extracto de “Granada” a una dosis de 20 mg/Kg.

- Grupo 5: Tratamiento 2

Ratas hiperglicémicas por inducción de Diabetes con STZ, tratadas con extracto de “Granada” a una dosis de 40 mg/Kg.

- Grupo 6: Preventivo

Ratas que recibieron una dosis de 20 mg/Kg del extracto de “Granada” 15 días previos a la inducción de Diabetes, luego de la inducción se administró tratamiento de extracto a la misma dosis.

Tabla 8. Formación de grupos para la prueba Experimental.

N° de grupo	Nombre de grupo	Condiciones
1	Control negativo (-)	Normoglicémicas
2	Control positivo (+)	Hiperglicémicas
3	Tratamiento control	Ratas diabéticas + Vitamina E
4	Tratamiento 1	Ratas diabéticas + extracto 20 mg/Kg
5	Tratamiento 2	Ratas diabéticas + extracto 40 mg/Kg
6	Preventivo	Extracto 20 mg/Kg 15 días previos a inducción de Diabetes + extracto 20 mg/Kg

3.6.3. Inducción de Diabetes experimental por Estreptozotocina

Para iniciar el proceso de “inducción de Diabetes”, se midió la glucosa basal de los animales en ayunas. Se consideró que los valores normales de glucosa en ratas están comprendidos entre 90 – 130 mg/dL⁽⁹⁰⁾.

La Diabetes experimental fue inducida con estreptozotocina a una dosis de 45 mg/Kg de peso corporal de cada rata, la sustancia se administró por vía intraperitoneal (IP) a todos los grupos como se observa en la *Figura N° 28*, excepto el grupo Control Negativo (-).



Figura N° 28. Administración de la Solución de STZ por vía IP.

A las 24 horas post administración de STZ al medir el nivel de glucosa sanguínea, se considera Diabetes cuando la glucosa marca un valor > 200 mg/dL, se empezó la administración de los tratamientos del extracto de “Granada”, vitamina E y vehículo.

3.6.4. Elaboración y dosificación de tratamientos

Teniendo en cuenta en peso de cada animal de experimentación se realizó la dosificación de vitamina E y del extracto de semillas de “Granada” a las concentraciones requeridas. Se administraron los tratamientos por un periodo de 30 días.

Dado que los extractos de semillas de “Granada” y la vitamina E son oleosos, el vehículo que se utilizó para su disolución fue aceite vegetal. (Anexo N°2)

3.6.5. Obtención de la muestra sanguínea

Las muestras de sangre se obtuvieron por el método de corte del ápice de la cola (*Figura N° 29*). La gota de sangre se puso en contacto con el extremo de la tira reactiva del glucómetro para la medición de la glucosa.

Se eligió este método de toma de muestra sanguínea en murinos ya que reduce el dolor, sufrimiento y trastorno que puedan sufrir los animales.



Figura N° 29. Obtención de la muestra sanguínea.

3.6.6. Medición de la glicemia

La medición de la glicemia se realizó con el glucómetro Accu-Check® Performa Nano (*Figura N° 30*), este dispositivo está diseñado para ayudar a los pacientes en el control de la Diabetes de forma rápida, precisa y sencilla.



Figura N° 30. Glucómetro Accu-Check® Performa Nano.

Se tomaron muestras de sangre previas a la administración de STZ y también se realizó la medición posterior a la inducción de Diabetes a los 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 y 45 días. Para la medición de glucosa, los animales deben de estar en ayuno previo de 12 horas (se remueve agua y comida).

- **Fundamento**

Las tiras reactivas contienen en uno de sus extremos la enzima glucosa oxidasa, que al contacto con la muestra de sangre reacciona produciendo un cambio en la coloración o generando una corriente electroquímica lo que permite conocer el nivel de glucosa dado por el glucómetro de tecnología fotométrica (color) o electroquímica (mide corriente eléctrica)⁽⁹⁰⁾.

Los dispositivos modernos diseñados son tipo electroquímico, la tira reactiva aspira por capilaridad aproximadamente 15 μ L de sangre y el nivel de glucosa al generar una corriente electroquímica de baja

intensidad es medido por el dispositivo mostrando el valor de la glicemia expresada en mg/dL o milimoles (mM)⁽⁹¹⁾.

- **Procedimiento**

Como primer paso, se insertó la tira reactiva por el extremo que posee el medidor de corriente al glucómetro y este se encendió emitiendo una señal sonora, en la pantalla del dispositivo se observó el símbolo de gota de sangre parpadeando. Se procedió a realizar el corte del extremo de la cola del animal y la gota de sangre fue puesta en contacto con la tira reactiva. Una vez cargada la tira con suficiente muestra, el dispositivo emitió nuevamente un sonido indicando el nivel de glucosa sanguínea. Se retiró la tira reactiva del glucómetro y se desechó, el dispositivo se apagó automáticamente a los pocos segundos.

3.7. Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo de DPPH

3.7.1. Fundamento

DPPH, 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo, es un radical libre estable de coloración violeta, con peso molecular de 394,32 g/mol, soluble solo en compuestos orgánicos.

El ensayo de DPPH es un método colorimétrico basado en la disminución en la absorbancia medida entre 515 – 520 nm del radical DPPH. El radical es captado por el antioxidante y el electrón desapareado del átomo de nitrógeno se reduce al recibir un átomo de hidrógeno de los antioxidantes formando DPPH-H. En consecuencia, se produce un cambio de color de la solución que va de violeta a amarillo. El grado de decoloración indica el potencial de actividad de los compuestos o extractos antioxidantes en términos de capacidad de donación de hidrógeno. El tiempo estimado para que la reacción se concrete es de 30 minutos en condiciones de oscuridad^(92,93).

La reacción química de reducción de DPPH se muestra en la siguiente figura:

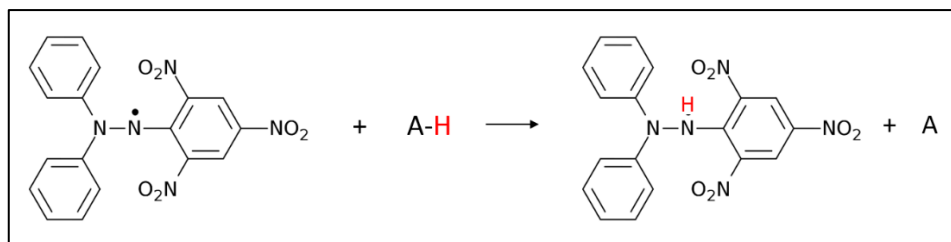


Figura N° 31. Reacción del radical DPPH.

3.7.2. Preparación de las soluciones stock del radical DPPH y Trolox

- **Solución stock de DPPH**

Se preparó una solución stock de DPPH a una concentración de 427 μM en etanol absoluto. Se pesó 4.3 mg del reactivo y se disolvió en una fiola ámbar de 25 mL protegiéndose de la luz.

- **Solución stock de Trolox**

La solución stock de trolox se preparó a una concentración de 125 μM con acetona. Se pesó 0.31 mg del reactivo y se enrasó en una fiola ámbar de 10 mL protegiéndose de la luz.

Ambas soluciones preparadas (*Figura N° 32*) se conservaron refrigeradas para su posterior utilización.



Figura N° 32. Soluciones stock de DPPH y Trolox.

3.7.3. Curva de calibración

Se prepararon 5 patrones en fiolas ámbar de 5 mL agregando cantidades de trolox y acetona como se detalla en la *Tabla 9*, 1.5 mL del radical DPPH y se enrasó con etanol absoluto hasta 5 mL. Se mezcló y dejó reposar en

oscuridad por 30 minutos, luego se procedió a leer la absorbancia de las soluciones a una longitud de onda de 517 nm en el espectrofotómetro.

Tabla 9. Preparación de la curva de calibración DPPH.

Patrones	Concentración Trolox (μM)	Trolox (μL)	Acetona (μL)	DPPH (mL)	Etanol (mL)
1	5	200	800	1.5	2.5
2	10	400	600	1.5	2.5
3	15	600	400	1.5	2.5
4	20	800	200	1.5	2.5
5	25	1000	-	1.5	2.5
Blanco 1	-	-	1000	-	4.0
Blanco 2	-	-	1000	1.5	2.5



Figura N° 33. Soluciones patrón de la curva de calibración de DPPH.

3.7.4. Preparación de las muestras

De los extractos obtenidos de etanol, acetato de etilo y hexano, y vitamina E; se hizo una dilución 1:80 de cada muestra tomándose 62.5 μL los cuales fueron colocados en una fiola y disueltos en acetona hasta un volumen de 5 mL. Se cubrieron las fiolas con papel aluminio para proteger las muestras de la luz y se conservaron refrigeradas para su posterior uso.

Las muestras para ser analizadas por el método DPPH se prepararon añadiendo 1000 μL de cada muestra, 1.5 mL de DPPH y etanol absoluto a un volumen final de 5 mL en fiolas ámbar (Tabla 10). Se mezcló y dejó reposar en oscuridad por un periodo de 30 minutos y luego se midió la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro.

Tabla 10. Preparación de las muestras para determinación de la actividad antioxidante por DPPH.

Muestra	Muestra (μL)	DPPH (mL)	Etanol (mL)
Extracto de etanol	1000	1.5	2.5
Extracto de acetato de etilo	1000	1.5	2.5
Extracto de hexano	1000	1.5	2.5
Vitamina E	1000	1.5	2.5

3.8. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron ordenados en una matriz de sistematización para posteriormente ser procesados mediante los softwares “GraphPad Prism 8”, “MiniTab 19” y “Excel” donde se hicieron las siguientes pruebas estadísticas:

3.8.1. Análisis de varianza (ANOVA)

La comparación de los niveles séricos de glucosa y de la capacidad antioxidante de los extractos de semilla de “Granada” se realizaron mediante la prueba estadística ANOVA de una vía con un nivel de significancia del 95%. Permite evaluar si existe o no diferencia significativa entre los grupos de estudio⁽⁹⁴⁾.

3.8.2. Prueba de Tukey

Se utiliza en el análisis estadístico ANOVA. Compara todas las diferencias entre las medias de los grupos experimentales (Diabetes) y de las muestras analizadas (método DPPH), determina el tratamiento que posee mayor efectividad sobre los niveles elevados de glucosa en sangre y el extracto que posee mayor capacidad antioxidante⁽⁹⁵⁾.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención de los extractos de semillas de “Granada”

Los extractos de semilla de “Granada” se obtuvieron por el método Soxhlet hasta agotamiento de la muestra. Todas las extracciones fueron realizadas bajo las mismas condiciones experimentales donde se consideró las características físicas como la temperatura, para etanol se mantuvo a una temperatura de $80^{\circ}\text{C} \pm 2$, acetato de etilo a $70^{\circ} \pm 2$ y hexano a $45^{\circ}\text{C} \pm 2$. Las extracciones alcanzaron los 5 ciclos para cada solvente. Los extractos resultantes presentaron consistencia oleosa para los tres solventes utilizados.

1.1. Características organolépticas de los extractos de semillas de “Granada”

Se determinó las características organolépticas de los tres extractos obtenidos de la muestra en cuanto a su color, olor, aspecto y consistencia. Éstas se detallan en la *Tabla 11*.

Tabla 11. Características organolépticas de los extractos.

Características	Extracto		
	<i>Etanólico</i>	<i>Acetato de Etilo</i>	<i>Hexano</i>
Color	Rojo oscuro	Rojo - anaranjado	Amarillo
Olor	<i>Sui generis</i>	<i>Sui generis</i>	<i>Sui generis</i>
Aspecto	Líquido viscoso	Líquido viscoso	Líquido viscoso
Consistencia	Oleosa	Oleosa	Oleosa

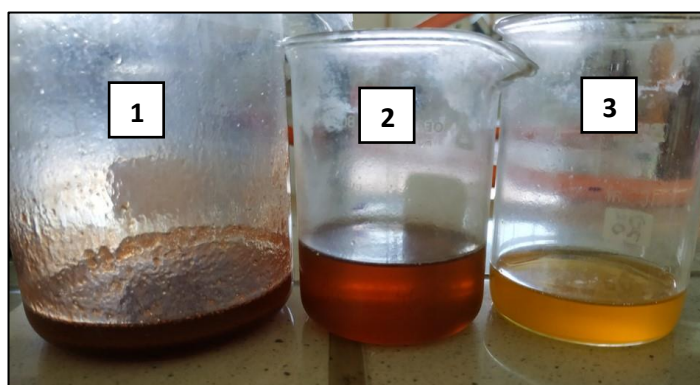


Figura N° 34. Extractos de semilla de "Granada" 1. Extracto etanólico 2. Extracto de acetato de etilo 3. Extracto de hexano

1.2. Rendimiento de los extractos:

Se evaluó el porcentaje de rendimiento (%RE) de los extractos oleosos de *Punica granatum L.* "Granada" obtenidos con cada uno de los diferentes solventes. El peso de las extracciones se detalla en el Anexo N° 3.

Tabla 12. Rendimiento de los extractos de *Punica granatum L.* "Granada"

Extractos	Peso promedio del extracto (g)	% de rendimiento
Etanólico	1.06 ± 0.02	10.6
Acetato de etilo	2.09 ± 0.10	20.9
Hexano	2.16 ± 0.05	21.6

El promedio de los pesos de los extractos obtenidos de 10 extracciones con su respectivo porcentaje de rendimiento (%RE) se detalla en la *Tabla 12*. El mayor %RE es del extracto de hexano (21.6%) y extracto de acetato de etilo (20.9%), esto se debe a que las semillas presentan un alto contenido de compuestos lipofílicos los que son solubles en solventes con bajo índice de polaridad.

El extracto etanólico tuvo el menor rendimiento (10.6%), debido a que el etanol presenta un mayor índice de polaridad comparado con los otros solventes impidiendo la disolución de los compuestos lipofílicos presentes en la semilla de granada.

En la *Figura N° 35* se observa que los extractos con mayor rendimiento son los obtenidos con los solventes n-hexano y acetato de etilo, y el extracto con menor rendimiento fue el de etanol.

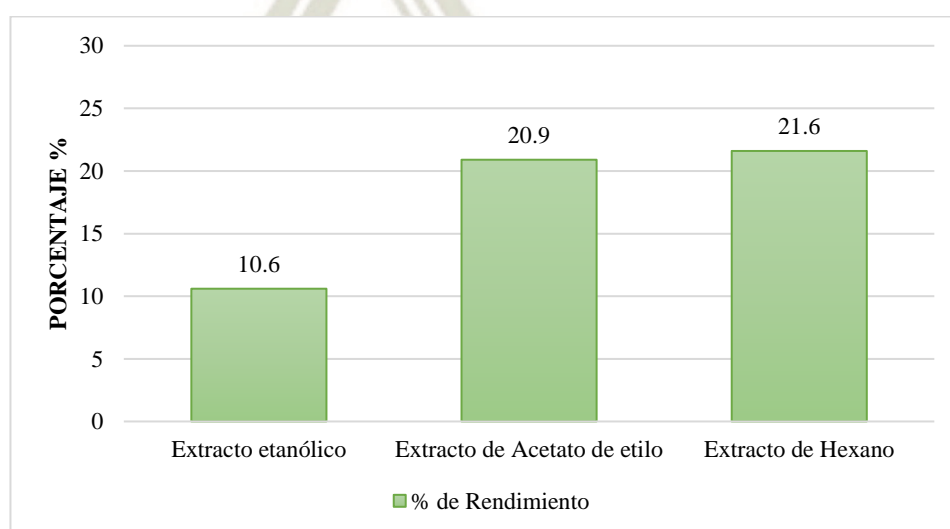


Figura N° 35. Porcentaje de rendimiento de los extractos de "Granada".

El artículo científico titulado “*Bioactive chemical constituents from Pomegranate (Punica granatum) juice, seed and peel – a review*” de Sai Prakash y colaborador, sumado al artículo “*Chemical composition of the plant Punica granatum L. (Pomegranate) and its effect on heart and cancer*” de Sharrif Moghaddasi Mohammad y colaborador; indican que los estudios realizados del rendimiento de aceite de semillas de Granada están comprendidos entre 12 al 20 % del total del peso de la semilla^(12,96).

2. Análisis Fitoquímico por CCF

La semilla de *Punica granatum L.* “Granada”, por bibliografía se sabe que presenta metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides y terpenos. La identificación cromatográfica de estos metabolitos secundarios se realizó de cada uno de los extractos obtenidos de la semilla de “Granada”. Se utilizó fases móviles con diferentes sistemas de solventes para cada grupo de metabolitos pudiendo realizar la separación de compuestos en bandas y se calculó el R_f para cada una de ellas. Cabe mencionar que las placas fueron secadas a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a observar la separación de componentes usando luz UV a 254 y 365 nm.

2.1. Corrida general

Para el desarrollo de la corrida general se utilizó tolueno : acetato de etilo (93:7)⁽⁸⁵⁾, fase móvil general para la separación de componentes de carácter lipofílico. Las placas fueron reveladas en luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

2.1.1. Extracto de etanol

En el cromatofolio revelado a la luz UV se observó el desarrollo de bandas, las cuales presentan los R_f mostrados en la *Figura N° 36*. Los compuestos por su naturaleza lipídica podrían tratarse de terpenos, triterpenos, esteroides, esteroides.

2.1.2. Extracto de acetato de etilo

La separación de compuestos del extracto de acetato de etilo se muestra en el cromatofolio (*Figura N° 36*) donde los R_f evidencian la presencia de

metabolitos secundarios que podrían tratarse de terpenos, triterpenos, esteroides, esteroleos.

El Rf 0.92 muestra una mancha grande, esta podría tratarse de los ácidos grasos extraídos en forma de triglicéridos que migraron hacia el otro extremo de la placa cromatográfica al presentar afinidad por la fase móvil lipófila.

2.1.3. Extracto de hexano

El cromatofolio del extracto de hexano se muestra en la *Figura N° 36*, los Rf indican la presencia de metabolitos secundarios que podrían tratarse de terpenos, triterpenos, esteroides, esteroleos; metabolitos de naturaleza lipídica.

La mancha grande oscura corresponde al Rf 0.91 muestra los triglicéridos que por su afinidad a la fase móvil migraron por la placa cromatográfica.

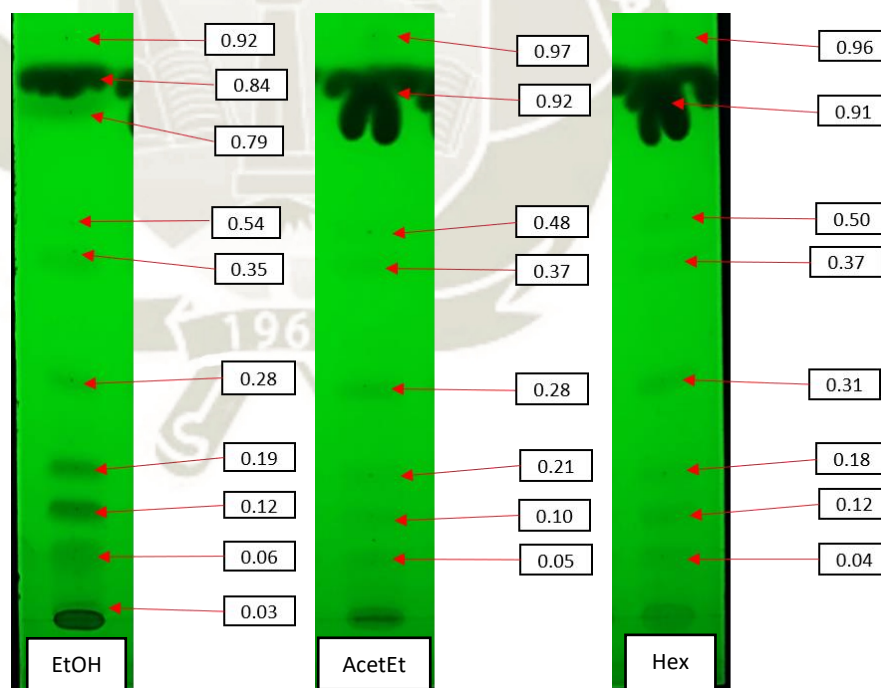


Figura N° 36. Cromatofolio de la corrida general de los extractos de "Granada".

La corrida general de los tres extractos obtenidos de la muestra hace notar la presencia de diferentes bandas que pertenecen a los diferentes grupos de

metabolitos secundarios, el cromatofolio del extracto etanólico es el que presentó mayor número de bandas correspondientes a sus metabolitos.

2.2. Identificación de Flavonoides

La fase móvil empleada para la identificación de flavonoides fue cloroformo : acetona : ácido fórmico (75 : 16.5 : 8.5) ⁽⁸⁵⁾. El revelador utilizado fue aminoetil difenil borinato al 1% junto a PEG-4000 al 5%, luego se observó a 365 nm la emisión de fluorescencia. Se calculó los Rf de cada cromatofolio como se muestra en la *Figura N° 37*.

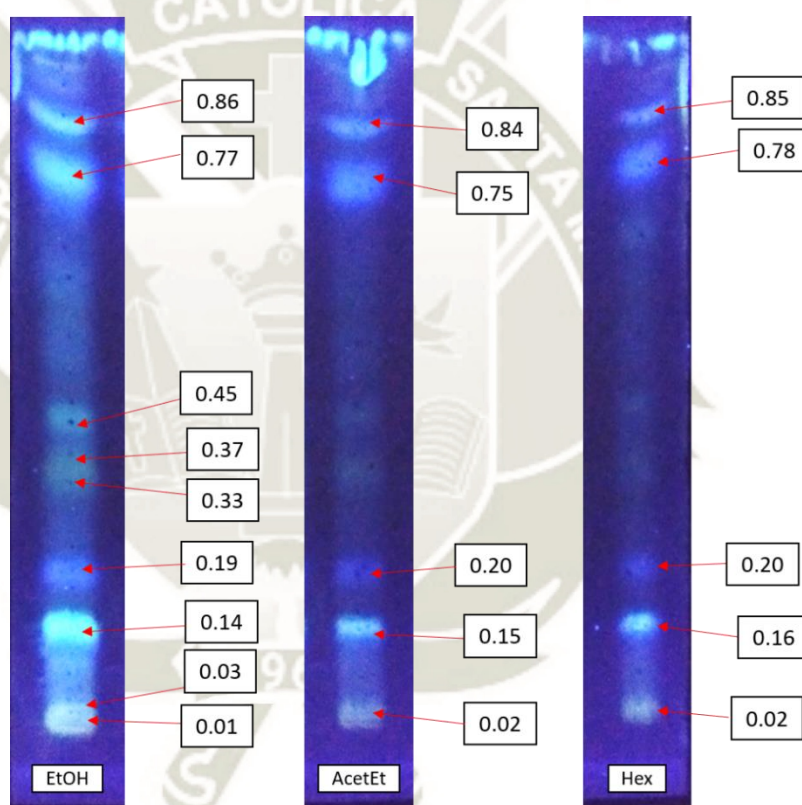


Figura N° 37. Cromatofolio de flavonoides de los tres extractos.

El revelador usado permite mostrar bandas que emiten fluorescencia de diversas coloraciones diferenciando así los tipos de flavonoides que contiene la muestra. En la *Tabla N° 13* se muestran los Rf de los flavonoides y el color de fluorescencia que emitió cada banda separada.

Tabla 13. Rf de los flavonoides y color de fluorescencia.

Extracto Etanólico		Extracto Acetato de etilo		Extracto Hexano	
Rf	Color	Rf	Color	Rf	Color
0.01	Amarillo	0.02	Amarillo	0.02	Amarillo
0.03	Amarillo	0.15	Celeste	0.16	Celeste
0.14	Celeste	0.20	Azul	0.20	Azul
0.19	Azul	0.75	Azul	0.78	Azul
0.33	Verde	0.84	Celeste	0.85	Celeste
0.37	Verde				
0.45	Amarillo				
0.77	Celeste				
0.86	Celeste				

- La fluorescencia amarilla emitida por los Rf 0.01, 0.03 y 0.45 del extracto etanólico, 0.02 tanto para el extracto de acetato de etilo como para el extracto de hexano corresponden a flavonoles como quercetina, miricetina.
- La coloración celeste de la fluorescencia de los Rf 0.14, 0.77 y 0.86 del extracto etanólico; 0.84 y 0.85 para el extracto de acetato de etilo y hexano respectivamente, corresponde tanto a flavonoles como a algunos de sus glucósidos del kaempferol, taxifolina y catequina.
- La fluorescencia azul de los Rf 0.19 en el extracto etanólico, 0.20 y 0.75 del extracto de acetato de etilo y 0.20 y 0.78 del extracto de hexano, corresponden a flavonoides como la luteolina y en algunos casos emiten esta fluorescencia compuestos tipo chalconas como floretina.
- Para la fluorescencia verde emitida solo de las bandas del extracto etanólico con los Rf 0.33 y 0.37 corresponde a compuestos tipo flavonas como apigenina y sus glucósidos^(82,85).

La revisión científica de Chaturvedula Venkata Sai Prakash e Indra Prakash titulado “*Bioactive chemical constituents from Pomegranate (Punica granatum) juice, seed and peel – a review*” indica que la presencia de estos compuestos por poseer una elevada capacidad antioxidante pueden ser los responsables del efecto hipoglicemiante que presentan las semillas de *Punica granatum L.*⁽¹²⁾.

2.3. Identificación de Taninos

La fase móvil usada fue metanol : agua (70:30), para revelar la presencia de taninos se usó cloruro férrico al 1%. En los extractos de etanol y acetato de etilo se evidenció la presencia de taninos como se muestra en la *Figura N° 38*. Los Rf de 0.85 y 0.86 tienen una coloración morada más intensa a comparación de los Rf 0.79 y 0.80 con una coloración morado claro o lila.

El extracto de hexano no presentó bandas que revelen la presencia de taninos como en los extractos de etanol y acetato de etilo, esto se debe a que el hexano presenta un bajo índice de polaridad lo cual impide la solubilidad de taninos que son altamente polares.

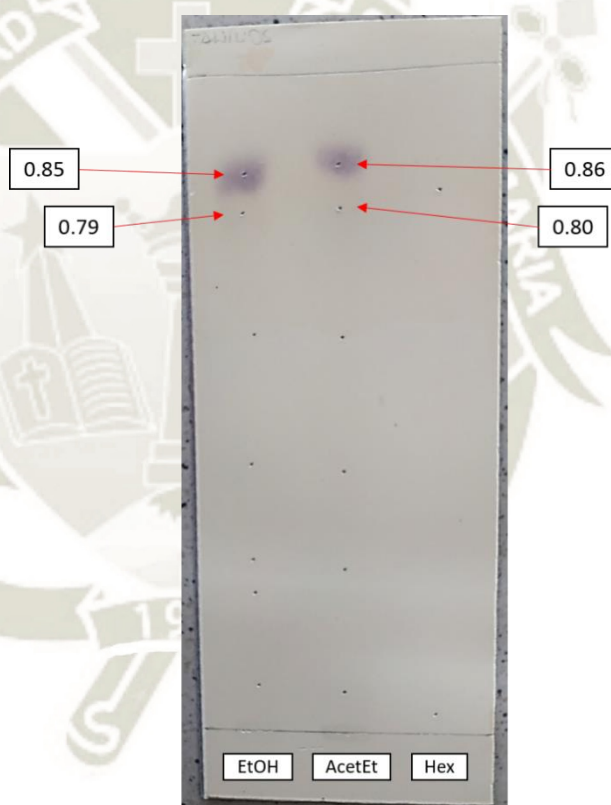


Figura N° 38. Cromatofolio de taninos de los tres extractos.

2.4. Identificación de Alcaloides

Se utilizó tolueno : acetato de etilo : dietilamina (70:20:10) para la fase móvil, como revelador se empleó el reactivo de Dragendorff ⁽⁸⁵⁾ preparado para usarlo inmediatamente. La reacción de identificación dio coloración anaranjada para el cromatofolio de los tres extractos. El cálculo de los Rf correspondientes al extracto de etanol fue de 0.16, 0.39, 0.56 y 0.78; este último presentó la coloración

con mayor intensidad. Para los extractos de acetato de etilo y hexano los valores de los R_f fueron de 0.81 y 0.75 respectivamente que presentaron coloración anaranjado tenue. Los resultados se pueden observar en la *Figura N° 39*.

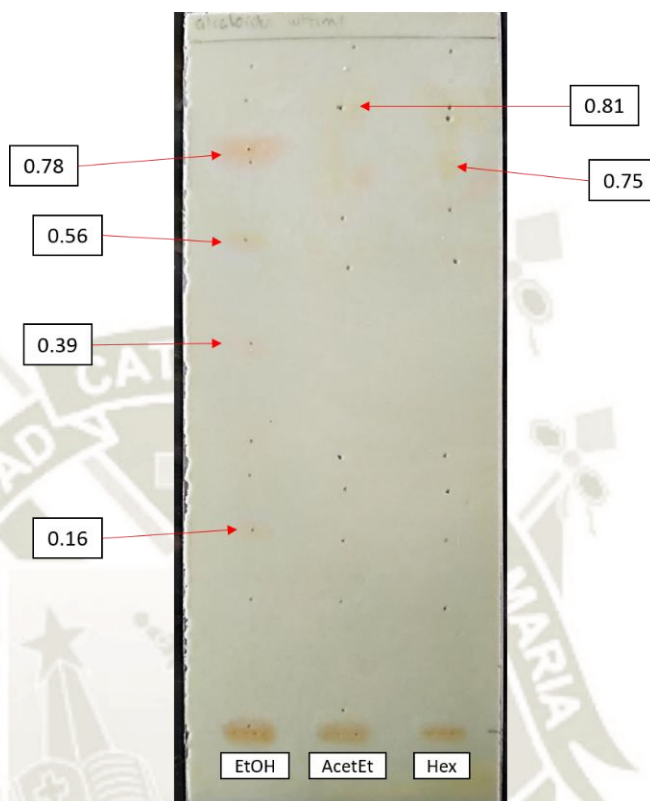


Figura N° 39. Cromatofolio de alcaloides de los tres extractos.

2.5. Identificación de Esteroles y Terpenos

Se empleó como fase móvil tolueno : cloroformo : etanol (40:40:10)⁽⁸⁵⁾. El revelador empleado fue el reactivo de Liebermann-Burchard. En el extracto etanólico y en el de acetato de etilo se identificó cinco compuestos en cada uno y en el extracto de hexano cuatro compuestos.

En el cromatofolio de identificación, las bandas de color morado o lila con R_f de 0.14 y 0.55 en el extracto etanólico, 0.15 y 0.54 en el extracto de acetato de etilo y 0.56 en el extracto de hexano; corresponden a componentes esteroides y glucósidos terpénicos. Las bandas de coloraciones rojo y crema identifican componentes terpenoides de la clase triterpenos. Estos resultados se presentan en la *Figura N° 40*.

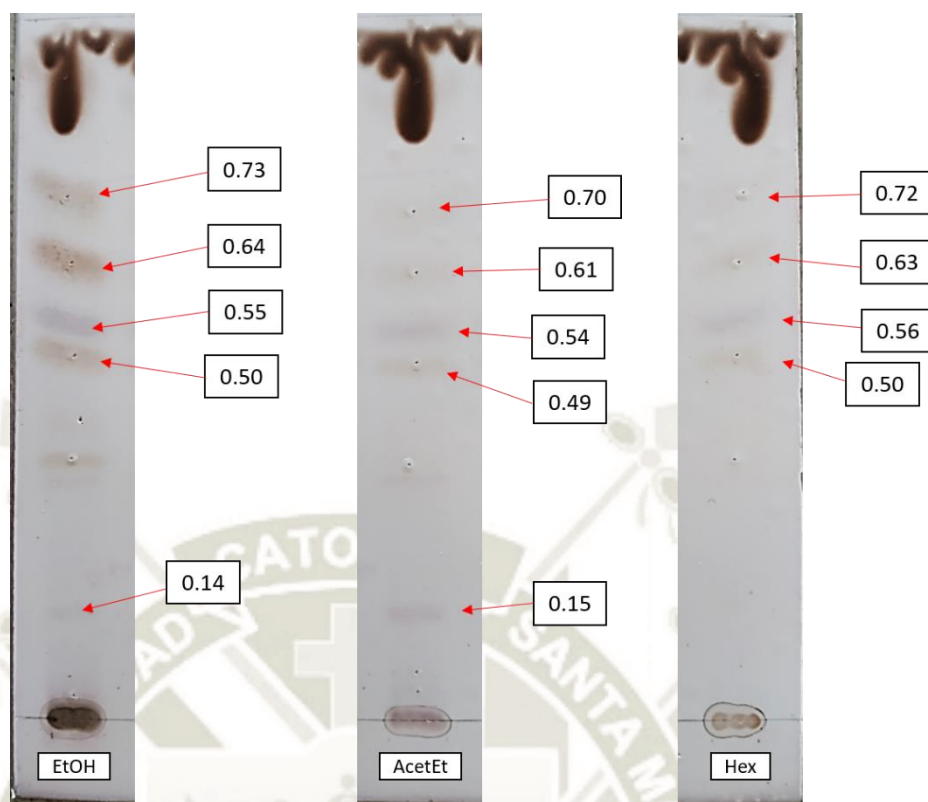


Figura N° 40. Cromatofolio de esteroides y terpenos de los tres extractos.

En la siguiente tabla se detalla la coloración que presentó cada uno de los Rf obtenidos de la identificación de compuestos terpénicos y esteroides.

Tabla 14. Rf de los esteroides-terpenos y su coloración.

Extracto Etanólico		Extracto Acetato de etilo		Extracto Hexano	
Rf	Color	Rf	Color	Rf	Color
0.14	Lila	0.15	Morado	0.50	Rojo
0.50	Rojo	0.49	Rojo	0.56	Morado
0.55	Morado	0.54	Morado	0.63	Rojo
0.64	Rojo	0.61	Crema	0.72	Crema
0.73	Rojo	0.70	Crema		

Artículos científicos como “*Stigmasterol prevents glucolipototoxicity induced defects in glucose-stimulated insulin secretion*” de Meliza G. Ward y colaboradores, y “*The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications*” de Nazaruk y Borzym-Kluczyk; indican que los ácidos maslínico, oleanólico y ursólico; y estigmasterol, por bibliografía se sabe que son componentes fitoquímicos de las semillas de *Punica granatum L.* “Granada”,

poseen propiedades antidiabéticas y antioxidantes. El estigmasterol protege a las células beta pancreáticas de la glucotoxicidad y lipotoxicidad, mejora la secreción de insulina y disminuye la apoptosis. Además, los terpenoides como ácido maslínico, oleanólico y ursólico inhiben las α -glucosidasas disminuyendo la captación de glucosa en el intestino, estos compuestos poseen actividad *scavenger* sobre los radicales libres disminuyendo el EO asociado a Diabetes y complicaciones como retinopatía, nefropatía y neuropatías^(97,98).

2.6. Resultados del análisis fitoquímico preliminar

El resultado del tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de las semillas de *Punica granatum L.* “Granada” evidencian la presencia abundante de flavonoides en el extracto etanólico, y para los extractos de acetato de etilo y hexano su presencia es moderada.

La presencia de taninos se evidenció en los extractos etanólico y de acetato de etilo siendo ausente en el extracto de hexano.

Los alcaloides se encuentran presentes en los tres extractos, siendo moderada su presencia en el extracto etanólico y en menor cantidad en los extractos de acetato de etilo y hexano.

Los esteroides y terpenos se encuentran abundantes en los extractos etanólico y de acetato de etilo; y de forma moderada se evidencian en el extracto de hexano.

En la *Tabla 15* se muestran los resultados del análisis fitoquímico.

Tabla 15. Resultados del análisis fitoquímico preliminar.

Metabolito	Extracto etanólico	Extracto Acetato de etilo	Extracto Hexano
Flavonoides	+++	++	++
Taninos	+	+	-
Alcaloides	++	+	+
Esteroides y terpenos	+++	+++	++

+++ abundante; ++ moderado; + presencia; - ausencia

3. Determinación del Contenido de Ácidos Grasos

Se determinó por cromatografía de gases la presencia de ácidos grasos en la muestra de extracto de hexano de semillas de *Punica granatum L.* “Granada”, el análisis se realizó en el “Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad” de la Universidad Católica de Santa María.

El cromatograma (*Figura N° 41*) muestra seis señales presentes en el aceite de “Granada”. Se encontraron los picos correspondientes a los estándares de metil ésteres de ácidos grasos. A diferentes tiempos de retención se identificaron los ácidos: oleico, linolénico, araquidónico, cis-linoleico, tricosanoico y cis-4,7,10,13,16-docosahexenoico.

La *Tabla 16* muestra los valores de cantidad relativa de los ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de “Granada”. Ácido oleico 65.5%, ácido linolénico 3.64%, ácido araquidónico 2.51%, ácido cis-linoleico 7.15%, ácido tricosanoico 15.18% y ácido cis-4,7,10,13,16-docosahexenoico 6.01%. El informe del ensayo y cromatograma se muestran en el Anexo N°4.

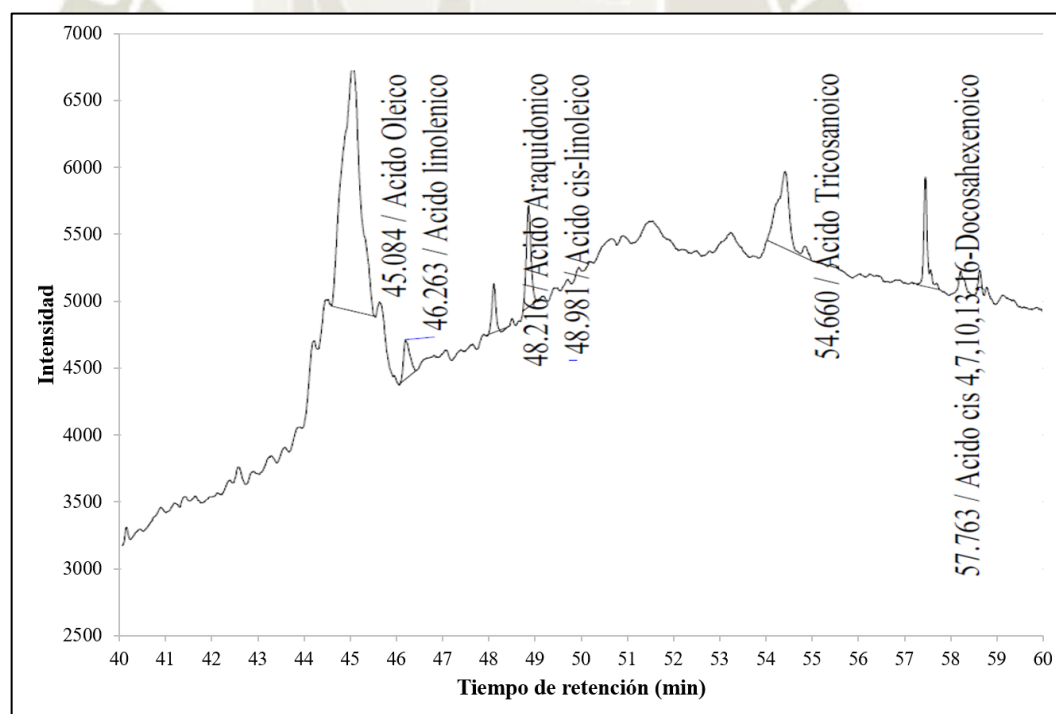


Figura N° 41. Cromatograma de GC-MS del aceite de semilla de "Granada".

Tabla 16. Determinación cuantitativa de AG en la semilla de Granada.

Ácido Graso	Tiempo de retención (min)	AUC	Cantidad relativa (%)
Ácido oleico	45.084	50135	65.51
Ácido linolénico	46.263	2737	3.64
Ácido araquidónico	48.216	1961	2.51
Ácido cis-linoleico	48.981	5295	7.15
Ácido tricosanoico	54.660	10965	15.18
Ácido cis-4,7,10,13,16-docosahexenoico	57.763	4804	6.01

AUC: Área bajo la curva

El análisis de los resultados determinó que el 84.82% de los ácidos grasos son insaturados y el 15.18% son saturados, este último valor corresponde al ácido tricosanoico.

El artículo científico de Acosta-Montaña y colaborador titulado “*Effects of dietary fatty acids in pancreatic beta cell metabolism, implications in homeostasis*” concluye que los Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI) mejoran la funcionalidad de las células pancreáticas e inhiben la apoptosis, previniendo la disminución de secreción de insulina estimulada por glucosa en los islotes causada por los ácidos grasos saturados, también los AGPI están asociados a la disminución de glucosa plasmática, TG séricos y colesterol total ayudando a mejorar la sensibilidad a la insulina. Por lo tanto, la suplementación de la dieta con AGPI podría convertirse en una base para el desarrollo de tratamientos dietéticos en pacientes con Diabetes⁽⁹⁹⁾.

La revisión científica “*Polyunsaturated fatty acids and type 2 diabetes: impact on the glycemic control mechanism*” de Goncalves Leao Coelho y colaboradores, indica que la DM2 está caracterizada por presentar resistencia a la insulina en el tejido esquelético y tejido adiposo. Sustancias como TNF- α , IL, ROS, RNS, citoquinas proinflamatorias y quimiocinas se relacionan con la inflamación de los adipocitos y las células beta pancreáticas. Los ácidos docosahexenoico, linolénico y otros omega-3 poseen acción *scavenger* frente a los radicales libres y efecto antiinflamatorio, lo cual puede conducir a una mejora de la sensibilidad a la insulina y su secreción por medio de la unión sus receptores de proteína G acoplada, el aumento de la secreción de esta hormona produce la activación de GLUT4 aumentando la absorción de glucosa por tejidos periféricos. Otra vía de acción es la activación de PPAR γ a nivel de tejido adiposo y de PPAR β/δ en el músculo esquelético mejorando la acción de la insulina a nivel sistémico⁽¹⁰⁰⁾.

4. Estudio del Efecto Hipoglicemiante

Los animales fueron sometidos a un periodo de estandarización por 7 días previos a la experimentación. La alimentación estandarizada consistió en una mezcla de maíz, trigo, cebada y agua, con el objetivo de evitar errores experimentales.

Para las pruebas de estudio, antes de la inducción de DB se midió la glucosa basal, luego se procedió a la inducción con STZ, siendo esta disuelta en suero fisiológico. La administración se hizo por vía intraperitoneal a una dosis de 45 mg/Kg de peso teniendo en cuenta el peso de cada animal. Se confirmó la hiperglicemia a las 24 horas de la inducción con un nivel de glucosa > 200 mg/dL (Día 0).

Iniciado el tratamiento, se realizó la medición de glucosa cada 3 días por un periodo de 30 días para el “Grupo Piloto”. En el caso del “Grupo experimental” la medición de glucosa se hizo cada 3 días por un periodo de 45 días, el tratamiento se administró hasta el día 30 y se suspendió los 15 días restantes.

4.1. Prueba Piloto

Para determinar el extracto de *Punica granatum L.* “Granada” con mayor efecto hipoglicemiante y la dosis efectiva se realizó una prueba piloto, donde se utilizaron 14 animales de experimentación y se formaron 7 grupos de 2 ratas cada uno. (Anexo N° 5)

Los valores de la concentración de glucosa del Grupo I control positivo, se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 17. Evolución de los niveles de glucosa promedio del Grupo Control (+).

NIVEL DE GLUCOSA		
Grupo Control (+)		
Concentración de glucosa (mg/dL)	Día 0	497.00 \pm 1.41
	Día 3	488.50 \pm 24.75
	Día 6	465.00 \pm 19.80
	Día 9	488.00 \pm 7.07
	Día 12	472.00 \pm 5.766
	Día 15	488.00 \pm 18.38
	Día 18	470.50 \pm 26.16
	Día 21	458.00 \pm 4.24
	Día 24	470.00 \pm 4.24
	Día 27	470.50 \pm 2.12
	Día 30	461.50 \pm 7.78

Tabla 18. Evolución de los niveles de glucosa promedio de los grupos experimentales a dosis 10 mg/Kg.

NIVEL DE GLUCOSA				
Grupo	Etanol (I)	Acetato Etilo (I)	Hexano (I)	
Concentración de glucosa (mg/dL)	Día 0	490.00 ± 1.41	502.50 ± 4.95	511.00 ± 5.66
	Día 3	470.50 ± 4.95	503.00 ± 0.00	504.00 ± 1.41
	Día 6	432.00 ± 8.49	484.50 ± 3.54	484.50 ± 12.02
	Día 9	384.50 ± 14.85	440.00 ± 49.50	440.00 ± 39.60
	Día 12	358.00 ± 4.24	421.50 ± 53.03	428.50 ± 45.96
	Día 15	340.00 ± 4.24	381.00 ± 11.31	391.50 ± 0.71
	Día 18	329.50 ± 0.71	366.50 ± 6.36	373.50 ± 9.19
	Día 21	318.00 ± 2.83	337.50 ± 14.85	332.50 ± 19.09
	Día 24	304.00 ± 1.41	315.50 ± 3.54	316.50 ± 12.02
	Día 27	294.00 ± 2.83	307.50 ± 9.19	308.50 ± 9.19
	Día 30	280.50 ± 3.54	299.50 ± 12.02	300.00 ± 8.49

La medición de los niveles séricos de glucosa promedio a lo largo de los tratamientos a una dosis de 10 mg/Kg se muestra en la *Tabla 18* y el progreso del tratamiento de los diferentes extractos durante 30 días se observan en la *Figura N° 42*.

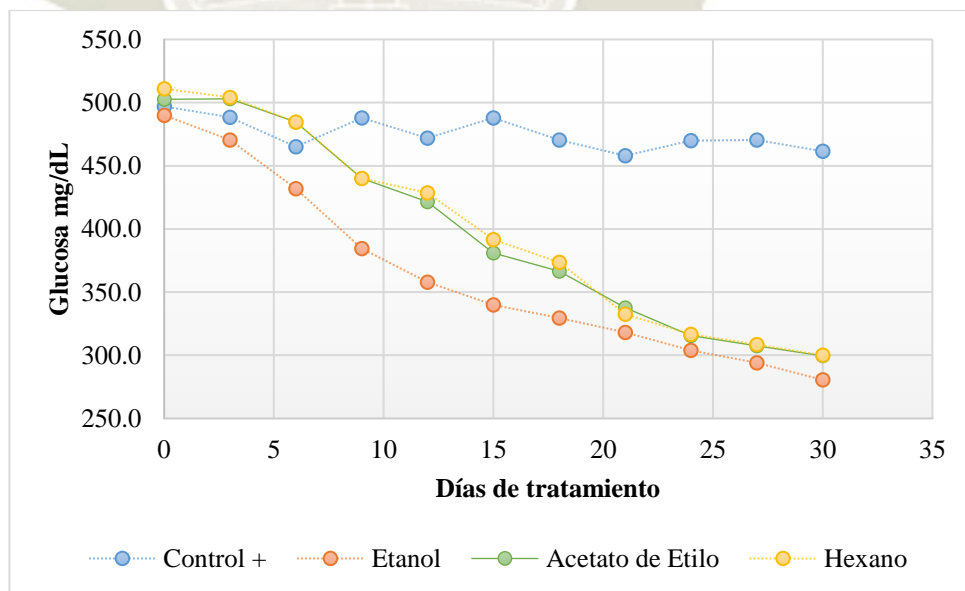


Figura N° 42. Evolución de los niveles de glucosa promedio de los grupos experimentales a dosis 10 mg/Kg.

La medición de los niveles séricos de glucosa promedio a lo largo de los tratamientos a dosis de 20 mg/Kg se muestra en la *Tabla 19* y el progreso del

tratamiento de los diferentes extractos durante 30 días se observan en la *Figura N° 43*.

Tabla 19. Evolución de los niveles de glucosa promedio de los grupos experimentales a dosis 20 mg/Kg.

NIVEL DE GLUCOSA				
Grupo		Etanol (II)	Acetato Etilo (II)	Hexano (II)
Concentración de glucosa (mg/dL)	Día 0	502.50 ± 2.12	497.00 ± 8.49	496.00 ± 4.24
	Día 3	481.00 ± 1.41	479.00 ± 4.24	467.50 ± 9.19
	Día 6	456.00 ± 7.07	448.00 ± 2.83	437.00 ± 5.66
	Día 9	421.50 ± 4.95	407.00 ± 5.66	408.00 ± 5.66
	Día 12	392.00 ± 7.07	389.00 ± 2.83	391.00 ± 8.49
	Día 15	361.00 ± 9.90	363.00 ± 8.49	370.00 ± 2.83
	Día 18	328.50 ± 3.54	329.50 ± 2.12	340.00 ± 1.41
	Día 21	287.50 ± 2.12	300.50 ± 6.36	310.00 ± 5.66
	Día 24	247.00 ± 8.49	279.00 ± 5.66	295.00 ± 2.83
	Día 27	228.00 ± 15.56	252.00 ± 5.66	284.50 ± 2.12
	Día 30	207.50 ± 4.95	234.00 ± 4.24	264.00 ± 1.41

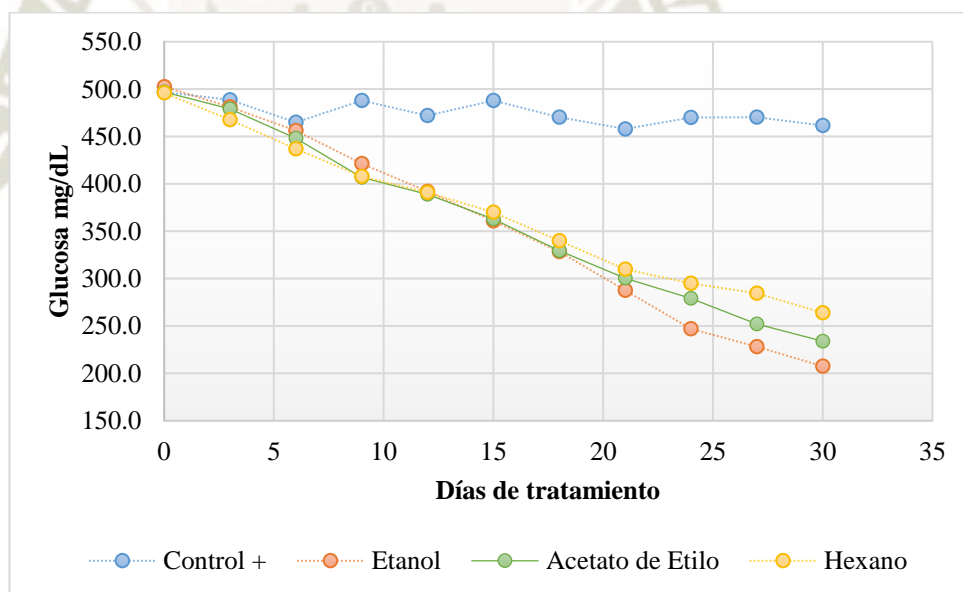


Figura N° 43. Evolución de los niveles de glucosa promedio de los grupos experimentales a dosis 20 mg/Kg.

Los tres extractos, etanol, acetato de etilo y hexano; poseen efecto hipoglicemiante a ambas dosis administradas de 10 mg/Kg y 20 mg/Kg respecto al grupo control positivo (+) como se muestra en la *Figura N° 44*.

Los resultados de la “Prueba Piloto” determinaron el uso del extracto etanólico para realizar el estudio del efecto hipoglicemiante “Experimental” por presentar mayor disminución de glucosa sérica de un 42.76% y 58.71% a dosis de 10 mg/Kg

y 20 mg/Kg respectivamente, comparado con los otros extractos donde disminuyeron en un 40.40% a dosis de 10 mg/Kg y 52.92% a dosis de 20 mg/Kg para el extracto de acetato de etilo, finalmente el extracto de hexano mostró disminución de glucosa en un 41.29% y 46.77% a dosis de 10 mg/Kg y 20 mg/Kg respectivamente. Además, se tomó en cuenta que el etanol es el solvente menos tóxico de los usados para la extracción.

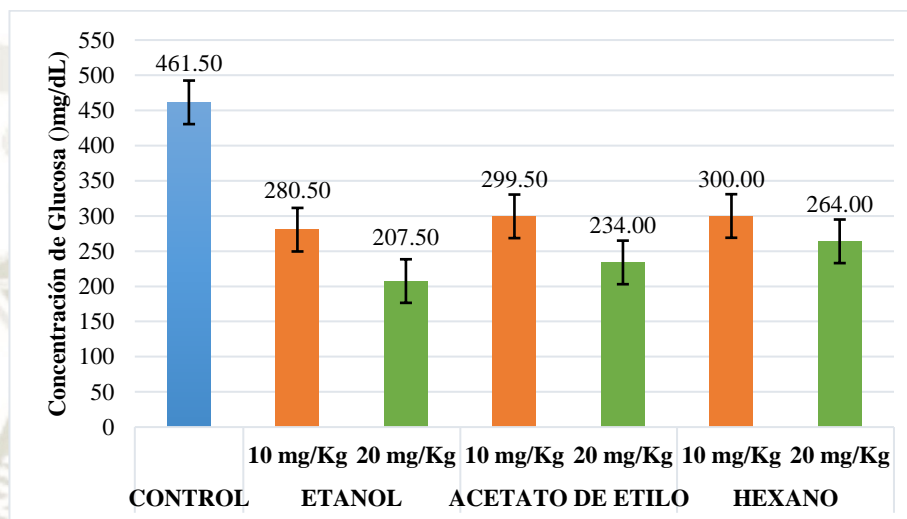


Figura N° 44. Comparación de los tratamientos usados para la "Prueba Piloto".

4.2. Estudio Experimental del Efecto Hipoglicemiante de semillas de “Granada”

El estudio del efecto hipoglicemiante se inició con la administración del pretratamiento (extracto etanólico a dosis de 20 mg/Kg) al grupo “Preventivo” por un periodo de 15 días realizando mediciones cada 3 días. Terminado este periodo se procedió a la inducción de DB para todos los grupos de estudio excepto el grupo “Control negativo (-)”, se realizó la confirmación de hiperglicemia y con ello posterior inicio de los tratamientos.

Durante el periodo de estudio se observó que los grupos tratados con el extracto etanólico a dosis “40 mg/Kg”, “Preventivo” mostraron similar efecto hipoglicemiante que el grupo tratado con “Vitamina E” y estos, además, presentaban mayor efecto frente al grupo tratado a dosis “20 mg/Kg”. Todos estos tratamientos evidenciaron disminución de la hiperglicemia en comparación al grupo “Control positivo (+)”. Por otro lado, se monitoreó el peso corporal dando como resultado en todos los casos de ratas diabéticas la disminución de este.

4.2.1. Evaluación del Peso Corporal

Durante el estudio experimental, se hizo un monitoreo del peso de los animales considerando el peso basal (antes de la inducción de Diabetes) y a los 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 días post—inducción (Anexo N°6).

Tabla 20. Pesos (g) promedio de los animales de los grupos de experimentación durante el periodo de tratamiento.

Tiempo (Días)	GRUPOS		
	Control -	Control +	Vitamina E
Basal	226.33 ± 2.52	227.00 ± 3.00	227.67 ± 1.53
0	223.67 ± 1.53	224.00 ± 3.61	226.00 ± 1.53
5	226.33 ± 3.06	215.00 ± 3.00	218.67 ± 3.06
10	224.67 ± 2.08	206.00 ± 6.24	212.67 ± 2.52
15	225.33 ± 3.06	196.33 ± 5.51	204.00 ± 5.20
20	223.67 ± 3.21	191.33 ± 2.08	200.67 ± 2.08
25	222.67 ± 1.53	189.33 ± 4.04	192.67 ± 2.52
30	224.33 ± 1.53	184.67 ± 3.51	188.00 ± 1.00
35	222.00 ± 2.00	179.33 ± 4.04	183.67 ± 1.53
40	224.33 ± 1.53	175.00 ± 5.66	180.67 ± 2.08
45	224.67 ± 2.89	174.00 ± 0.00	180.00 ± 1.41
Tiempo (Días)	GRUPOS		
	Granada 20 mg/Kg	Granada 40 mg/Kg	Preventivo
Basal	228.33 ± 1.53	227.33 ± 2.08	225.33 ± 3.51
0	226.00 ± 2.00	225.00 ± 2.65	225.33 ± 3.21
5	220.00 ± 2.00	217.67 ± 3.21	219.33 ± 4.93
10	214.67 ± 1.53	212.00 ± 2.00	214.00 ± 5.29
15	207.00 ± 2.00	204.33 ± 1.53	207.67 ± 5.51
20	199.33 ± 3.06	201.67 ± 5.69	201.67 ± 5.51
25	193.00 ± 3.00	197.33 ± 2.08	195.33 ± 5.13
30	189.67 ± 5.03	194.00 ± 2.65	191.00 ± 4.58
35	184.67 ± 4.73	189.33 ± 2.08	187.33 ± 4.16
40	179.33 ± 1.53	186.33 ± 2.08	183.67 ± 4.04
45	177.00 ± 0.00	183.00 ± 2.00	180.33 ± 3.21

La *Figura N° 45* muestra la evolución de los pesos promedio de los grupos experimentales en relación al periodo de estudio de 45 días. En el grupo “Control (-)” se observa que los animales conservaron su peso a lo largo del experimento. El grupo tratado con vitamina E presenta un 20.94% de disminución de peso promedio; los grupos que recibieron como tratamiento los extractos de granada a dosis “20 mg/Kg” y “40 mg/Kg”

tuvieron una disminución del 22.48% y 19.50% de peso respectivamente y el grupo preventivo tuvo una disminución del 19.97% de su peso inicial; el grupo “Control (+)” que recibió como tratamiento el vehículo en el que se disolvieron los otros extractos tuvo una disminución del 23.35 %.

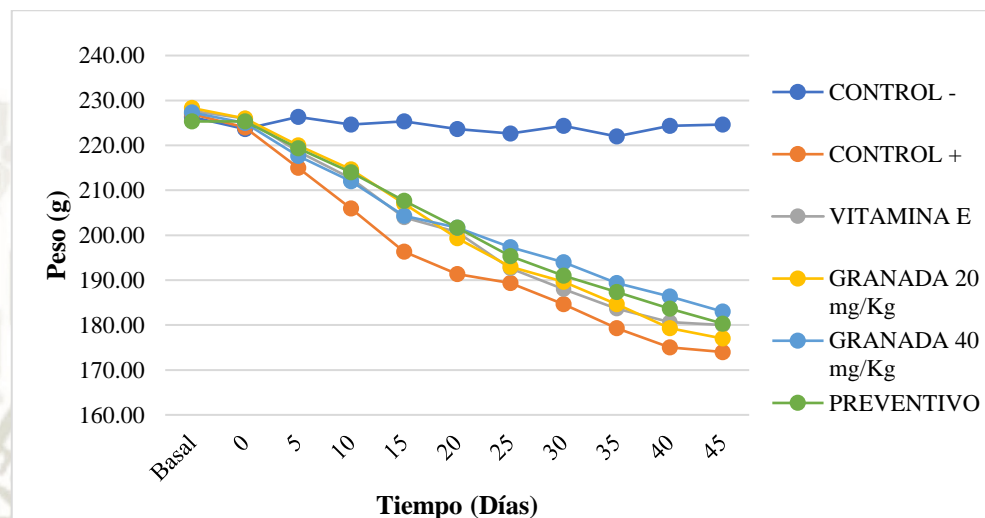


Figura N° 45. Evolución de los pesos (g) promedio de los grupos de experimentación durante el periodo de tratamiento.

Los resultados obtenidos pueden afirmar que el tratamiento con extracto de “Granada” a una dosis de 40 mg/Kg, el modelo preventivo del extracto a dosis de 20 mg/Kg y la vitamina E evitan la disminución del peso ayudando a su recuperación durante el desarrollo de la hiperglicemia.

4.2.2. Análisis Estadístico entre los Grupos Experimentales

La prueba de ANOVA se utilizó para el estudio estadístico de los grupos experimentales usando un nivel de confianza del 95% con la finalidad de indicar si existen diferencias significativas en los resultados obtenidos. Por otro lado, el test de Tukey se usó para definir los grupos que son diferentemente significativos entre sí.

a. Evaluación de glucosa basal

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa basales entre los grupos de experimentación no poseen diferencia significativa ($p > 0.05$). En la *Tabla 21* y *Figura N° 46* se muestra la comparación

de los niveles de glucosa basal entre los grupos, los valores se hallan contenidos en un intervalo de confianza de 96.06 a 118.93 mg/dL. (Anexo N° 8)

Dado que el tratamiento estadístico no mostró diferencias significativas entre los grupos, se concluye que la experimentación inició en igualdad de condiciones para todos los grupos experimentales.

Tabla 21. Comparación del nivel de glucosa basal (mg/dL) entre los grupos experimentales

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación
Control (-)	3	103.33	9.07	A
Control (+)	3	98.33	4.51	A
Vitamina E	3	105.33	5.51	A
Granada 20 mg/Kg	3	98.67	3.51	A
Granada 40 mg/Kg	3	103.67	5.86	A
Preventivo	3	111.67	4.51	A
Valor F crítica	3.1059			
Valor F	2.16			
Valor P	0.127			

S.D.: Desviación estándar

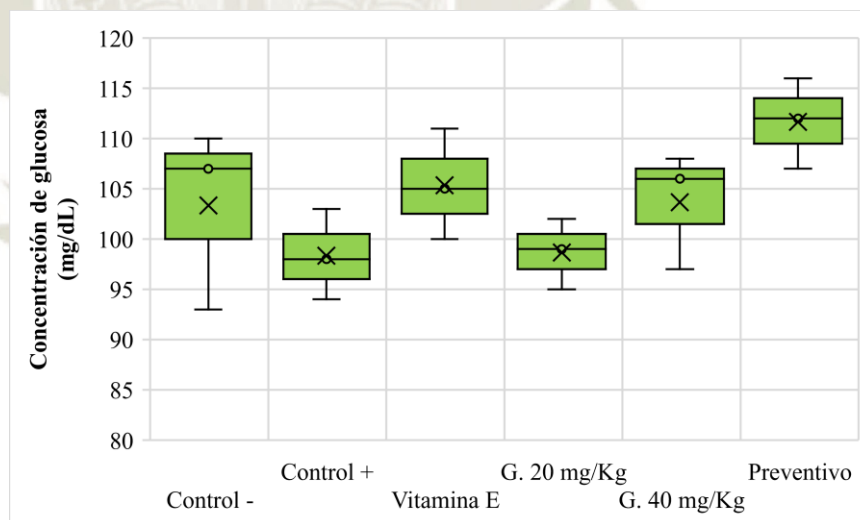


Figura N° 46. Comparación del nivel de glucosa basal (mg/dL) entre los grupos experimentales.

b. Evaluación de glucosa Post-STZ – Día 0

Luego de la inducción con STZ, los niveles de glucosa se monitorearon a las 24 horas de la administración IP.

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 22* y *Figura N° 47* se muestra la comparación de los niveles de glucosa posteriores a la inducción de Diabetes entre los grupos. (Anexo N° 9)

Al realizar el test de Tukey se observa que el nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente de los demás. Para los grupos “Control (+)”, “Vitamina E” y extractos a dosis de “20 mg/Kg” y “40 mg/Kg” no hay diferencia significativa dado que los valores de elevación promedio de glucosa son de hasta 487 ± 8.19 mg/dL. Sin embargo, el grupo “Preventivo” difiere significativamente de estas dos agrupaciones como se muestra en la *Tabla 21*, logrando tener una elevación del nivel de glucosa de hasta 384 ± 9.17 mg/dL. Esta elevación considerada como Diabetes al ser menor comparada con los demás grupos que presentan hiperglicemia, indica que la administración del extracto etanólico a dosis de 20 mg/Kg previa a la inducción por un periodo de 15 días previene la elevación excesiva de glucosa siendo esta menor en un 21.15%.

Tabla 22. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales Post-STZ Día 0.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación		
Control (-)	3	106.33	10.50			C
Control (+)	3	483.33	7.77	A		
Vitamina E	3	487.00	8.19	A		
Granada 20 mg/Kg	3	486.33	8.74	A		
Granada 40 mg/Kg	3	480.00	7.55	A		
Preventivo	3	384.00	9.17		B	
Valor F crítica	3.1059					
Valor F	907.84					
Valor P	4.9099×10^{-15}					

S.D.: Desviación estándar

La hiperglicemia presentada en los grupos de estudio con valores que superan los 200 mg/dL de glucosa, indican que la inducción de Diabetes se realizó con éxito a una dosis de 45 mg/Kg de STZ.

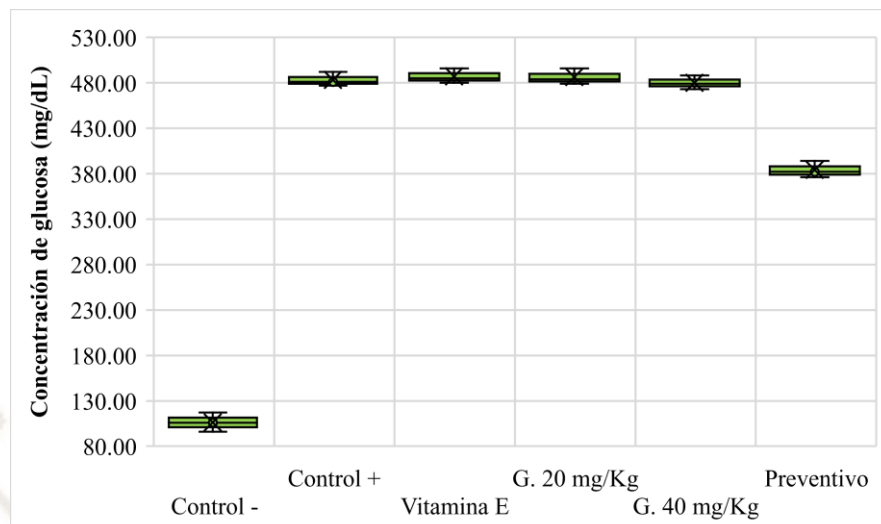


Figura N° 47. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales Post-STZ Día 0.

c. Evaluación de glucosa Día 3

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 3 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 23* y *Figura N° 48* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 10)

Tabla 23. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 3.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	110.67	7.09				D
Control (+)	3	494.00	1.73	A			
Vitamina E	3	458.67	6.51		B		
Granada 20 mg/Kg	3	470.67	2.52		B		
Granada 40 mg/Kg	3	458.00	3.61		B		
Preventivo	3	367.67	9.07			C	
Valor F crítica	3.1059						
Valor F	1917.80						
Valor P	5.5811×10^{-17}						

S.D.: Desviación estándar

El test de Tukey muestra que a los tres días de iniciado el tratamiento el nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente de los demás manteniendo su concentración en 110.67 ± 7.09 mg/dL. El grupo “Control (+)” presentó un ligero aumento del nivel de

glucosa con un valor promedio de 494 ± 1.73 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

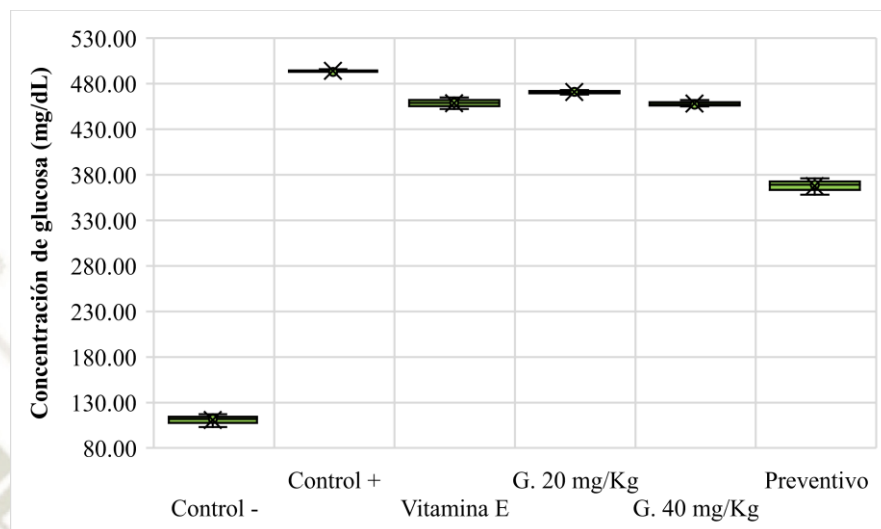


Figura N° 48. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 3.

Los grupos “Vitamina E” con un nivel de glucosa de 458.67 ± 6.51 mg/dL, extracto a dosis de “20 mg/Kg” con 470.67 ± 2.52 mg/dL y “40 mg/Kg” con 458 ± 3.61 mg/dL no poseen diferencia significativa entre sí, pero difieren de los grupos “Control (-)”, “Control (+)”. El grupo “Preventivo” difiere significativamente de los demás grupos con un nivel promedio de glucosa de 367.67 ± 9.07 mg/dL presentando efecto hipoglicemiante mayor seguido de los otros tratamientos.

d. Evaluación de glucosa Día 6

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 6 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 24* y *Figura N° 49* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 11)

El test de Tukey muestra que a los seis días de iniciado el tratamiento el nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente de los demás manteniendo su concentración en 111.33 ± 12.42 mg/dL. El grupo “Control (+)” disminuyó ligeramente el nivel de glucosa con

un valor promedio de 481.33 ± 19.7 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos y no difiere significativamente del grupo tratado a dosis de “20 mg/Kg” con 456.67 ± 4.51 mg/dL a pesar de este haber disminuido el nivel de glucosa.

Tabla 24. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 6.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación		
Control (-)	3	111.33	12.42			D
Control (+)	3	481.33	19.7	A		
Vitamina E	3	421.00	5.57		B	
Granada 20 mg/Kg	3	456.67	4.51	A		
Granada 40 mg/Kg	3	422.67	5.69		B	
Preventivo	3	346.33	6.66			C
Valor F crítica	3.1059					
Valor F	499.01					
Valor P	1.7524×10^{-13}					

S.D.: Desviación estándar

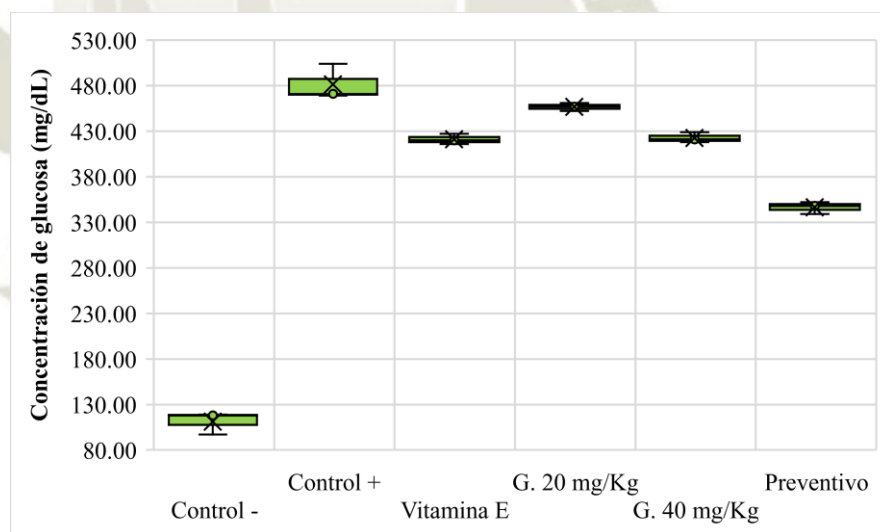


Figura N° 49. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 6.

Los grupos “Vitamina E” con un nivel de glucosa de 421 ± 5.57 mg/dL y el extracto a dosis de “40 mg/Kg” con 422.67 ± 5.69 mg/dL no poseen diferencia significativa entre sí, pero difieren de los demás

grupos. El grupo “Preventivo” difiere significativamente con un nivel promedio de glucosa de 346.33 ± 6.66 mg/dL.

Los tratamientos con vitamina E, el extracto a 40 mg/Kg y preventivo muestran disminución de la concentración de glucosa, siendo el tratamiento preventivo con mayor efecto hipoglicemiante.

e. Evaluación de glucosa Día 9

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 9 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 25* y *Figura N° 50* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 12)

El test de Tukey muestra que a los nueve días de iniciado el tratamiento el nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente de los demás con una concentración de 99.67 ± 6.66 mg/dL. El grupo “Control (+)” disminuyó ligeramente el nivel de glucosa con un valor promedio de 478.33 ± 7.09 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

Tabla 25. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 9.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	99.67	6.66				E
Control (+)	3	478.33	7.09	A			
Vitamina E	3	388.33	4.04			C	
Granada 20 mg/Kg	3	430.67	4.51		B		
Granada 40 mg/Kg	3	394.00	5.57			C	
Preventivo	3	323.67	8.50				D
Valor F crítica	3.1059						
Valor F	1376.18						
Valor P	4.0732×10^{-16}						

S.D.: Desviación estándar

El grupo tratado con el extracto de “Granada” a dosis de “20 mg/Kg” con un nivel de glucosa promedio de 430.67 ± 4.51 mg/dL difiere de los otros grupos y presenta el menor efecto hipoglicemiante de todos los tratamientos. Los grupos “Vitamina E” y el extracto a dosis de “40

mg/Kg” con un nivel de glucosa de 388.33 ± 4.04 mg/dL y 394 ± 5.57 mg/dL respectivamente no poseen diferencia significativa entre sí. El grupo “Preventivo” difiere significativamente de los demás grupos con un nivel promedio de glucosa de 323.67 ± 8.50 mg/dL.

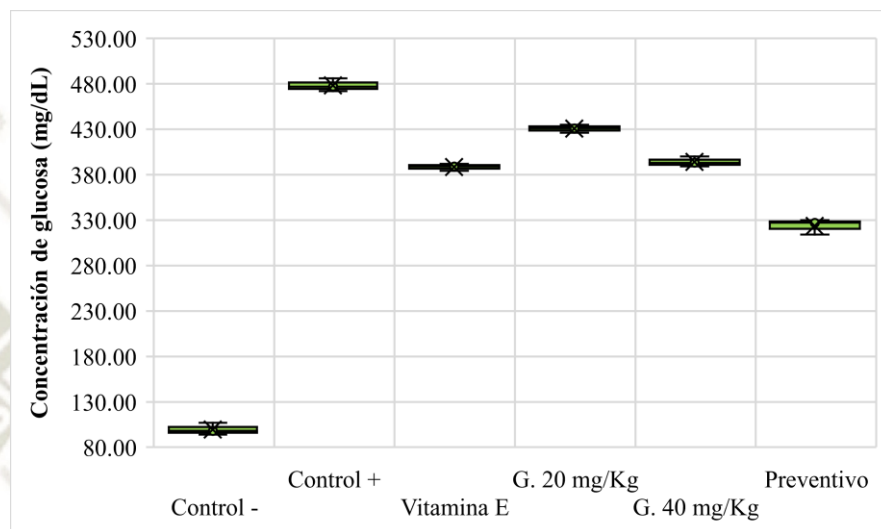


Figura N° 50. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 9.

Los tratamientos con vitamina E, el extracto a 40 mg/Kg y preventivo muestran disminución de la concentración de glucosa, siendo el tratamiento preventivo con mayor efecto hipoglicemiante seguido de los tratamientos con vitamina E y extracto a 40 mg/Kg.

f. Evaluación de glucosa Día 12

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 12 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 26* y *Figura N° 51* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 13)

El test de Tukey muestra que a los doce días de iniciado el tratamiento los grupos de estudio evidencian diferencia significativa. El nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente de los demás con una concentración de 111 ± 11.27 mg/dL y el grupo “Control (+)” aumentó ligeramente el nivel de glucosa con un valor

promedio de 489.33 ± 4.04 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

Tabla 26. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 12.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	111.00	11.27				F
Control (+)	3	489.33	4.04	A			
Vitamina E	3	339.67	4.93			D	
Granada 20 mg/Kg	3	396.00	4.58	B			
Granada 40 mg/Kg	3	365.33	6.03		C		
Preventivo	3	303.33	4.73				E
Valor F crítica	3.1059						
Valor F	1159.41						
Valor P	1.1364×10^{-15}						

S.D.: Desviación estándar

El grupo tratado con el extracto de “Granada” a dosis de “20 mg/Kg” muestra diferencia significativa con un nivel de glucosa promedio de 396 ± 4.58 mg/dL presenta el menor efecto hipoglicemiante de todos los tratamientos, seguido del extracto a dosis de “40 mg/Kg” con un nivel de glucosa de 365.33 ± 6.03 mg/dL. El grupo “Vitamina E” y “Preventivo” con una concentración de glucosa de 339.67 ± 4.93 mg/dL y 303.33 ± 4.73 mg/dL respectivamente, tienen buena eficacia.

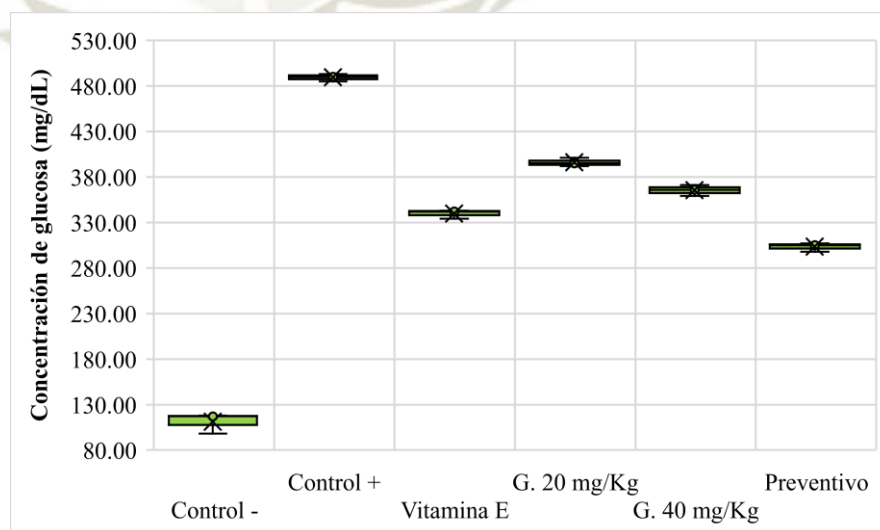


Figura N° 51. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 12.

En la evaluación de los tratamientos al día 12 se ve una diferencia notable de los niveles de glucosa, siendo el tratamiento “Preventivo” con mayor efecto hipoglicemiante seguido de los grupos tratados con “Vitamina E” y extracto de “Granada” a dosis de 40 mg/Kg.

g. Evaluación de glucosa Día 15

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 15 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 27* y *Figura N° 52* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 14)

El test de Tukey muestra que hay diferencia significativa entre los seis grupos de estudio en un periodo de quince días de tratamiento.

El nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente con una concentración de 105.67 ± 10.50 mg/dL. El grupo “Control (+)” disminuyó ligeramente el nivel de glucosa con un valor promedio de 473.67 ± 4.93 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

Tabla 27. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 15.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	105.67	10.50				F
Control (+)	3	473.67	4.93	A			
Vitamina E	3	307.67	4.16			D	
Granada 20 mg/Kg	3	363.33	5.03		B		
Granada 40 mg/Kg	3	338.33	6.11			C	
Preventivo	3	285.00	7.00				E
Valor F crítica	3.1059						
Valor F	993.78						
Valor P	2.8583×10^{-15}						

S.D.: Desviación estándar

El grupo tratado con el extracto de “Granada” a dosis de “20 mg/Kg” muestra diferencia significativa con un nivel de glucosa de 363.33 ± 5.03 mg/dL, presenta el menor efecto hipoglicemiante de todos los tratamientos; seguido del extracto a dosis de “40 mg/Kg” con un nivel

de 338.33 ± 6.11 mg/dL. El grupo “Vitamina E” y “Preventivo” tienen una concentración de glucosa de 307.67 ± 4.16 mg/dL y 285 ± 7.00 mg/dL respectivamente.

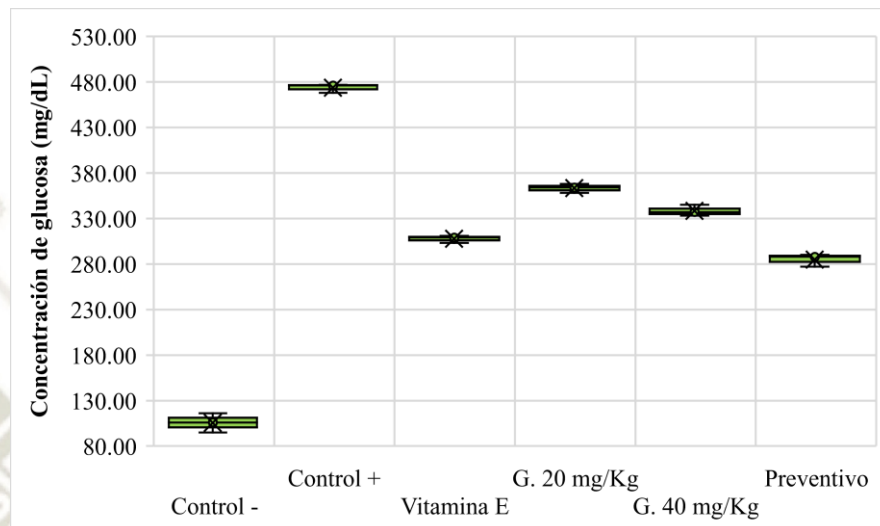


Figura N° 52. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 15.

Los tratamientos muestran una diferencia notable en los niveles de glucosa; sin embargo, el tratamiento “Preventivo” posee el mayor efecto hipoglicemiante seguido de los grupos tratados con “Vitamina E” y extracto de “Granada” a dosis de 40 mg/Kg.

h. Evaluación de glucosa Día 18

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 18 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 28* y *Figura N° 53* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 15)

Se aplicó el test de Tukey donde el nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente con una concentración de 97.33 ± 3.79 mg/dL. El grupo “Control (+)” aumentó ligeramente el nivel de glucosa con un valor promedio de 478.67 ± 24.2 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

Tabla 28. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 18.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	97.33	3.79				E
Control (+)	3	478.67	24.2	A			
Vitamina E	3	285.00	4.58			C D	
Granada 20 mg/Kg	3	323.67	7.57		B		
Granada 40 mg/Kg	3	306.67	2.08		B	C	
Preventivo	3	268.67	5.86				D
Valor F crítica				3.1059			
Valor F				374.43			
Valor P				9.7056×10^{-13}			

S.D.: Desviación estándar

Los grupos tratados con el extracto a dosis de “20 mg/Kg” y “40 mg/Kg” no muestran diferencia significativa entre sí con un nivel de glucosa de 323.67 ± 7.57 mg/dL y 306.67 ± 2.08 mg/dL respectivamente. El grupo “Vitamina E” tiene un nivel de glicemia de 285 ± 4.58 mg/dL, no difiere del tratamiento a dosis de 40 mg/Kg, pero si muestra diferencia del tratamiento a dosis de 20 mg/Kg. El grupo “Preventivo” tiene una concentración de glucosa de 268.67 ± 5.86 mg/dL, no difiere del tratamiento con vitamina E, pero si del resto de tratamientos y controles.

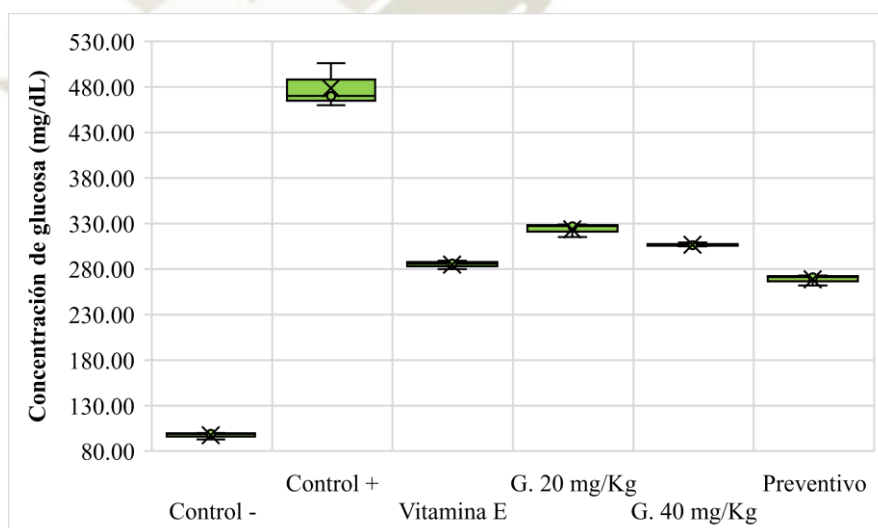


Figura N° 53. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 18.

La evaluación de los tratamientos muestra una diferencia en los niveles de glucosa respecto al día 0, los tratamientos “Preventivo” y “Vitamina E” poseen mayor efecto hipoglicemiante seguido de los grupos tratados con el extracto de “Granada” a dosis de 40 mg/Kg y 20 mg/Kg.

i. Evaluación de glucosa Día 21

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 21 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 29* y *Figura N° 54* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 16)

Al aplicar el test de Tukey resultó que el nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente con una concentración de 113.33 ± 7.23 mg/dL. El grupo “Control (+)” mantuvo el nivel de glucosa con un valor promedio de 477 ± 15.52 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

Tabla 29. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 21.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	113.33	7.23				D
Control (+)	3	473.00	15.52	A			
Vitamina E	3	251.00	3.00			C	
Granada 20 mg/Kg	3	290.33	3.51		B		
Granada 40 mg/Kg	3	287.00	4.58		B		
Preventivo	3	248.33	3.51			C	
Valor F crítica				3.1059			
Valor F				692.88			
Valor P				2.4695×10^{-14}			

S.D.: Desviación estándar

Los grupos tratados con el extracto a dosis de “20 mg/Kg” y “40 mg/Kg” no muestran diferencia significativa entre sí con un nivel de glucosa de 290.33 ± 3.51 mg/dL y 287 ± 4.58 mg/dL respectivamente, estos difieren del resto de grupos. El grupo “Vitamina E” presenta un nivel de glicemia de 251 ± 3.00 mg/dL, no difiere del tratamiento “Preventivo” que tiene una concentración de glucosa de 248.33 ± 3.51

mg/dL, ambos grupos presentan mayor disminución de la hiperglicemia comparado del resto de tratamientos y controles.

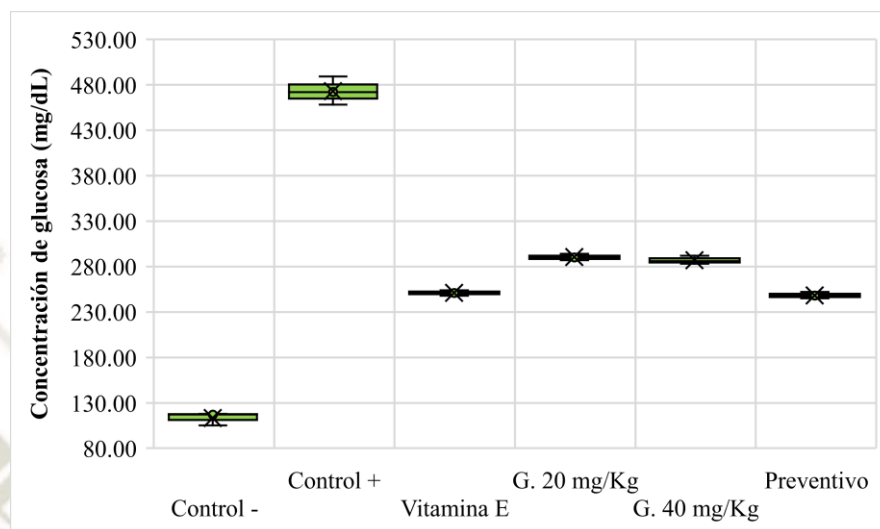


Figura N° 54. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 21.

La evaluación de los tratamientos muestra una diferencia en los niveles de glucosa, los tratamientos “Preventivo” y “Vitamina E” poseen mayor efecto hipoglicemiante seguido de los grupos tratados con el extracto de “Granada” a dosis de 40 mg/Kg y 20 mg/Kg.

j. Evaluación de glucosa Día 24

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 24 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 30* y *Figura N° 55* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N°17)

Se aplicó el test de Tukey dando como resultado que el nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente con una concentración de 108.33 ± 9.02 mg/dL. El grupo “Control (+)” disminuyó el nivel de glucosa con un valor promedio de 468.33 ± 15.28 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

Tabla 30. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 24.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación		
Control (-)	3	108.33	9.02			D
Control (+)	3	468.33	15.28	A		
Vitamina E	3	216.67	5.51			C
Granada 20 mg/Kg	3	262.33	11.68		B	
Granada 40 mg/Kg	3	238.67	4.04		B	C
Preventivo	3	225.00	3.46			C
Valor F crítica	3.1059					
Valor F	492.27					
Valor P	1.9005×10^{-13}					

S.D.: Desviación estándar

Los grupos tratados con el extracto a dosis de “20 mg/Kg” y “40 mg/Kg” no muestran diferencia significativa entre sí con un nivel de glucosa de 262.33 ± 11.68 mg/dL y 238.67 ± 4.04 mg/dL respectivamente. El grupo “Preventivo” presenta un nivel de glicemia de 225 ± 3.46 mg/dL, no difiere de los tratamientos del extracto a dosis de “40 mg/Kg” y “Vitamina E” que tiene una concentración de glucosa de 216.67 ± 5.51 mg/dL, este último difiere de los tratamientos del extracto de “Granada” a ambas dosis.

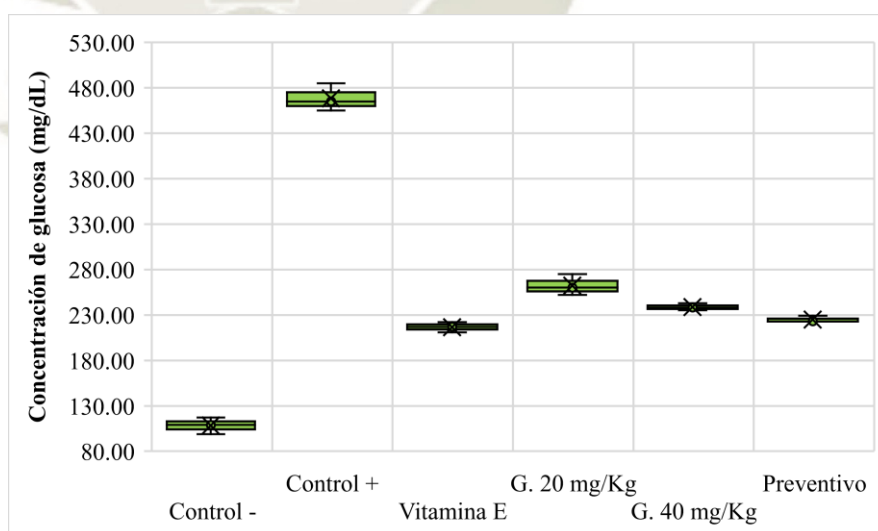


Figura N° 55. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 24.

Los tratamientos “Vitamina E”, “Preventivo” y extracto *Punica granatum L.* a dosis de “40 mg/Kg” evidenciaron poseer mayor efecto

hipoglicemiante seguido del grupo tratado con el extracto a dosis de 20 mg/Kg.

k. Evaluación de glucosa Día 27

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 27 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 31* y *Figura N° 56* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 18)

Tabla 31. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 27.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	100.00	11.53				D
Control (+)	3	472.67	6.03	A			
Vitamina E	3	191.33	4.04			C	
Granada 20 mg/Kg	3	234.67	7.23		B		
Granada 40 mg/Kg	3	193.00	5.57			C	
Preventivo	3	200.00	5.29			C	
Valor F crítica				3.1059			
Valor F				964.25			
Valor P				3.4237×10^{-15}			

S.D.: Desviación estándar

El test de Tukey dio como resultado que el nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente con una concentración de 100 ± 11.53 mg/dL. El grupo “Control (+)” aumentó el nivel de glucosa con un valor promedio de 472.67 ± 6.03 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

El grupo tratado con el extracto a dosis de “20 mg/Kg” difiere significativamente de los demás tratamientos con un nivel de glucosa de 234.67 ± 7.23 mg/dL siendo el tratamiento con menor efecto hipoglicemiante. El grupo “Preventivo” presenta un nivel de glucosa de 200 ± 5.29 mg/dL, el tratamiento a dosis de “40 mg/Kg” con 193 ± 5.57 mg/dL y “Vitamina E” con un valor de 191.33 ± 4.04 mg/dL no difieren entre sí, pero si son significativamente diferentes de los demás grupos.

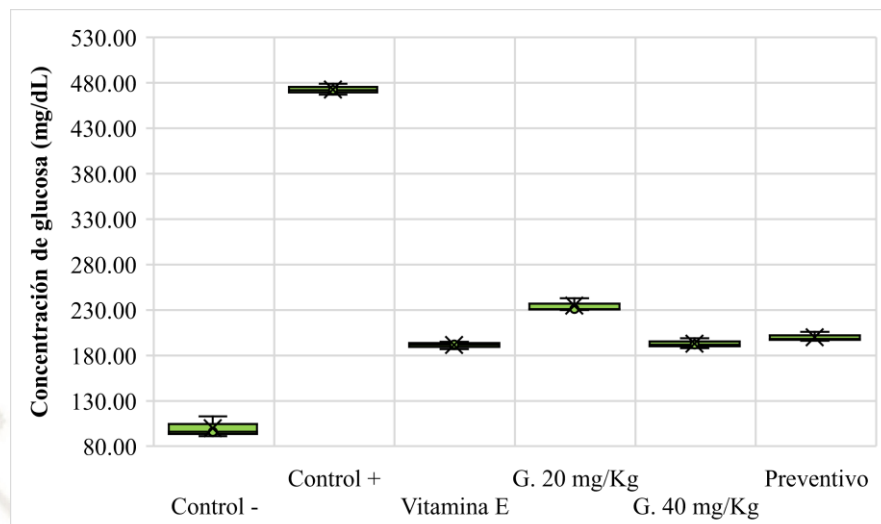


Figura N° 56. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 27.

La evaluación a los veintisiete días de los tratamientos muestra una diferencia en los niveles de glucosa. Los tratamientos “Vitamina E”, extracto *Punica granatum L.* a dosis de “40 mg/Kg” y “Preventivo” poseen mayor efecto hipoglicemiante respecto al grupo tratado con el extracto a dosis de 20 mg/Kg.

I. Evaluación de glucosa Día 30

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 30 del tratamiento poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 32* y *Figura N° 57* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 19)

Como resultado al aplicar el test de Tukey, se obtuvo que el nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente con una concentración promedio de 97 ± 7.00 mg/dL. El grupo “Control (+)” mantuvo su nivel de glucosa con un valor promedio de 472.67 ± 6.66 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

Tabla 32. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 30.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	97.00	7.00				E
Control (+)	3	472.67	6.66	A			
Vitamina E	3	154.67	7.37				D
Granada 20 mg/Kg	3	210.33	1.53		B		
Granada 40 mg/Kg	3	146.00	5.57				D
Preventivo	3	176.67	3.79			C	
Valor F crítica	3.1059						
Valor F	1659.27						
Valor P	1.3287×10^{-16}						

S.D.: Desviación estándar

El grupo tratado con el extracto a dosis de “20 mg/Kg difiere significativamente de los demás tratamientos con un nivel de glucosa de 210.33 ± 1.53 mg/dL, este tratamiento presenta el menor efecto hipoglicemiante. El grupo “Preventivo” también difiere de los otros grupos de estudio y presenta un nivel de glucosa de 176.67 ± 3.79 mg/dL. El tratamiento “Vitamina E” y extracto dosis de “40 mg/Kg” con 154.67 ± 7.37 mg/dL y 146 ± 5.57 mg/dL respectivamente no difieren entre sí, pero si son significativamente diferentes de los demás grupos.

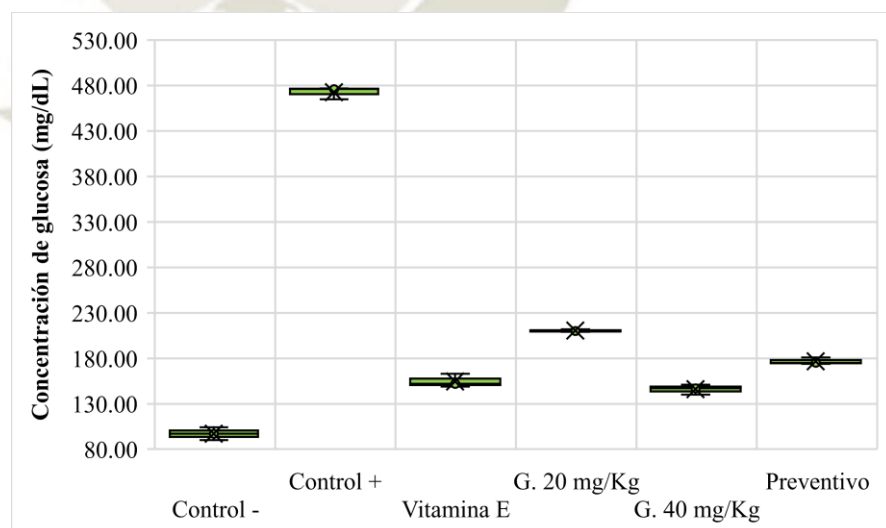


Figura N° 57. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 30.

La evaluación a los treinta días de administración de los tratamientos muestra una diferencia en los niveles de glucosa respecto al día 0. Los

tratamientos extracto *Punica granatum L.* a dosis de “40 mg/Kg” y “Vitamina E” poseen mayor efecto hipoglicemiante seguido del tratamiento “Preventivo” y el extracto a dosis de “20 mg/Kg” es el que presenta menor efecto.

m. Evaluación de glucosa Post-Tratamiento Día 33

Luego de la administración de los tratamientos por treinta días a los grupos de estudio, se realizó la suspensión de estos a fin de analizar los niveles de glucosa por un periodo de quince días.

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 33 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 33* y *Figura N° 58* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 20)

Se aplicó el test de Tukey, se obtuvo como resultado que el nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente con una concentración promedio de 108.67 ± 9.07 mg/dL. El grupo “Control (+)” mantuvo su nivel de glucosa con un valor promedio de 475.33 ± 15.04 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

Tabla 33. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 33.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	108.67	9.07				E
Control (+)	3	475.33	15.04	A			
Vitamina E	3	153.33	5.77			C	D
Granada 20 mg/Kg	3	205.33	1.53		B		
Granada 40 mg/Kg	3	140.67	8.02				D
Preventivo	3	168.00	4.58			C	
Valor F crítica	3.1059						
Valor F	757.94						
Valor P	1.4444×10^{-14}						

S.D.: Desviación estándar

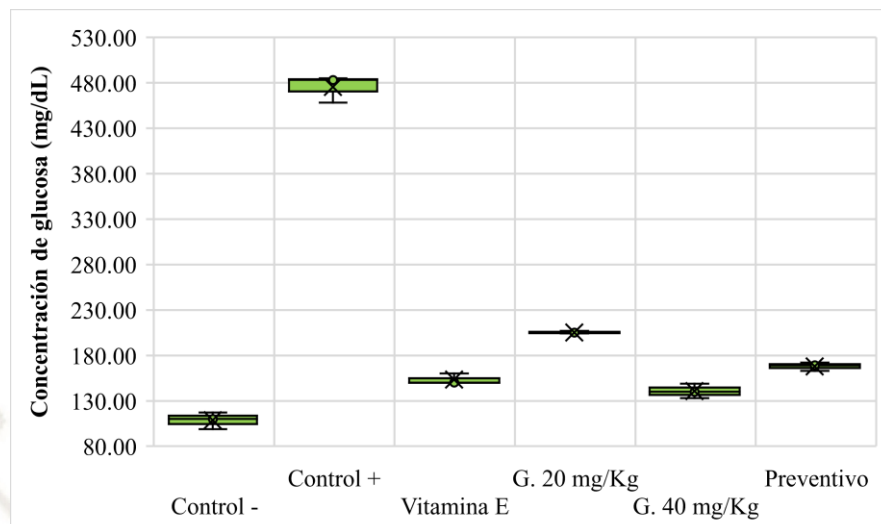


Figura N° 58. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 33.

El grupo tratado con el extracto a dosis de “20 mg/Kg difiere significativamente de los demás tratamientos con un nivel de glucosa de 205.33 ± 1.53 mg/dL, grupo que presenta el menor efecto hipoglicemiante. El grupo “Preventivo” tiene un nivel de glucosa de 168 ± 4.58 mg/dL que no difiere del nivel de glucosa de “Vitamina E” con un nivel de 153.33 ± 5.77 mg/dL, este último no presenta diferencia significativa con el extracto a dosis de “40 mg/Kg” con 140.67 ± 8.02 mg/dL.

La evaluación del nivel de glicemia al tercer día de suspendidos los tratamientos muestra una diferencia en los niveles de glucosa. Los tratamientos extracto *Punica granatum L.* a dosis de “40 mg/Kg” y “Vitamina E” poseen mayor efecto hipoglicemiante seguido del tratamiento “Preventivo” y el extracto a dosis de “20 mg/Kg” es el que presenta menor efecto.

n. Evaluación de glucosa Post-Tratamiento Día 36

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 36 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 34* y *Figura N° 59* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 21)

Tabla 34. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 36.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	110.33	6.03				F
Control (+)	3	481.67	2.52	A			
Vitamina E	3	153.00	7.55			D	
Granada 20 mg/Kg	3	202.67	2.52		B		
Granada 40 mg/Kg	3	140.00	4.36			C	
Preventivo	3	166.33	2.31				E
Valor F crítica	3.1059						
Valor F	2591.99						
Valor P	9.1783×10^{-18}						

S.D.: Desviación estándar

Se aplicó el test de Tukey resultando diferencias entre los seis grupos.

El nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente manteniendo una concentración promedio de 110.33 ± 6.03 mg/dL.

El grupo “Control (+)” aumentó ligeramente su nivel de glucosa con un valor promedio de 481.67 ± 2.52 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

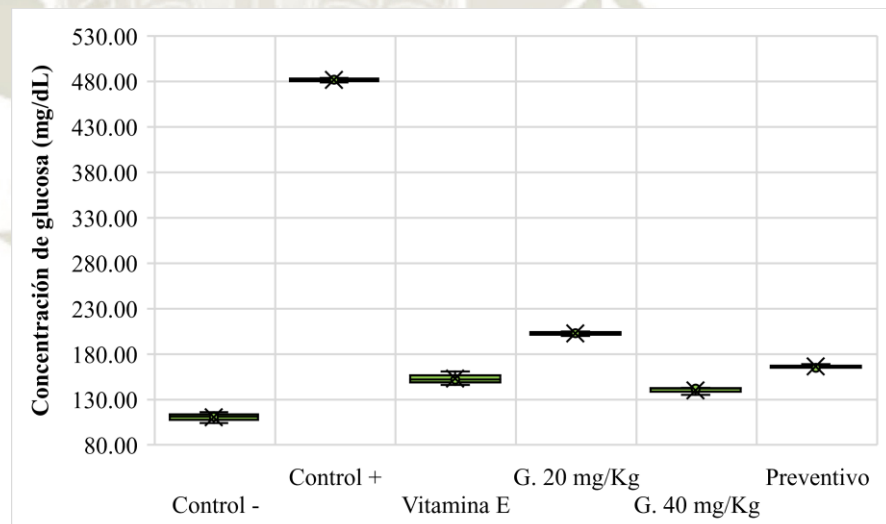


Figura N° 59. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 36.

El grupo tratado con el extracto de “Granada” a dosis de “20 mg/Kg” muestra diferencia significativa con un nivel de glucosa de 202.67 ± 2.52 mg/dL, presenta el menor efecto hipoglicemiante de todos los tratamientos; seguido del grupo “Preventivo” con un nivel de 166.33

± 2.31 mg/dL. El grupo “Vitamina E” y extracto a dosis de “40 mg/Kg” tienen una concentración de glucosa de 153 ± 7.55 mg/dL y 140 ± 4.36 mg/dL respectivamente.

La evaluación del nivel de glicemia al sexto día de suspendidos los tratamientos muestra una diferencia notable en los niveles de glucosa, el tratamiento de extracto de “Granada” a dosis de 40 mg/Kg posee el mayor efecto hipoglicemiante seguido de los grupos tratados con “Vitamina E” y “Preventivo”.

o. Evaluación de glucosa Post-Tratamiento Día 39

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 39 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 35* y *Figura N° 60* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 22)

Se aplicó el test de Tukey, se obtuvo como resultado que el nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente con una concentración promedio de 105 ± 7.21 mg/dL. El grupo “Control (+)” disminuyó ligeramente su nivel de glucosa con un valor promedio de 474.50 ± 7.78 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

Tabla 35. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 39.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	105.00	7.21				E
Control (+)	2	474.50	7.78	A			
Vitamina E	3	151.33	6.66			C	D
Granada 20 mg/Kg	3	203.00	2.65		B		
Granada 40 mg/Kg	3	136.33	5.51				D
Preventivo	3	164.00	3.61			C	
Valor F crítica	3.2039						
Valor F	1238.65						
Valor P	9.6932×10^{-15}						

S.D.: Desviación estándar

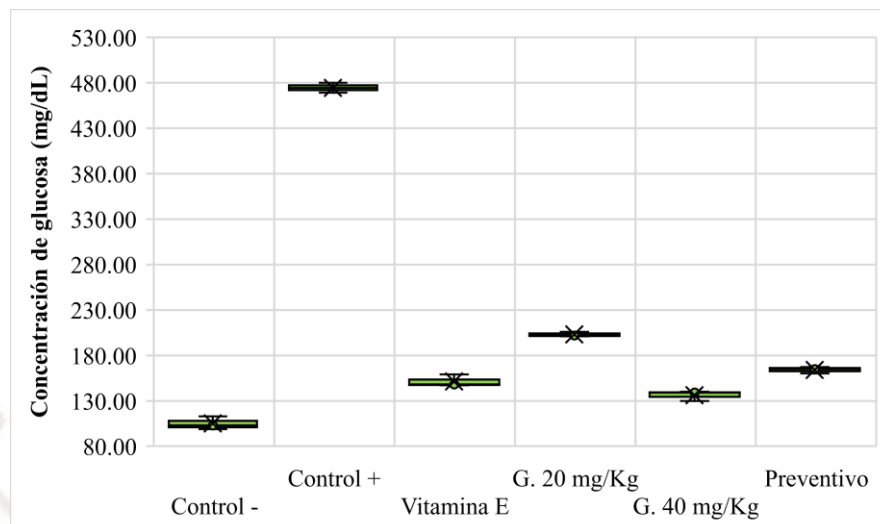


Figura N° 60. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 39.

El grupo tratado con el extracto a dosis de “20 mg/Kg difiere significativamente de los demás tratamientos con un nivel de glucosa de 203 ± 2.65 mg/dL, grupo que presenta el menor efecto hipoglicemiante. El grupo “Preventivo” tiene un nivel de glucosa de 164 ± 3.61 mg/dL que no difiere del nivel de glucosa de “Vitamina E” con un nivel de 151.33 ± 6.66 mg/dL, este último no presenta diferencia significativa con el extracto a dosis de “40 mg/Kg” con 136.33 ± 5.51 mg/dL.

La evaluación del nivel de glicemia al noveno día de suspendidos los tratamientos muestra una diferencia en los niveles de glucosa. Los tratamientos del extracto *Punica granatum L.* a dosis de “40 mg/Kg” y “Vitamina E” poseen mayor efecto hipoglicemiante seguido del tratamiento “Preventivo” y el extracto a dosis de “20 mg/Kg” es el que presenta menor efecto.

p. Evaluación de glucosa Post-Tratamiento Día 42

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 42 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 36* y *Figura N° 61* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N°23)

Tabla 36. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 42.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación			
Control (-)	3	109.33	7.23				F
Control (+)	1	476.0	0.00	A			
Vitamina E	3	148.67	4.51			D	
Granada 20 mg/Kg	3	199.33	3.51		B		
Granada 40 mg/Kg	3	133.67	5.13				E
Preventivo	3	164.67	4.93			C	
Valor F crítica	3.3258						
Valor F	830.25						
Valor P	9.3735×10^{-13}						

S.D.: Desviación estándar

Al aplicar el test de Tukey, los resultados presentan diferencias entre los seis grupos.

El nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente manteniendo una concentración promedio de 109.33 ± 7.23 mg/dL. El grupo “Control (+)” mantuvo su nivel de glucosa con un valor promedio de 476 ± 0.00 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

El grupo tratado con el extracto de “Granada” a dosis de “20 mg/Kg” muestra diferencia significativa con un nivel de glucosa de 199.33 ± 3.51 mg/dL presenta el menor efecto hipoglicemiante de todos los tratamientos, seguido del grupo “Preventivo” con un nivel de 164.67 ± 4.93 mg/dL. El grupo “Vitamina E” y extracto a dosis de “40 mg/Kg” tienen una concentración de glucosa de 148.67 ± 4.51 mg/dL y 133.67 ± 5.13 mg/dL respectivamente.

La evaluación del nivel de glicemia al doceavo día de suspendidos los tratamientos muestra una diferencia notable en los niveles de glucosa, el tratamiento de extracto de “Granada” a dosis de 40 mg/Kg posee el mayor efecto hipoglicemiante seguido de los grupos tratados con “Vitamina E” y “Preventivo”.

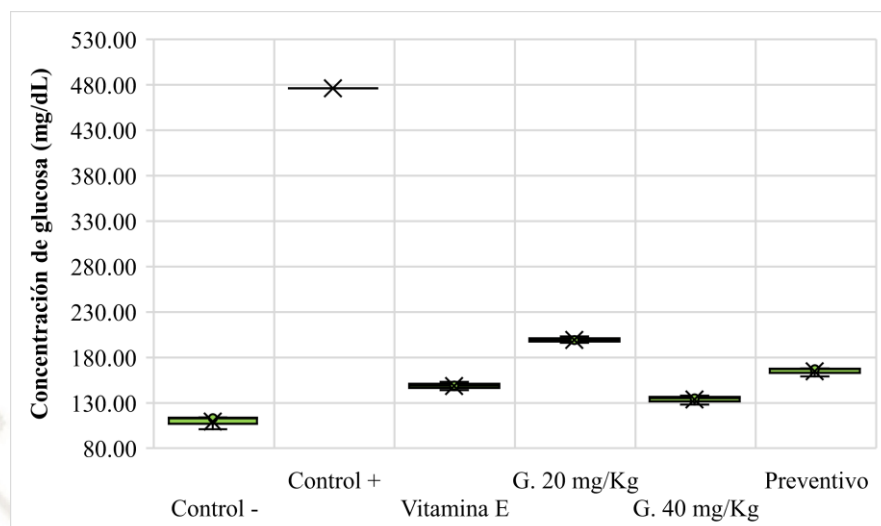


Figura N° 61. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 42.

q. Evaluación de glucosa Post-Tratamiento Día 45

El análisis estadístico muestra que los niveles de glucosa Post-STZ entre los grupos de experimentación al día 45 poseen diferencia significativa ($p < 0.05$). En la *Tabla 37* y *Figura N° 62* se muestra la comparación de los niveles de glucosa promedio. (Anexo N° 24)

Se aplicó el test de Tukey resultando diferencias entre los seis grupos.

El nivel de glucosa del grupo “Control (-)” difiere significativamente manteniendo una concentración promedio de 111.67 ± 4.16 mg/dL.

El grupo “Control (+)” mantuvo su nivel de glucosa con un valor promedio de 478 ± 0.00 mg/dL debido a que este solo recibió el vehículo empleado en los demás tratamientos.

El grupo tratado con el extracto de “Granada” a dosis de “20 mg/Kg” muestra diferencia significativa con un nivel de glucosa de 200 ± 1.41 mg/dL presenta el menor efecto hipoglicemiante, seguido del grupo “Preventivo” que tiene un nivel de 162 ± 4.36 mg/dL. El grupo “Vitamina E” y extracto de “40 mg/Kg” tienen una concentración de glucosa de 147 ± 1.41 mg/dL y 132.33 ± 3.51 mg/dL respectivamente, tratamientos que presentan mayor disminución del nivel de glicemia.

Tabla 37. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 45.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación					
Control (-)	3	111.67	4.16						F
Control (+)	1	478.0	0.00	A					
Vitamina E	2	147.00	1.41				D		
Granada 20 mg/Kg	2	200.00	1.41		B				
Granada 40 mg/Kg	3	132.33	3.51					E	
Preventivo	3	162.00	4.36			C			
Valor F crítica	3.68.75								
Valor F	1774.29								
Valor P	5.9392×10^{-12}								

S.D.: Desviación estándar

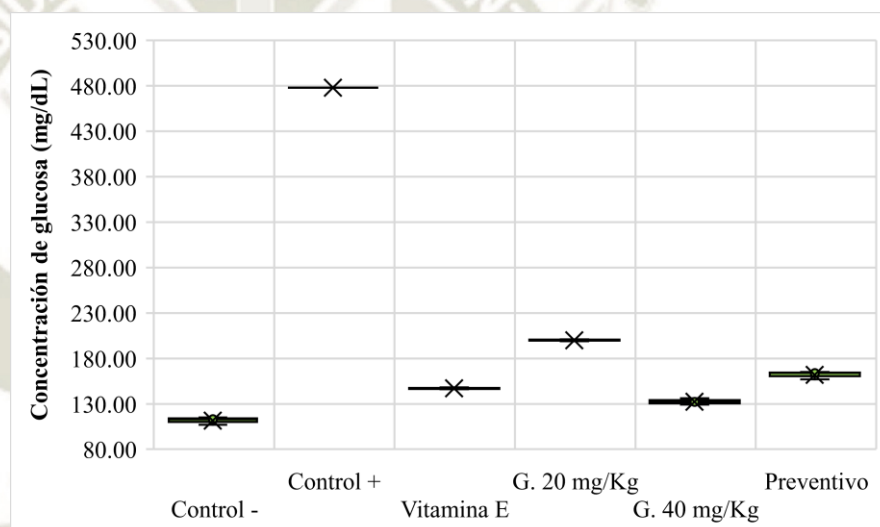


Figura N° 62. Comparación del nivel de glucosa (mg/dL) entre los grupos experimentales al Día 45.

La evaluación al doceavo día de suspendidos los tratamientos muestra que el tratamiento de extracto de “Granada” a dosis de 40 mg/Kg posee el mayor efecto hipoglicemiante seguido de los grupos tratados con “Vitamina E” y “Preventivo”.

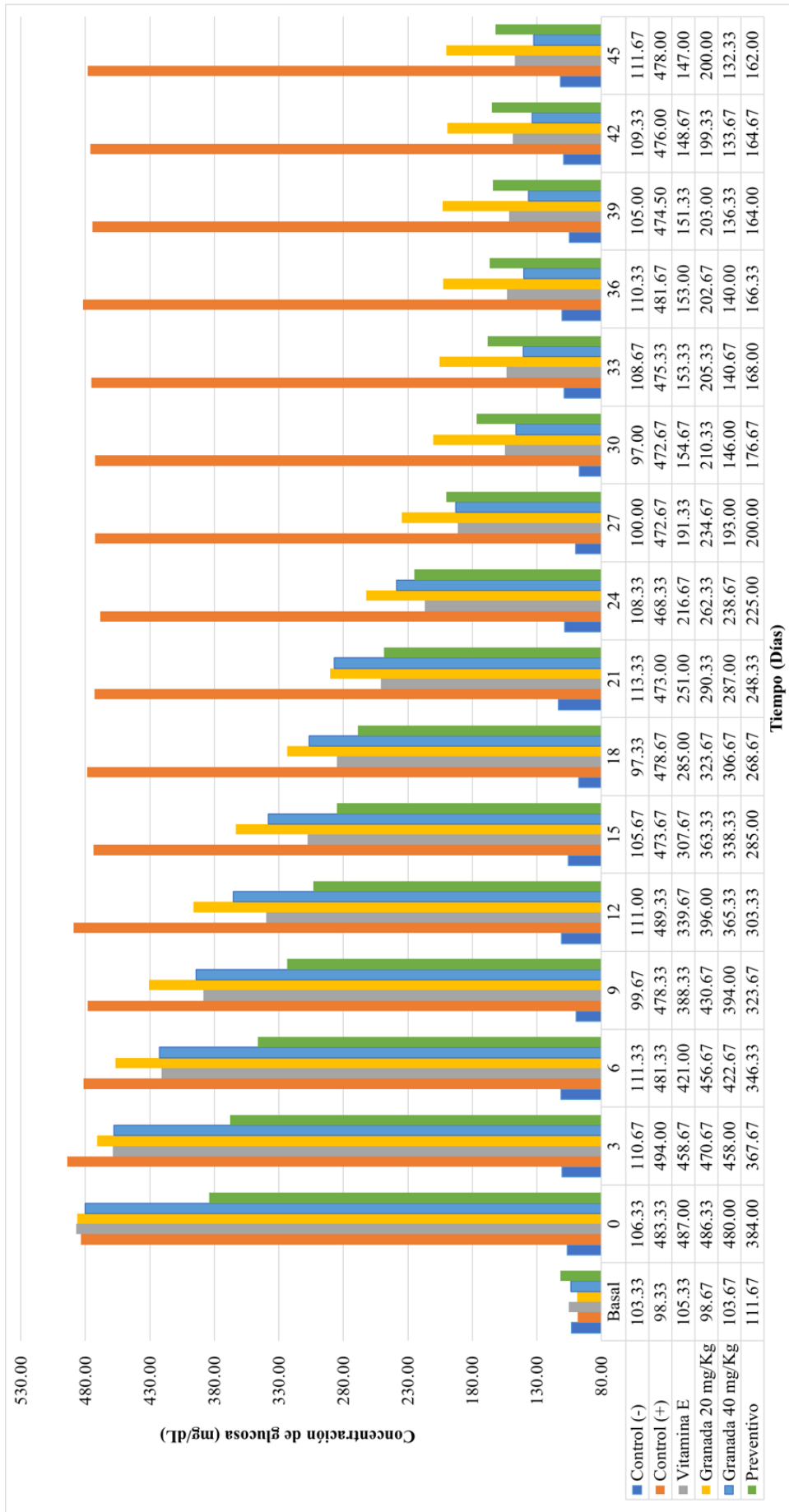


Figura N° 63. Análisis estadístico de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales por día de toma de muestra.

La Figura N° 63 muestra un resumen del análisis estadístico de los niveles de glucosa entre los grupos experimentales: Control (-), Control (+), Vitamina E, extracto de granada a dosis de 20 mg/Kg y 40 mg/Kg, y el grupo preventivo; presentados en un gráfico de barras.

Se puede observar que el análisis estadístico a los días basal, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 y 45 entre los grupos experimentales, determinaron que la toma de muestra de glucosa basal fue fundamental para determinar el inicio del estudio en igualdad de condiciones entre los grupos experimentales. Luego de la administración de STZ, los niveles de glucosa mayores a 200 mg/dL indican una inducción de Diabetes experimental exitosa. En la primera parte del estudio se observó resultados favorables para el grupo “Preventivo”, se observa también el buen efecto hipoglicémico del extracto a dosis de 40 mg/Kg en la parte final del estudio y el extracto a dosis de 20 mg/Kg posee el menor efecto.

4.2.3. Evaluación del nivel de glucosa promedio durante el periodo de estudio.

Los resultados obtenidos de los niveles de glucosa durante el tratamiento de 30 días y el monitoreo post-tratamiento por 15 días (total de 45 días) de estudio se especifican en la *Tabla 38* y *Figura N° 64* donde muestra el efecto hipoglicémico que posee *Punica granatum L.* “Granada” y la vitamina E, usado como tratamiento control.

Los niveles de glucosa promedio para el “Control (-)” y “Control (+)” fueron de 106.41 mg/dL y 455.83 mg/dL respectivamente, manteniendo los valores estables a lo largo del estudio.

Los grupos a los que se les administró STZ para la inducción de Diabetes tuvieron un incremento considerable en la concentración de glucosa respecto a los valores basales, este incremento oscila en un intervalo que tiene como valor mínimo promedio 384 ± 9.17 mg/dL en el grupo “Preventivo” y un valor máximo de 487 ± 8.19 mg/dL de glucosa en el grupo tratado con Vitamina E.

Para los grupos experimentales tratados con el extracto etanólico de *Punica granatum L.* “Granada” a dosis de 20 mg/Kg, 40 mg/Kg, preventivo y el tratamiento con vitamina E; a los 30 días de tratamiento evidencian una disminución considerable de los niveles de glucosa respecto al día 0. A partir del sexto día de tratamiento empieza a observarse una disminución más notable de la glicemia en los grupos.

Durante el periodo de monitoreo post-tratamiento se observó que la glicemia se mantenía o seguía disminuyendo, confirmando de esta manera que los tratamientos usados son efectivos frente a la hiperglicemia.

Tabla 38. Niveles de glucosa promedio de los grupos de estudio durante 45 días de monitoreo.

NIVEL DE GLUCOSA				
Grupo		Control (-)	Control (+)	Vitamina E
Concentración de glucosa (mg/dL)	Basal	103.33 ± 9.07	98.33 ± 4.51	105.33 ± 5.51
	Día 0	106.33 ± 10.50	483.33 ± 7.77	487.00 ± 8.19
	Día 3	110.67 ± 7.09	494.00 ± 1.73	458.67 ± 6.51
	Día 6	111.33 ± 12.42	481.33 ± 19.66	421.00 ± 5.57
	Día 9	99.67 ± 6.66	478.33 ± 7.09	388.33 ± 4.04
	Día 12	111.00 ± 11.27	489.33 ± 4.04	339.67 ± 4.93
	Día 15	105.67 ± 10.50	473.67 ± 4.93	307.67 ± 4.16
	Día 18	97.33 ± 3.79	478.67 ± 24.19	285.00 ± 4.58
	Día 21	113.33 ± 7.23	473.00 ± 15.52	251.00 ± 3.00
	Día 24	108.33 ± 9.02	468.33 ± 15.28	216.67 ± 5.51
	Día 27	100.00 ± 11.53	472.67 ± 6.03	191.33 ± 4.04
	Día 30	97.00 ± 7.00	472.67 ± 6.66	154.67 ± 7.37
	Día 33	108.67 ± 9.07	475.33 ± 15.04	153.33 ± 5.77
	Día 36	110.33 ± 6.03	481.67 ± 2.52	153.00 ± 7.55
	Día 39	105.00 ± 7.21	474.50 ± 7.78	151.33 ± 6.66
Día 42	109.33 ± 7.23	476.00 ± 0.00	148.67 ± 4.51	
Día 45	111.67 ± 4.16	478.00 ± 0.00	147.00 ± 1.41	
Grupo		Granada 20 mg/Kg	Granada 40 mg/Kg	Preventivo
Concentración de glucosa (mg/dL)	Basal	98.67 ± 3.51	103.67 ± 5.86	111.67 ± 4.51
	Día 0	486.33 ± 8.74	480.00 ± 7.55	384.00 ± 9.17
	Día 3	470.67 ± 2.52	458.00 ± 3.61	367.67 ± 9.07
	Día 6	456.67 ± 4.51	422.67 ± 5.69	346.33 ± 6.66
	Día 9	430.67 ± 4.51	394.00 ± 5.57	323.67 ± 8.50
	Día 12	396.00 ± 4.58	365.33 ± 6.03	303.33 ± 4.73
	Día 15	363.33 ± 5.03	338.33 ± 6.11	285.00 ± 7.00
	Día 18	323.67 ± 7.57	306.67 ± 2.08	268.67 ± 5.86
	Día 21	290.33 ± 3.51	287.00 ± 4.58	248.33 ± 3.51
	Día 24	262.33 ± 11.68	238.67 ± 4.04	225.00 ± 3.46
	Día 27	234.67 ± 7.23	193.00 ± 5.57	200.00 ± 5.29
	Día 30	210.33 ± 1.53	146.00 ± 5.57	176.67 ± 3.79
	Día 33	205.33 ± 2.52	140.67 ± 8.02	168.00 ± 4.58
	Día 36	202.67 ± 2.65	140.00 ± 4.36	166.33 ± 2.31
	Día 39	203.00 ± 3.51	136.33 ± 5.51	164.00 ± 3.61
Día 42	199.33 ± 1.53	133.67 ± 5.13	164.67 ± 4.93	
Día 45	200.00 ± 1.41	132.33 ± 3.51	162.00 ± 4.36	

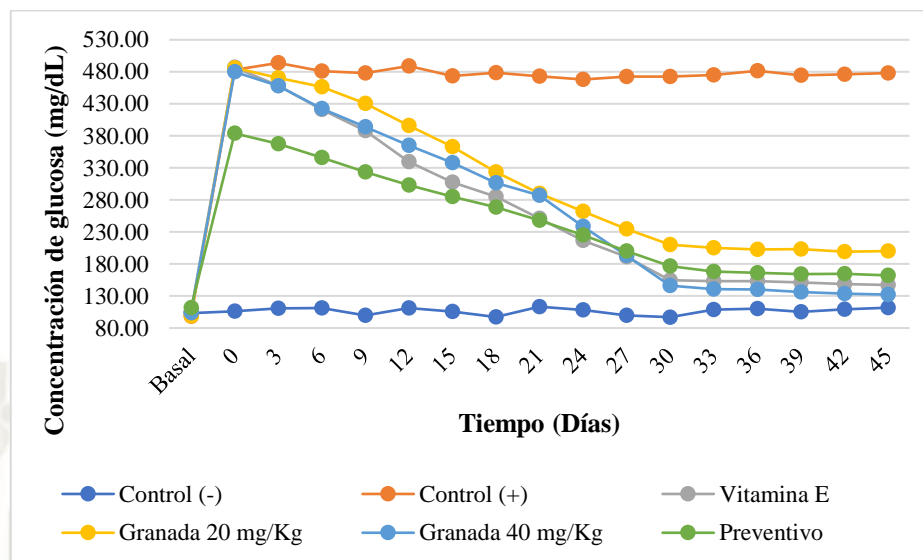


Figura N° 64. Comparación de los niveles de glucosa promedio de los grupos de estudio durante 45 días de monitoreo.

El mayor efecto hipoglicemiente se le confiere al extracto etanólico a una dosis de 40 mg/Kg con un 72.43% de disminución del nivel de glucosa, seguido del tratamiento de vitamina E con un 69.82%. El grupo “Preventivo” presentó un 57.81% de disminución, resultado ligeramente menor al 58.88% del extracto etanólico a dosis de 20 mg/Kg. Sin embargo, cabe recalcar que las unidades de experimentación del grupo preventivo presentaron una elevación de glicemia de 384 mg/dL, notablemente menor en comparación con los demás grupos se muestra en el *Figura N° 63*. Además, al comparar los valores finales al día 45 de glicemia, el tratamiento que menor efecto hipoglicemiente presentó fue el extracto etanólico a dosis de 20 mg/Kg.

4.2.4. Evaluación del Área Bajo la Curva de los Grupos Experimentales

La comparación del Área Bajo la Curva (AUC) tiene como finalidad evaluar si existen similitudes o diferencias significativas entre los grupos experimentales considerando las mediciones desde el inicio (Basal) hasta el término del estudio (día 45), para ello se realizó el análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey para una comparación más específica entre los grupos. El nivel de significancia resultó $p < 0.05$.

Tabla 39. Comparación de área bajo la curva (AUC) de los grupos experimentales.

Grupo	N	Media	S.D.	Agrupación		
Control (-)	3	4894.83	127.25			D
Control (+)	3	19422.83	2176.92	A		
Vitamina E	3	11962.67	343.14		B	C
Granada 20 mg/Kg	3	13871.00	433.35		B	
Granada 40 mg/Kg	3	12311.33	136.97		B	C
Preventivo	3	11289.83	176.77			C
Valor F crítica	3.1059					
Valor F	76.90					
Valor P	1.0832×10^{-8}					

S.D.: Desviación estándar

El test de ANOVA del área bajo la curva de los diferentes tratamientos dio como resultado la existencia de diferencia significativa entre los grupos de estudio. (Anexo N° 25)

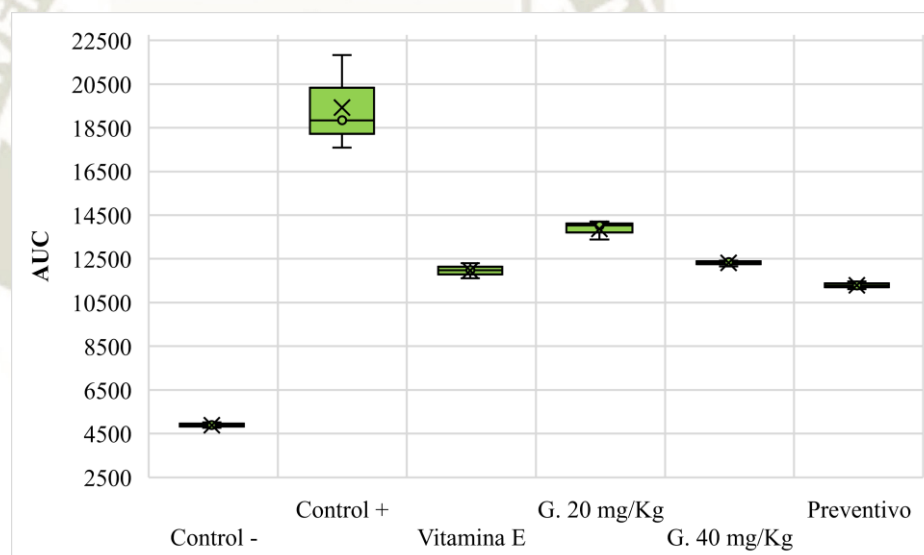


Figura N° 65. Comparación de área bajo la curva (AUC) de los grupos experimentales.

Luego de realizado el test de Tukey como se observa en la *Tabla 39* y *Figura N° 65*, el grupo “Control (-)” tiene área promedio de 4894.83 ± 127.25 que es diferentemente significativo por ser el AUC de menor valor en comparación con los otros grupos de estudio, este valor hace referencia a los valores de glicemia del grupo que no fue inducido a Diabetes. Por el contrario, el grupo “Control (+)” tiene un área promedio de 19422.83 ± 2176.92 , ésta es el área de mayor valor por ser el grupo inducido a

Diabetes que presenta niveles elevados de glucosa al que se le administró el vehículo empleado en los demás tratamientos. Se concluye que existe una relación inversamente proporcional entre el AUC y el efecto hipoglicemiante.

De los grupos que recibieron los tratamientos, el tratamiento de extracto etanólico de *Punica granatum L.* a dosis de “20 mg/Kg” mostró un área bajo la curva de 13871 ± 433.35 indicando que existe diferencia significativa comparado con los grupos controles; sin embargo, no difiere de los tratamientos de extracto a dosis de “40 mg/Kg” y “Vitamina E” con valores de 12311.33 ± 136.97 y 11962.67 ± 343.14 respectivamente. Estos dos últimos grupos no presentan diferencia significativa con el grupo “Preventivo” que presenta un área bajo la curva de 11289.83 ± 176.77 . Los grupos tratados con el extracto etanólico de *Punica granatum L.* a las dosis usadas, la vitamina E y el grupo preventivo tienen áreas bajo la curva significativamente menores al “Control (+)” que fue inducido a Diabetes.

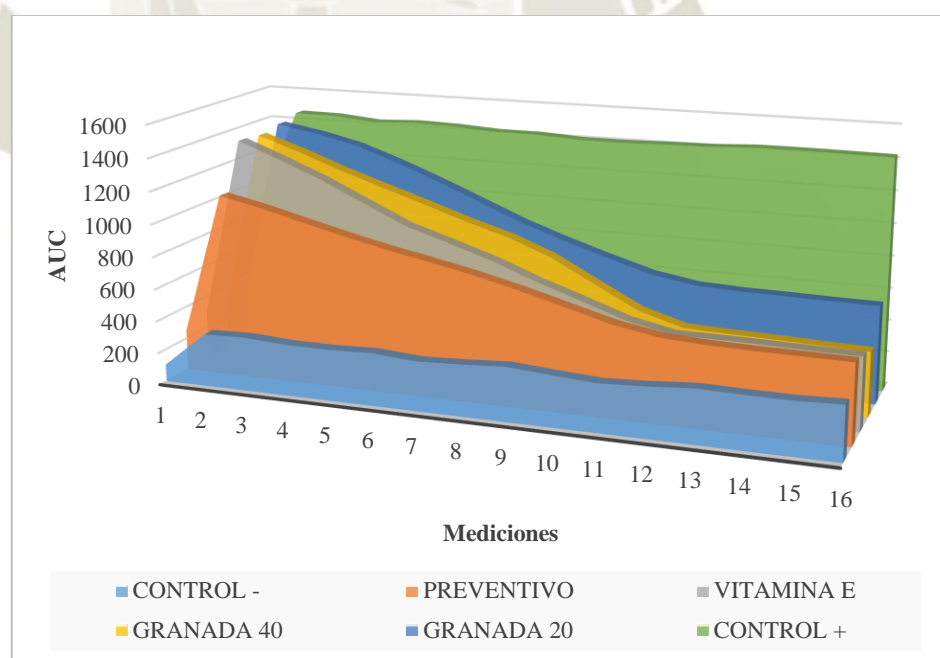


Figura N° 66. Área bajo la curva (AUC) de los diferentes tratamientos en relación al tiempo de estudio.

Se llega a la conclusión que el mejor tratamiento con efecto hipoglicemiante es el Preventivo dado al menor valor calculado de área bajo la curva, seguido de la vitamina E y extracto de “Granada” a dosis de

40 mg/Kg. Finalmente, el tratamiento del extracto a dosis de 20 mg/Kg fue el de menor eficacia frente a la hiperglicemia.

La *Figura N° 66* muestra las áreas bajo la curva de los resultados de los tratamientos empleados.

La disminución de los niveles séricos de glucosa en la presente investigación corrobora lo hallado en el estudio titulado “*Antioxidant effect of pomegranate against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats*” de Anahita Aboonabi y colaboradores, sobre las propiedades biológicas antioxidantes e hipoglicemiantes de los compuestos fenólicos tales como flavonoides, taninos, lignanos, xantonas, antocianinas, entre otros; contenidos en el jugo y semilla de *Punica granatum L.* “Granada” al haberse demostrado la disminución del estrés oxidativo y del nivel sérico de glucosa generados por la inducción de Diabetes en ratas. Además, los artículos científicos de Raghad Khalid Al-Ishaq y colaboradores, titulado “*Flavonoids and their anti-diabetic effects: Cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels*”, y de Lan Bai y colaboradores, titulado “*Antidiabetic potential of flavonoids from traditional chinese medicine: A review*”; indican que flavonoides como quercetina, kaempferol, luteolina, apigenina, catequina y miricetina ayudan a reducir el nivel de glucosa sérico por el aumento de la captación de esta en el músculo esquelético y adiposo a través de la activación de PPAR y/o al estimular la translocación de GLUT4; promueven la síntesis y secreción de insulina; inhiben la secreción de citoquinas proinflamatorias por su acción inhibitoria sobre NFκB y TNFα evidenciándose el efecto antiinflamatorio sobre las células beta pancreáticas; mejoran la viabilidad, proliferación celular y disminuyen la apoptosis celular en el páncreas; también restablecen los sistemas antioxidantes endógenos por la activación de Nrf2 protegiendo a las células de la oxidación en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Estos mecanismos ayudan a evitar y/o contrarrestar el daño generado por la glucotoxicidad; a consecuencia protegen el organismo de efectos nocivos que se presentan durante la enfermedad y complicaciones asociadas^(2,101,102).

Los AGPI como el ácido araquidónico y el ácido linoleico presentes en la semilla de *Punica granatum L.* “Granada” como lo evidencia la presente investigación, mejoran la sensibilidad a la insulina, previenen la disminución de su secreción y disminuyen la glucosa plasmática debido a su unión como ligandos de PPAR estimulando la activación

de esta vía, dicha información se encuentra en la revisión científica de Thomas Sonnweber y colaboradores, titulada “*Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases*” y en el artículo científico de Martha A. Belury y colaboradores, titulado “*Linoleic acid, glycemic control and type 2 Diabetes*”^(103,104).

Los compuestos fenólicos tales como flavonoides y taninos, y los AGPI presentes en los extractos; según como indican los artículos científicos citados anteriormente, serían los responsables del efecto hipoglucemiante que se le atribuye a las semillas de *Punica granatum L.* “Granada”.

5. Ensayo DPPH: “Determinación de la capacidad antioxidante”

Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de las semillas de *Punica granatum L.* “Granada” se utilizó el método DPPH.

5.1. Elaboración de la Curva de Calibración

Se preparó las soluciones stock de los reactivos de DPPH y Trolox y los estándares que se usaron para la curva de calibración como se describe en la parte 3.7.2 y 3.7.3 del Capítulo II. Los estándares de trolox que fueron tratados con el reactivo DPPH se muestran en la siguiente figura.

La coloración de los estándares de trolox para la curva de calibración se aprecian en la siguiente figura:

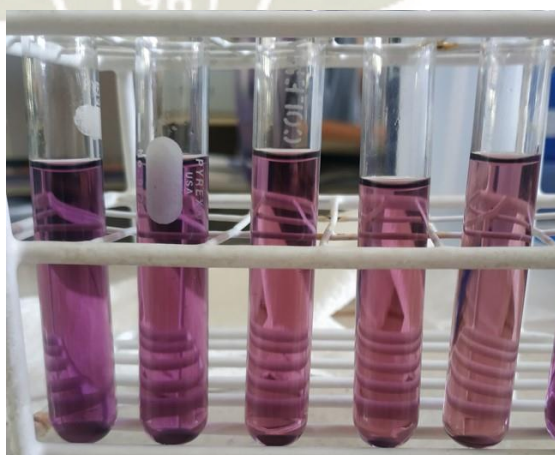


Figura N° 67. Estándares de trolox tratados con DPPH.

El radical DPPH de coloración violeta puede decolorarse hasta amarillo ante la presencia de una sustancia antioxidante. Las absorbancias obtenidas de los estándares de Trolox luego de la lectura a 517 nm en el espectrofotómetro se muestran en la *Tabla 40*.

Tabla 40. Calibración del método DPPH.

Concentración de Trolox (µM)	Absorbancia			Promedio	S.D.	C.V. %
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
5	1.4197	1.4205	1.4226	1.4209	0.0015	0.11
10	1.2806	1.2855	1.3006	1.2889	0.0104	0.81
15	1.1652	1.1506	1.1438	1.1532	0.0109	0.95
20	1.0306	1.0347	1.0238	1.0297	0.0055	0.53
25	0.8843	0.8942	0.9010	0.8932	0.0084	0.94

S.D.: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual.

Para la obtención del gráfico de la curva de calibración del método DPPH se utilizó el promedio obtenido de las absorbancias de los estándares de Trolox y sus concentraciones. Del promedio de las tres repeticiones se obtuvo un r^2 de 0.9998 cercano a la unidad lo que indica linealidad, la ecuación de regresión consta de una pendiente [b] de -0.0263 y un intercepto [a] de 1.5516. A partir de estos valores se realizaron los cálculos correspondientes.

La curva de calibración se presenta en la *Figura N° 68*.

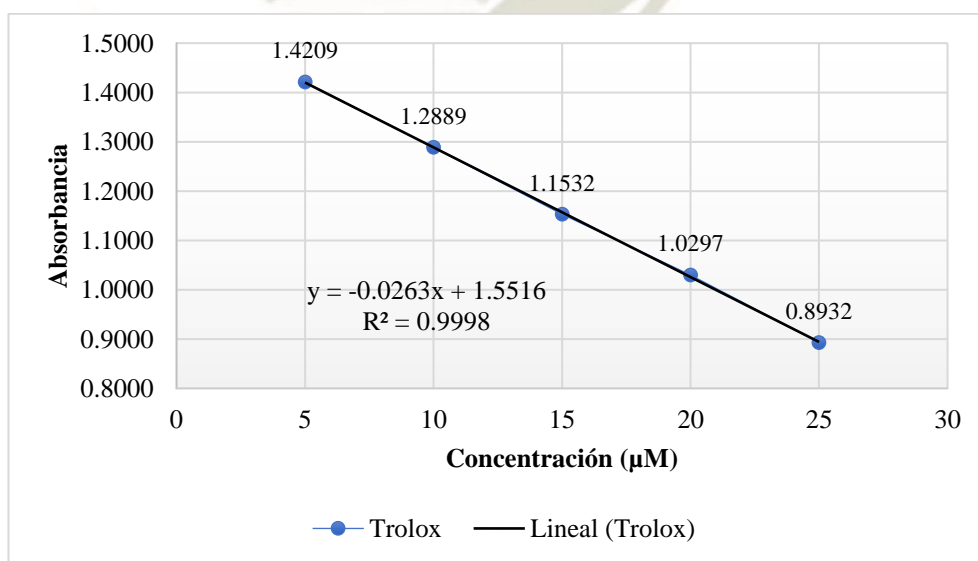


Figura N° 68. Curva de calibración de método DPPH.

5.2. Determinación de la concentración de las muestras

Las muestras de los extractos de “Granada” y de vitamina E se prepararon como indica el apartado 3.7.4 del Capítulo II para obtener posteriormente las lecturas de la absorbancia. La concentración de las muestras está expresada en micro mol (μM) de equivalente Trolox (TE) que es calculada a partir de la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración que se encuentra la *Figura N° 68*.

$$\text{Ecuación de regresión lineal} \rightarrow y = -0.0263x + 1.5516$$

Donde: y = absorbancia

x = concentración

Tabla 41. Concentración de extractos de semilla de "Granada" y vitamina E en μM TE por el método DPPH.

Muestra	Absorbancia			Promedio	S.D.	C.V. %	μM TE
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3				
Extracto Etanol	1.0610	1.0640	1.0539	1.0596	0.0052	0.49	18.70
Extracto Acetato Etilo	1.1008	1.1145	1.0976	1.1043	0.0090	0.81	17.01
Extracto Hexano	1.2775	1.2730	1.2699	1.2735	0.0038	0.30	10.58
Vitamina E	1.0950	1.1024	1.0871	1.0948	0.0077	0.70	17.37

S.D.: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual. μM TE: μM equivalente trolox.

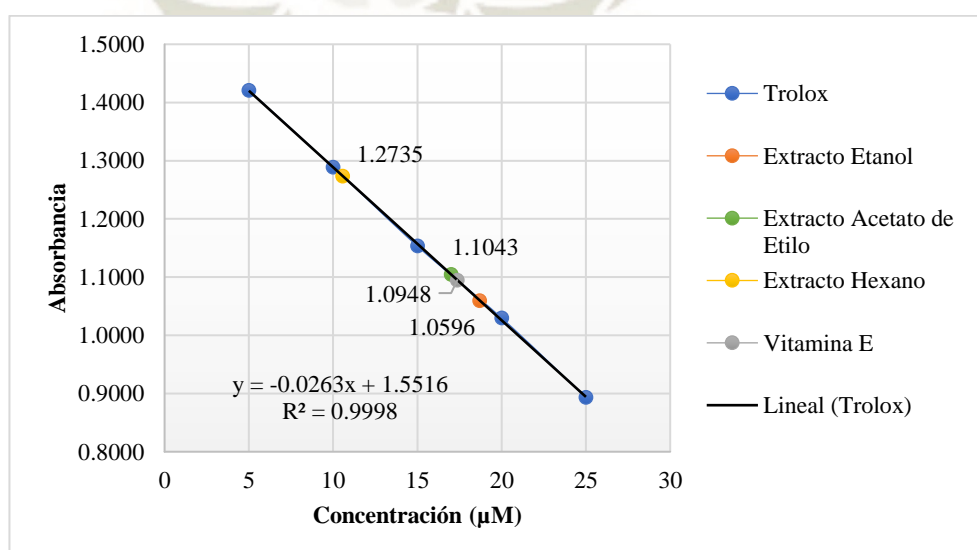


Figura N° 69. Datos de las muestras interpoladas en la curva de calibración.

La concentración obtenida en $\mu\text{M TE}$ de las muestras descrita en la *Tabla 41* está referida únicamente a la cantidad de muestra añadida al análisis. El factor de dilución final usado fue de 400, la concentración real en mM TE para cada extracto de “Granada” y vitamina E se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 42. Concentración en $\mu\text{M ET}$ de los extractos de “Granada” y vitamina E.

Muestra	$\mu\text{M TE}$	$\text{mM TE} \times \text{F.D.}$
Extracto Etanol	18.70	7.48
Extracto Acetato Etilo	17.01	6.80
Extracto Hexano	10.58	4.23
Vitamina E	17.37	6.95

TE: equivalente trolox. F.D.: Factor de dilución (400)

5.3. Porcentaje de Inhibición de DPPH en función de Trolox

Para hallar el porcentaje de inhibición de DPPH de los estándares de Trolox respecto a su concentración se consideró como 100% de DPPH el blanco 2 con una absorbancia de 1.5508.

El cálculo del porcentaje de inhibición de DPPH empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{Abs_{Antioxidante}}{Abs_{Blanco}} \right) \times 100$$

Donde: $Abs_{Antioxidante}$ = Absorbancia de trolox o muestras

Abs_{Blanco} = Absorbancia del blanco 2 (100% de DPPH)

Los resultados del cálculo del porcentaje de inhibición de DPPH para cada estándar de Trolox se muestran en la *Tabla 43*.

Tabla 43. Porcentaje de inhibición de DPPH.

Concentración de Trolox (μM)	% Inhibición DPPH			Promedio	S.D.	C.V. %
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
5	8.72	7.59	8.81	8.37	0.6799	8.12
10	17.66	16.37	16.64	16.89	0.6804	4.03
15	25.08	25.15	26.69	25.64	0.9100	3.55
20	33.74	32.68	34.37	33.60	0.8541	2.54
25	43.14	41.83	42.25	42.41	0.6689	1.58

S.D.: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual

En la *Figura N° 70* se observa la curva de calibración del porcentaje de inhibición de DPPH frente a la concentración de Trolox, obteniéndose un valor r^2 de 0.9998, una pendiente [b] de 1.6955 y un intercepto [a] de -0.0507.

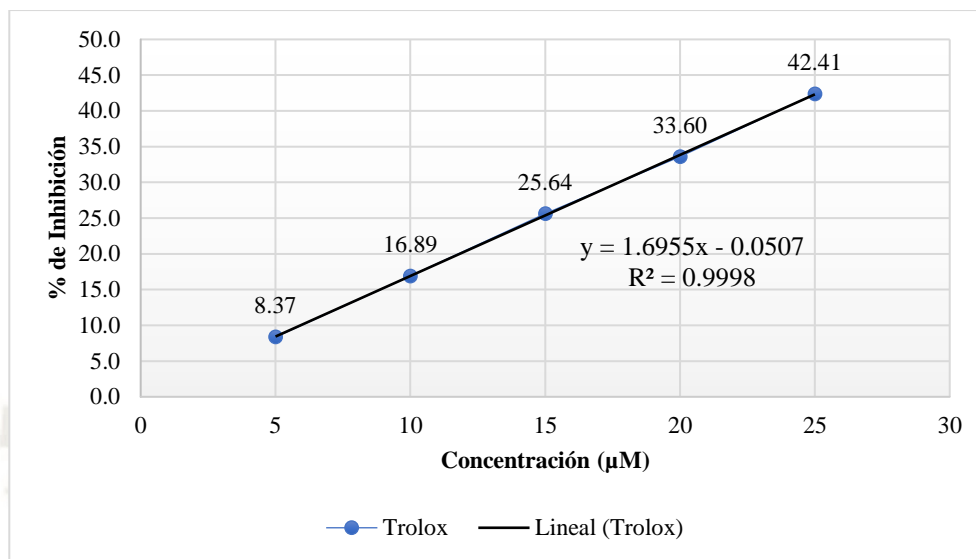


Figura N° 70. Curva de calibración de porcentaje de inhibición de DPPH.

5.4. Porcentaje de inhibición de DPPH de las muestras

A partir de las absorbancias obtenidas que se muestran en la *Tabla 41* se realizaron los cálculos para hallar el porcentaje de inhibición de DPPH de los extractos de “Granada” y vitamina E usando la fórmula mencionada en el apartado anterior 5.3. de esta sección. El porcentaje de inhibición de los extractos se muestra en la *Figura N°71*.

Tabla 44. Porcentaje de inhibición de DPPH de los extractos de semilla de "Granada" y vitamina E.

Muestra	% Inhibición DPPH			Promedio	S.D.	C.V. %
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
Extracto Etanol	31.78	30.78	32.45	31.67	0.8404	2.65
Extracto Acetato Etilo	29.22	27.50	29.65	28.79	1.1377	3.95
Extracto Hexano	17.86	17.19	18.60	17.88	0.7053	3.94
Vitamina E	29.60	28.28	30.32	29.40	1.0346	3.52

S.D.: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual.

El porcentaje de inhibición de DPPH y la concentración de los extractos de “Granada” fueron de 31.67% para 7.48 mM TE en el extracto etanólico, 28.79% para 6.80 mM TE en el extracto de acetato de etilo y de 17.88% para 4.23 mM TE en el extracto de hexano. Se expresó en moles (M) TE/100 g de semillas la cantidad de equivalentes Trolox que presenta el espécimen de estudio, dando como resultado 1.17 M TE/100 g en el extracto etanólico, 2.09 M TE/100 g en el extracto de acetato de etilo y 1.35 M TE/100 g en el extracto de hexano. Por otro lado, la vitamina E presenta un porcentaje de inhibición de DPPH y concentración del 29.40% y 6.95 mM TE respectivamente.

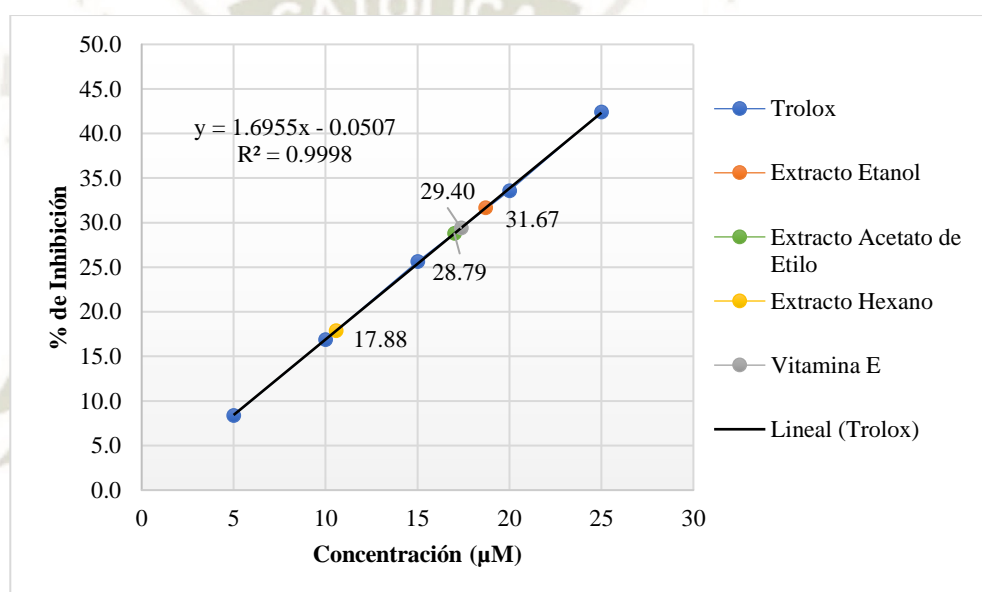


Figura N° 71. Porcentaje de inhibición de DPPH de las muestras en la curva.

5.5. Comparación de la Capacidad Antioxidante de las muestras

La comparación de la capacidad antioxidante tiene como finalidad evaluar si existen similitudes o diferencias significativas entre las muestras analizadas, para ello se realizó el análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey para una comparación más específica entre los grupos.

Con los datos mostrados en la *Tabla 44* se realizaron los test de ANOVA y Tukey obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 45. ANOVA para comparación de capacidad antioxidante de las muestras.

Origen de las variaciones	S.C.	G.L.	Promedio de cuadrados	F	V.C. de F
Entre grupos	341.6104	3	113.8701	127.642	4.0662
Dentro de los grupos	7.1369	8	0.8921		
Total	348.7473	11			

S.C.: Suma de cuadrados. G.L.: Grados de libertad. V.C.: Valor crítico

Tabla 46. Test de Tukey para comparación de capacidad antioxidante de las muestras.

Muestra	Promedio	Agrupación		
Etanol	31.67	A		
Acetato de Etilo	28.79		B	
Hexano	17.88			C
Vitamina E	29.40	A	B	

Los resultados del test de ANOVA evidencian que existe diferencia significativa a un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$) entre las muestras y al menos una de estas difiere de las demás.

El test de Tukey indica que hay diferencia significativa del extracto de hexano respecto a las demás muestras. La comparación de los extractos de “etanol – vitamina E” y “acetato de etilo – vitamina E” no poseen diferencia; sin embargo, al comparar los extractos de “etanol – acetato de etilo”, estos difieren significativamente (Anexo N° 26).

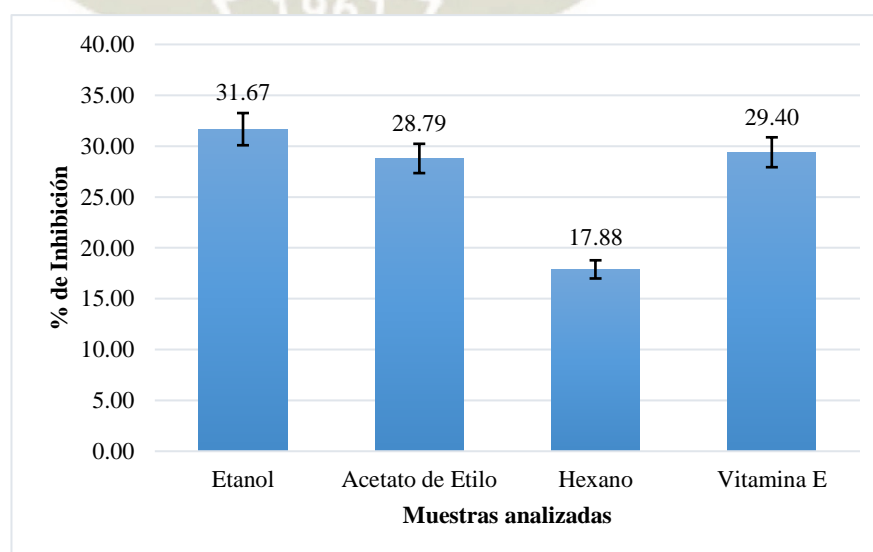


Figura N° 72. Comparación de porcentaje de inhibición de las muestras.

Como se indica en la *Figura N° 72*, las muestras que poseen mayor capacidad antioxidante son extracto de etanol y la vitamina E con valores de 31.67% y 29.40% respectivamente, seguidos del extracto de acetato de etilo con 28.79% y finalmente el extracto de hexano con 17.88% es el que presenta menor capacidad antioxidante comparado con los demás extractos.

Los radicales libres tienen un rol importante sobre las moléculas señalizadoras que cumplen funciones biológicas. Sin embargo, la producción excesiva de estos conlleva al origen y progresión de varias condiciones patológicas. Las especies reactivas de oxígeno como H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ y especies reactivas del nitrógeno como NO^{\cdot} , intervienen en el proceso de transducción de señales en las células beta del páncreas y regulan la secreción de insulina estimulada por la glucosa, pero una excesiva síntesis de estos radicales libres promueve disfunción mitocondrial y metabólica teniendo como principal consecuencia la disfunción de las células pancreáticas; reflejándose en la reducción de la secreción de insulina, su señalización en tejidos diana provocando intolerancia a la glucosa que puede conducir finalmente al estado de *Diabetes Mellitus*^(1,45,49).

Tanto en el desarrollo de *Diabetes Mellitus* Tipo 1 y *Diabetes Mellitus* Tipo 2 se producen citoquinas proinflamatorias y radicales libres por regulación positiva y/o negativa de las vías de señalización celulares, resultando una alteración del equilibrio oxidante/antioxidante dando lugar a condiciones pro-oxidativas que desencadenan la muerte celular de las células beta pancreáticas, mecanismo que ocurre de forma cíclica^(58,59,60).

Las sustancias antioxidantes juegan un rol importante en el equilibrio oxidativo endógeno previniendo y retardando la oxidación de varios componentes celulares.

El estudio realizado de los extractos de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” al ser comparados con Vitamina E como control, presentan una elevada capacidad antioxidante y como consecuencia un buen efecto hipoglicemiante, siendo ambos de carácter lipófilo. Estas evidencias proporcionan datos sobre la actividad antioxidante/hipoglicemiante de los componentes de *Punica granatum L.* “Granada” y los posibles mecanismos por los que actúan. La identificación de flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides y terpenos, así como la presencia de ácidos grasos insaturados tales como ácido oleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido cis-linoleico, ácido tricosanoico y ácido docosahexenoico; por

bibliografía se sabe que son compuestos que actúan sobre las vías de señalización celular como NF- κ B y TNF α inflamatorias y PPAR $_{\gamma/\beta/\delta}$ metabólica bajo la regulación negativa y positiva respectivamente, también incrementan el sistema antioxidante enzimático endógeno por una posible activación de Nrf2; disminuyendo la formación de citoquinas proinflamatorias, radicales libres y sus marcadores como MDA, F2-isoprostanos, 8-OH-dG. Como resultado brinda efecto protector sobre las células pancreáticas frente a la Diabetes al mejorar su proliferación y viabilidad, e inhibición de la apoptosis. Por otro lado, estos compuestos inhiben las enzimas α -glucosidasas disminuyendo la absorción de glucosa en el intestino, mejoran la acción y sensibilidad a la insulina a nivel sistémico, estimulan la activación y translocación de la enzima GLUT4 dando lugar al aumento de la captación de glucosa en tejidos periféricos para su posterior metabolismo. Estos mecanismos antiinflamatorios, antioxidantes, metabólicos que resultan en una evidente disminución de la glucosa sérica; evitan el fenómeno de glucotoxicidad relacionado con las complicaciones asociadas a Diabetes^(16,64,68,71,99,97,98).



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

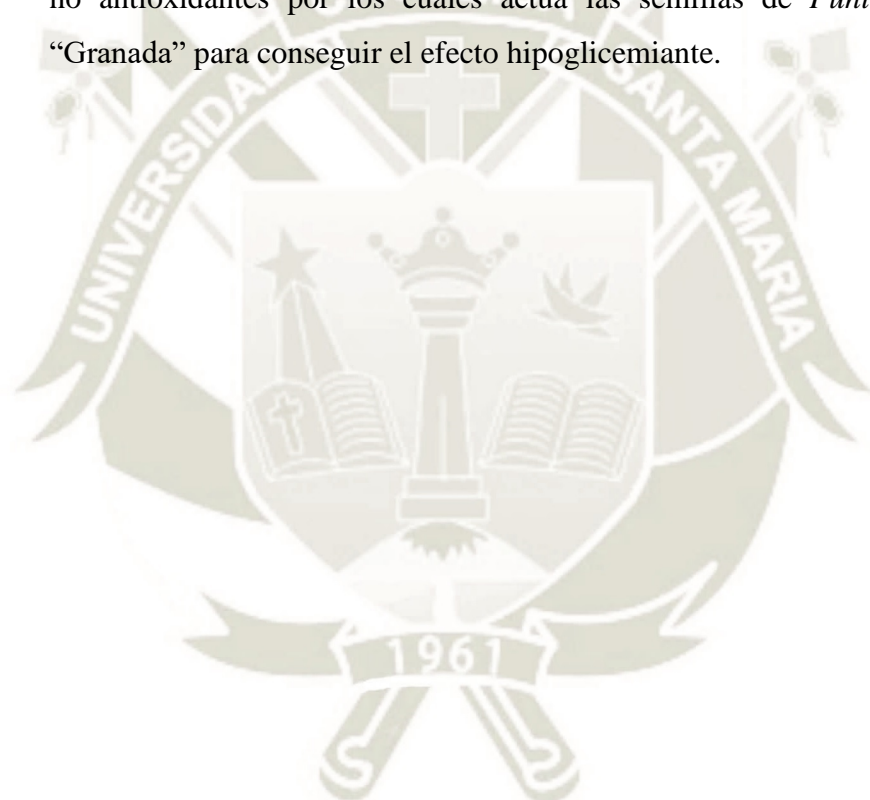
1. Conclusiones

- 1.1. Los extractos de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” obtenidos con solventes de diferente polaridad; presentaron rendimientos de 10.6% del extracto etanólico, 20.9% del extracto de acetato de etilo y 21.6% del extracto de hexano.
- 1.2. El análisis fitoquímico de los extractos obtenidos de las semillas de *Punica granatum L.* “Granada” demostró la presencia de flavonoides, alcaloides, esteroides y terpenos en los extractos de etanol, acetato de etilo y hexano; y la presencia de taninos en los extractos etanólico y de acetato de etilo.
- 1.3. El análisis por cromatografía de gases de los ácidos grasos presentes en el extracto hexánico de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” mostró como resultado la presencia de ácido oleico (65.51%), ácido linolénico (3.64%), ácido araquidónico (2.51%), ácido cis-linoleico 7.15%, ácido tricosanoico 15.18% y ácido cis-4,7,10,13,16-docosahexenoico (6.01%).
- 1.4. La actividad hipoglicémica de los tres extractos de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” en Diabetes resultó ser efectiva. El extracto etanólico presentó mayor eficacia en la disminución de hiperglicemia en animales de experimentación durante el periodo de estudio a pesar de no llegar a niveles normales de glucosa basal.
- 1.5. El extracto etanólico de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” a dosis de 20 mg/Kg y 40 mg/Kg disminuye el nivel de glicemia en porcentajes de 58.88% y 72.43% respectivamente.
- 1.6. Las semillas de *Punica granatum L.* “Granada” ayudan a disminuir los niveles de glucosa séricos durante el proceso de Diabetes mas no cura la enfermedad. Por otro lado, estas semillas poseen efecto preventivo al demostrar que los niveles de hiperglicemia alcanzados luego de la inducción con STZ fueron 21.15% menores comparados con los otros grupos y ayudó a disminuir los niveles de glucosa durante el proceso de la enfermedad.
- 1.7. Los extractos de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” poseen actividad antioxidante, los resultados demostraron que el extracto etanólico tiene un valor

de 31.67%, el extracto de acetato de etilo 28.79% y el extracto de hexano 17.88% de capacidad antioxidante.

2. Recomendaciones

- 2.1. Realizar estudios que se dirijan a evaluar la dosis tóxica del extracto etanólico de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” en animales de experimentación.
- 2.2. Desarrollar una fórmula farmacéutica del extracto de semillas de *Punica granatum L.* “Granada” para el tratamiento de Diabetes Mellitus.
- 2.3. Identificar y determinar de modo experimental los mecanismos antioxidantes y no antioxidantes por los cuales actúa las semillas de *Punica granatum L.* “Granada” para conseguir el efecto hipoglicemiante.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Internacional de Melatonina. IIMEL. [Online].; 2019 [cited 2019 Diciembre 4. Available from: <https://iimel.es/11-que-es-la-melatonina/54-que-es-el-estres-oxidativo>.
2. Aboonabi A, Rahmat A, Othman F. Antioxidant effect of pomegranate against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats. *Toxicology Reports*. 2014 Octubre;; p. 915 - 922.
3. Benitez Velasquez BB, Portocarrero Correa S, Sánchez Espinoza RB. Programas de enfermedades no transmisibles. In Costa Aponte FM. PERÚ Enfermedades No Transmisibles y Transmisibles. Lima; 2017. p. 26, 27.
4. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Enero; 38(1): p. S8 - S16.
5. Revilla Tafur LV. Situación de la Vigilancia Epidemiológica de Diabetes al I Trimestre de 2019. In *Salud Md. Boletín Epidemiológico del Perú.*; 2019. p. 345 - 347.
6. Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A Review Study on *Punica granatum L.* *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2016; 21(3): p. 221-7.
7. Real Jardín Botánico. XCVI. Punicaceae. In Castroviejo S, Aedo C, Benedí C, Laínz M, Muñoz Garmendia F, Nieto Feliner G, et al., editors. *Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Iberica e Islas Baleares*. Madrid: Departamento de Publicaciones del CSIC; 2007. p. 83 - 85.
8. Plants Database. United States Department of Agriculture USDA. [Online].; 2019 [cited 2019 Julio 23. Available from: <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=PUGR2>.
9. California Rare fruit Growers. The Fruit Gardener. [Online].; <http://www.crfg.org/pubs/ff/pomegranate.html> [cited 2019 Agosto 4. Available from: <http://www.crfg.org/pubs/ff/pomegranate.html>.

10. Wang D, Özen C, Abu-Reidah IM, Chigurupati S, Kumar Patra J, Horbanczuk JO, et al. Vasculoprotective Effects of Pomegranate (*Punica Granatum L.*). *Frontiers in Pharmacology*. 2018 Aug; 9(544): p. 1 - 15.
11. Bassiri-Jahromi S. *Punica granatum* (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. *Oncology Reviews*. 2018 Aug; 12(345): p. 1 - 7.
12. Sai Prakash CV, Prakash I. Bioactive Chemical Constituents from Pomegranate (*Punica granatum*) Juice, Seed and Peel - A Review. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*. 2011; 1(1): p. 1 - 18.
13. Piero MN, Nzaro GM, Njagi JM. Diabetes mellitus - a devastating metabolic disorder. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2014 Diciembre; 4(40): p. 1 - 7.
14. American Diabetes Association. 2. Clasificación and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes - 2019. *Diabetes Care*. 2019 Enero; 42(1): p. S13 - S28.
15. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2013 Enero; 36(1): p. S67 - S74.
16. Wiebe JC, Wägner AM, Novoa Mogollón FJ. Genetics of Diabetes Mellitus. *Nefrogenetic*. 2011 Mayo; 2(1): p. 111- 119.
17. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes - 2007. *Diabetes Care*. 2007 Enero; 30: p. S4 - S41.
18. Solis-Herrera C, Triplitt C, Reasner C, DeFronzo RA, Cersosimo E. Classification of Diabetes Mellitus. *Endotext South Dartmouth (MA)*. 2000.
19. McCulloch DK, Robertson PR. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. 2014; 36: p. 197 - 209.
20. Ministerio de Salud – Dirección General de Intervenciones Estratégicas en Salud Pública. Guía de Práctica Clínica para el Tratamiento y Control de la Diabetes Mellitus Tipo 2 en el Primer Nivel de Atención. 2016th ed. Oncológicas DdPdENTy, editor. Lima: MINSA; 2015.

21. NIDDK. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. [Online].; 2019 [cited 2019 julio 29. Available from: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/diabetes/informacion-general/factores-riesgo-tipo-2>.
22. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003; 26: p. 3160 - 3167.
23. Josephine M, Forbes , Cooper ME. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews*. 2013; 93: p. 137 - 188.
24. Brutsaert EF. MSD Manual - Professional Version. [Online].; 2019 [cited 2019 Julio 31. Available from: <https://www.msdmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/diabetes-mellitus-and-disorders-of-carbohydrate-metabolism/complications-of-diabetes-mellitus>.
25. Tébar M, Francisco J, Escobar J. "La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica" Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2009.
26. Gilman Ga. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10th ed. México: Editorial Interamericana Mc. Graw Hill.; 2002.
27. Prado Ayala , Calvo C, Herrada M, López Fiallo M, Tezanos R. Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus. *Farmacología*. 2002 Noviembre; 21(10): p. 120 - 124.
28. Mateos Santa Cruz N, Zacarías Castillo R. Tratamiento farmacológico pra la diabetes mellitus. *Revista Hospital General Dr. Gea González*. 2002; 5(1 y 2): p. 33 - 41.
29. Silver , Bahendeka & Ramaiya , Kaushik & Swai , Andrew & Otieno , Frederick & Bajaj , Sarita & Kalra , et al. EADSG Guidelines: Insulin Therapy in Diabetes. *Diabetes Therapy*. 2018 Marzo; 9.
30. Rodriguez Lay G. Insulinoterapia. *Revista Médica Heredia*. 2003; 14(3): p. 140 - 144.

31. Ferrannini E, DeFronzo A. Impact of glucose-lowering drugs on cardiovascular disease in type 2 diabetes. *European Heart Journal*. 2015 Junio; 36(34): p. 2288-96.
32. Abreu Gracia GR, Sanchez Arias C, Ania Palacios JM, Silva Garcia MdC, Gonzalez Rabanal JM, Vilches Arenas Á, et al. *Técnicos Especialistas de Radiodiagnóstico*. Segunda Edición ed. Sevilla: Editorial MAD; 2006.
33. Inzunza Hernández Ó, Koenig Samohod C, Salgado Alarcón G. Glándulas anexas del aparato digestivo. In *Morfología Humana*. Santiago: Ediciones UC; 2015. p. 6 - 64.
34. Gómez Dumm C. *Histología del Páncreas Exocrino*. Artículo Científico. La Plata: SEDICI.
35. Megías Pacheco M, Molist García P, Pombal Diego MÁ. *Atlas de Histología Vegetal y Animal*. [Online].; 2019 [cited 2019 diciembre 5. Available from: <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-pancreas.php>.
36. Vara Ameigeiras E. Páncreas endocrino. In Fernández-Tresguerres JA. *Fisiología Humana*. 4th ed.: McGraw-Hill; 2010.
37. Tiscornia OM, Yacomotti J, Losardo RJ. Investigation and conceptual revision of the gastro-duodeno-pancreatic innervation in rats. *Revista Chilena de Anatomía*. 2002; 2(1): p. 37 - 48.
38. Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischer E, Goodman HM. Sequence of the human insulin gen. *Nature*. 1980 marzo;(284): p. 26 - 32.
39. Mendivil Anaya CO, Sierra Ariza ID. Acción insulínica y resistencia a la insulina: aspectos moleculares. *Revista de la Facultad de Medicina - Universidad Nacional de Colombia*. 2005 noviembre; 53(4): p. 235 - 243.
40. Solloway M, Madjidi A, Gu C. Glucagon couples hepatic aminoacid catabolism to mTOR-dependent regulation of alfa-cells mass. *Cell Replication*. 2015; 12(3): p. 495 - 510.

41. Wewer Albrechtsen NJ, Kuhre RE, Pedersen J, Knop FK, Holst JJ. The biology of glucagon and the consequences of hyperglucagonemia. *Biomarkers in Medicine*. 2016 Marzo; 10(11): p. 1141 - 1151.
42. Iwanaga T, Miki T, Takahashi-Iwanaga H. Restricted expression of somatostatin receptor 3 to primary cilia in the pancreatic islets and adenohypophysis of mice. *Biomed Res*. 2011;(32): p. 73 - 81.
43. Montero Cruz SA, Lemus Vidal M, Figueroa Andrade JF, Ceja Pelayo CE, Morales Hernández P, Pacheco Elizalde JA, et al. Somatostatin into the Commissural Nucleus Tractus Solitarius Modulates Brain Glucose Retention Post- Anoxic Stimulation of the Carotid Chemoreceptor in Rats. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2013 Marzo; 32(1): p. 74 - 82.
44. Rains JL, Jain SK. "Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes". *Free Radical Biology & Medicine*. 2011 Marzo; 50(5): p. 567 - 575.
45. Galina Hidalgo MA, Ortiz Rubio M, Guerrero Cruz M. Estrés oxidativo y antioxidantes. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 2018; 22(1): p. 47 - 61.
46. Venereo Gutiérrez JR. Daño oxidativo, radicales libres y atioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 2002; 31(2): p. 126 - 133.
47. Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Critical Reviews in Toxicology*. 2015 Setiembre; 45(9): p. 765 - 798.
48. Ramos M, Batista C, Gomez B, Zamora A. Diabetes. Estrés oxidativo y antioxidantes. In *Investigación en Salud*.; 2006. p. 7-15.
49. Newsholme P, Fernandes Cruzat V, Noel Keane K, Cartessi R, Homem de Bittencourt Jr PI. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochemical Journal*. 2016; 473: p. 4527 - 4550.
50. Halliwell B. Free radical and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*. 2012; 70(3): p. 257 - 265.

51. Paredes Salido F, Roca Fernández J. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offarm.* 2002 Julio; 21(7): p. 96 - 100.
52. Díaz-Hung ML, Gonzáles Fraguera E, Blanco Lezcano L. Glutathione antioxidant system in the etiopathology of nigrostriatal dysfunction. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 2015; 34(2): p. 168 - 186.
53. Balsano C, Alisi A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Current Pharmaceutical Design.* 2009; 15(26): p. 3063 - 3073.
54. Instituto Linus Pauling. Oregon State University - Centro de información de micronutrientes. [Online].; 2015 [cited 2019 octubre 14. Available from: <https://lpi.oregonstate.edu/es/mic/vitaminas/vitamina-E>.
55. Office of Dietary Supplements. National Institutes of Health. [Online].; 2016 [cited 2019 noviembre 26. Available from: <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/VitaminE-DatosEnEspanol.pdf>.
56. Komen. Susan G. Komen - Vitamina E. [Online].; 2014 [cited 2019 Noviembre 28. Available from: <https://ww5.komen.org/Espanol/VitaminaE.html>.
57. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. "Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies". *Biochim Biophys Acta.* 2014 Setiembre; 1840(9): p. 2709 - 2729.
58. Vessby J, Basu S, Mohsen R, Berne C, Vessby B. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine.* 2002; 251: p. 69 - 76.
59. Rojas J, Bermudez V, Palmar J, Martínez MS, Olivares LC, Nava M, et al. Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. *Journal Diabetes Research.* 2018 Febrero; 2018.
60. Rehman K, Hamid Akash MS. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked? *Oxidative Stress and Diabetes Mellitus.* 2017 Abril.
61. Poitout V, Robertson RP. Glucolipototoxicity: fuel excess and beta cell dysfunction. *Endocrine Reviews.* 2008; 29(3): p. 351 - 366.

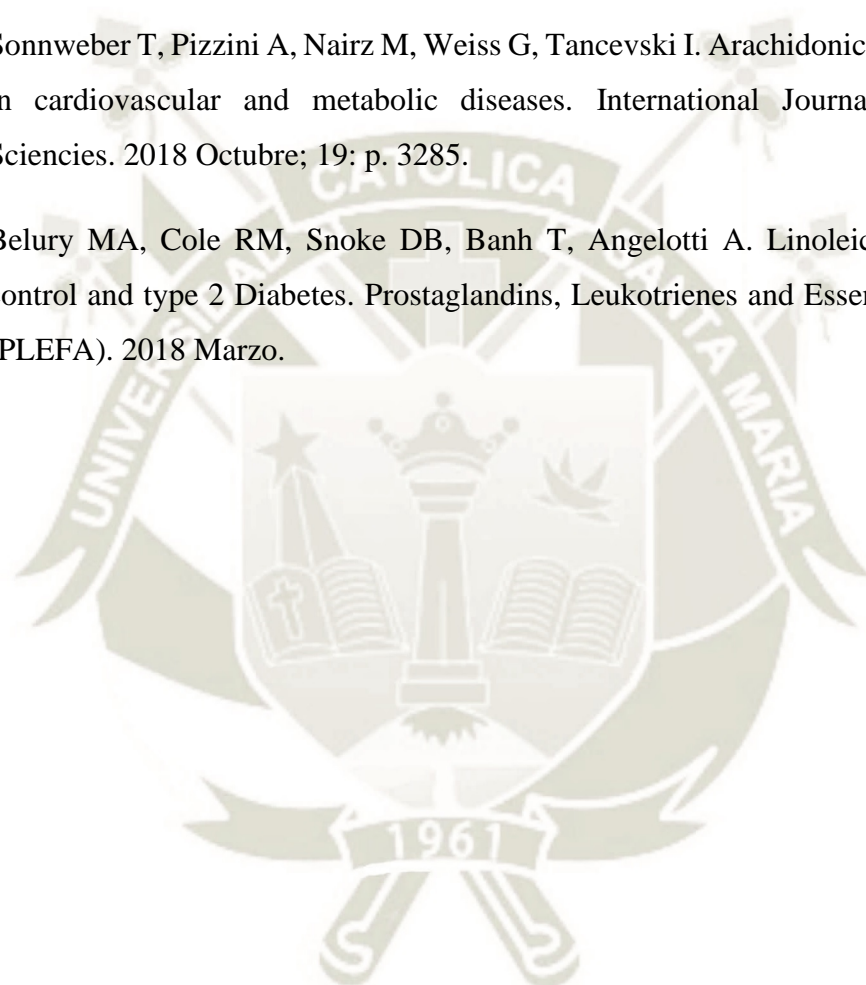
62. Milman U, Et al.. Vitamin E supplementation reduces cardiovascular events in a subgroup of middle-aged individuals with both type 2 diabetes mellitus and the haptoglobin 2-2 genotype: a prospective, double-blinded clinical trial. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2008; 28: p. 341 - 347.
63. Manning PJ, Sutherland WH, Walker RJ, Williams SM, De Jong SA, Ryalls AR, et al. Effect of high-dose vitamin E on insulin resistance and associated parameters in overweight subjects. *Diabetes Care*. 2004; 27: p. 2166 - 2171.
64. Pazdro R, Burgess JR. The rol of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Machanisms of Ageing and Development*. 2010 Marzo; 131: p. 276 - 286.
65. Kuhad A, Bishnoi M, Tiwari V, Chopra K. Supression of NF-kappabeta signaling pathway by tocotrienol can prevent diabetes associated cognitive deficits. *Pharmacology Biochem*. 2009; 92: p. 251 - 259.
66. Wu J, Ward N, Indrawan A, Almeida CA, Hodgson J, Proudfoot J, et al. Effects of alfa tocoferol and mixed tocopherol supplementation on markers of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes. *Clinical Chemistry Nutrition*. 2007; 53(3): p. 511 - 519.
67. Pan H, Zhang L, Guo MY, Sui H, Li H, Wu WH, et al. The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Acta Diabetology*. 2009.
68. Burk RF, Hill KE, Nakayama A, Mostert V, Levander XA, Motley AK, et al. Selenium deficiency activates mouse liver Nrf2-ARE but vitamin E deficiency does not. *Free Radical, Biology and Medicine*. 2008; 44: p. 1617 - 1623.
69. Abebe T, Mahadevan J, Bogachus L, Hahn S, Black M, Oseid E, et al. Nrf2/antioxidant pathway mediates beta cell self-repair after damage by high-fat diet-induced oxidative stress. *JCL Insight*. 2017; 2(24).
70. Yagishita Y, Fukutomi , Sugawara , Kawamura , Takahashi T, Pi J, et al. Nrf2 protects pancreatic beta cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice. *Diabetes*. 2013 Noviembre.

71. Sireesh D, Dhamodharan U, Ezhilarasi K, Vijay V, Ramkumar KM. Association of NF-E2 related factor 2 (Nrf2) and inflammatory cytokines in recent onset type 2 diabetes mellitus. *Scientific Reports*. 2018 Marzo; 8.
72. Rerup CC. Drugs Producing diabetes through damage of the insuline secreting cells. *Pharmacology*. 1970; 22(4): p. 485 - 518.
73. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols in Pharmacology*. 2015 Setiembre; 5(47).
74. Bequer L, Gómez T, Molina JL, Artiles D, Bermúdez R, Clapés S. Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de induccion neonatal de la diabetes. *Biomédica*. 2016; 36: p. 230 - 238.
75. PubChem. [Online].; 2018 [cited 2019 Agosto 2. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Streptozotocin>.
76. Merk. Streptozotocin - CAS 18883-66-4 - Cambiochem SDS. 2014..
77. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiology Research*. 2001 Marzo; 50: p. 536 - 546.
78. Mora H, Aragón N, Diana M, Ángela C. Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por Estreptozotocina. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. 2009.
79. Nuñez C. "Extracción con Equipo Soxhlet". *Bioquímica y Biología Molecular*. 2008; 2(3): p. 5.
80. Cela R, Lorenzo RA, Casais MdC. "Técnicas de Separación en Química Analítica" Madrid: Ed. Síntesis.
81. Castillo Olivera G, Zavala Cuevas D, Carrillo Inungaray L. "Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas". [Online]. [cited 2019 Agosto 5. Available from: <http://www.eumed.net/rev/tlatemoani/24/analisis-fitoquimico.html>.

82. Strobel S, Santiago M. "Thin Layer Chromatography". *Methods in Enzymology*. 2013; 533 (24): p. 303 - 324.
83. Unam. *Técnicas Cromatográficas. Química: Análisis Instrumental*. 2007;; p. 1 -123.
84. Gutiérrez Parvina JE, Montaña Fuentes K, Bracho Pérez JC, Rodríguez Best C, Chang Canales A. Caracterización de esteroides en la fracción lipídica de la maca *Lepidium meyenii* Walp. mediante técnicas cromatográficas. *Rev Soc Química Perú*. 2009; 75(2): p. 254 - 265.
85. Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Segunda ed. Berlin: Springer; 1995.
86. Gutiérrez MC, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter (UPC)*. 2002;(122): p. 35 - 41.
87. Emerson Automation Solutions. *Fundamentals of Gas Chromatography*. Informe. Houston: Emerson. Rosemount Gas Analysis, Texas; 2019.
88. El espectrofotómetro. Espectrómetro de masas. [Online].; 2017 [cited 2019 diciembre 7]. Available from: <https://elespectrofotometro.com/espectrometro-de-masas/>.
89. Universidad de Burgos. *Cromatografía de Gases/Líquidos acoplado a espectrometría de masas de Alta Resolución*. [Online].; 2019 [cited 2019 diciembre 2]. Available from: <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/espectrometria/cromatografia-de-gasesliquidos-acoplado-espectrometria-de-masas-de-alta-resolucion-ms-ar>.
90. Vélchez Cáceda H, Flores López O. Efecto de la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos en ratas albinas alimentadas a dosis repetidas (28 días) con miel de abeja en etanol. *Horizonte Médico (Lima)*. 2018 Diciembre; 18(4): p. 61 - 69.
91. Crossley J, Díaz C, Concha M. Test rápido de determinación de glicemia (tiras reactivas): Validación por métodos de laboratorio. *Hospitales Veterinarios*. 2009; 1(1): p. 10 - 14.

92. Fernandez Pachón , Villaño D, García Parrilla M. "Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo". Revista ALAN, Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2006; 56(2).
93. Sagar B, Kedare R, Singh P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal Food Scientists & Technologists. 2011 Agosto; 48(4): p. 412 - 422.
94. Minitab. Soporte Minitab 19 - ¿Qué es ANOVA? [Online].; 2019 [cited 2019 diciembre 10. Available from: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/19/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/basics/what-is-anova/>.
95. García Villalpando JA, Castillo Morales A, Ramírez Guzmán ME, Rendón Sánchez G, Larqué Saavedra MU. Comparación de los procedimientos de Tukey, Duncan, Dunnett, HSU y Bechhofer para la selección de medias. Agrociencia. 2001 Junio; 35: p. 79 - 86.
96. Moghaddasi Mohammad S, Haddah Kashani H. Chemical composition of the plant *Punica granatum* L. (Pomegranate) and its effect on heart and cancer. Journal of Medicinal Plants Research. 2012 Octubre; 4(40): p. 5306 - 5310.
97. Ward MG, Ge L, Barbosa-Lorenzi C, Hao M. Stigmasterol prevents glucolipototoxicity induced defects in glucose-stimulated insulin secretion. Scientific Reports. 2017 Agosto; 7(1): p. 9536.
98. Nazaruk J, Borzym-Kluczyk M. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. Phytochemistry reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. 2015; 14(4): p. 675 - 690.
99. Acosta-Montaña P, García-González V. Effects of dietary fatty acids in pancreatic beta cell metabolism, implications in homeostasis. Nutrients. 2018 Marzo; 10(393).
100. Goncalves Leao Coelho O, Pereira da Silva B, Usuda Prado Rocha DM, Lelis Lopes L, Goncalves Alfenas RdC. Polyunsaturated fatty acids and type 2 diabetes: impact on the glycemic control mechanism. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2017 Febrero; 1(32).

101. Al-Ishaq RK, Abotaleb M, Kubatka P, Kajo K, Büsse Iberg D. Flavonoids and their anti-diabetic effects: Cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels. *Biomolecules*. 2019 Setiembre; 9(9): p. 430.
102. Bai L, Li X, He L, Zheng Y, Lu H, Li J, et al. Antidiabetic potential of flavonoids from traditional chinese medicine: A review. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2019 Junio; 47(5): p. 933 - 957.
103. Sonnweber T, Pizzini A, Nairz M, Weiss G, Tancevski I. Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 Octubre; 19: p. 3285.
104. Belury MA, Cole RM, Snoke DB, Banh T, Angelotti A. Linoleic acid, glycemic control and type 2 Diabetes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 2018 Marzo.



ANEXOS

ANEXO N° 1 IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL ESPECÍMEN VEGETAL



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N° 78 -2019-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.


HACE CONSTAR:

Que la muestra fresca del espécimen presentada por **Kathleen Fabiola Hinojosa Vera**, alumna de la Universidad Católica de Santa María, para la realización de su tesis "ESTUDIO DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE Y ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE SEMILLAS DE *Punica granatum* L. EN DIABETES INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE EN RATAS. AREQUIPA - 2019". La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Myrtales
Familia: Lythraceae
Género: *Punica*
Especie: *Punica granatum* L. var. *Wonderful*

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 16 de octubre del 2019.


Blgo. Leoncio Marín Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 993659045
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA - PERÚ

ANEXO N° 2 CÁLCULOS PARA LA DOSIFICACIÓN DE ESTREPTOZOTOCINA Y TRATAMIENTOS

Dosificación de Estreptozotocina (45 mg/Kg)

20 mg – 1000 g	4 mg – 1 ml
x – 305 g	8.88 mg - x
x= 6.1 mg	x= 1.5 ml

Dosificación de los Tratamientos

- Vitamina E

400 UI – 70 Kg	1.143 UI – 1 ml
x – 0.305 Kg	1.743 UI - x
x= 1.743 UI	x= 1.5 ml

- Extracto 20 mg/Kg

20 mg – 1000 g	4 mg – 1 ml
x – 305 g	8.88 mg - x
x= 6.1 mg	x= 1.5 ml

- Extracto 40 mg/Kg

40 mg – 1000 g	8 mg – 1 ml
x – 305 g	12.2 mg - x
x= 12.2 mg	x= 1.5 ml

ANEXO N° 3 RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *Punica granatum L.* “Granada”

Extracciones	Peso de los Extractos (g)		
	Etanólico	Acetato de etilo	Hexano
1	1.0621	2.1302	2.0785
2	1.0605	2.0729	2.1764
3	1.0892	2.3481	2.1681
4	1.0823	2.0413	2.0862
5	1.0529	2.0745	2.1767
6	1.0572	2.0374	2.2416
7	1.0634	2.0257	2.1374
8	1.0467	2.0238	2.1801
9	1.0591	2.1831	2.1693
10	1.0923	2.0382	2.1485
Promedio	1.0666	2.0975	2.1563



ANEXO N° 4 INFORME DE ENSAYO: PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE *Punica granatum L.* “Granada”



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO N° ANA03A20.004460

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

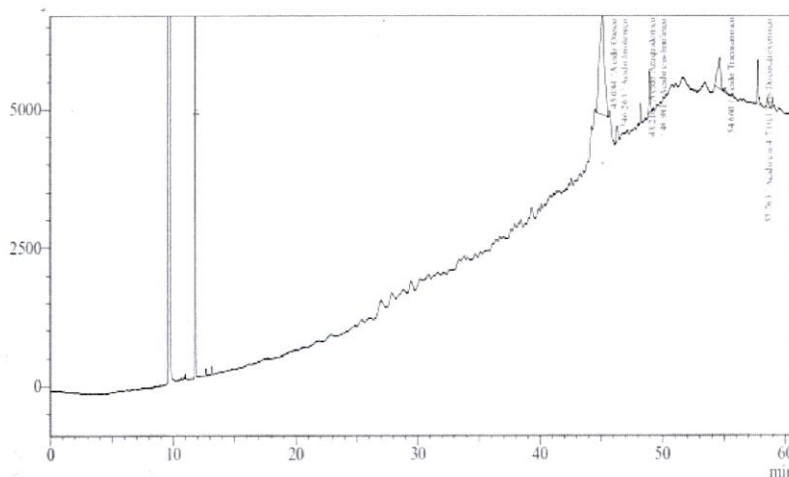
Nombre del cliente : Kathleen Fabiola Hinojosa Vera
Dirección del cliente : Av. Colonial 803- Ampliación Paucarpata
RUC : No corresponde
Identificación del contacto : Kathleen Fabiola Hinojosa Vera
Descripción de la muestra : Aceite de semilla de granada

INFORMACIÓN DEL ENSAYO

Condición del muestreo : Por el cliente
Tamaño de muestra : 1 mL
Fecha de recepción : 03/01/2020
Fecha de ejecución de ensayo : 03/01/2020 al 10/01/2020
Fecha de emisión de informe : 10/01/2020
Página : 1 de 2

I. ANÁLISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	UNIDADES	RESULTADO
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS Cromatografía Gaseosa con Detección de Masas, Método de Cuantificación, por Normalización Interna (Área)		
Ácido Oleico	%	65.510
Ácido linolenico	%	3.645
Ácido Araquidónico	%	2.507
Ácido cis-linoleico	%	7.146
Ácido Tricosanoico	%	15.182
Ácido cis 4,7,10,13,16-Docosahexanoico	%	6.010





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERÚ



INFORME DE ENSAYO N° ANA03A20.004460

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

Nombre del cliente : Kathleen Fabiola Hinojosa Vera
Dirección del cliente : Av. Colonial 803- Ampliación Paucarpatá
RUC : No corresponde
Identificación del contacto : Kathleen Fabiola Hinojosa Vera
Descripción de la muestra : Aceite de semilla de granada

INFORMACIÓN DEL ENSAYO

Condición del muestreo : Por el cliente
Tamaño de muestra : 1 mL
Fecha de recepción : 03/01/2020
Fecha de ejecución de ensayo : 03/01/2020 al 10/01/2020
Fecha de emisión de informe : 10/01/2020
Página : 2 de 2

OBSERVACIONES:

- La información proporcionada por el cliente es de responsabilidad exclusiva del mismo.
- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento previo y transporte de la muestra hasta el ingreso al LECC son responsabilidad del solicitante y los resultados emitidos en el presente informe se refieren a la muestra tal como se recibió.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad


Dr. Jaime Cárdenas García
C.Q.F. 01575 - C.Q.F.D.A. 00562
Director Técnico
Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



ANEXO N° 5 PRUEBA PILOTO: NIVEL DE GLUCOSA SANGUÍNEA (mg/dL) EN RATAS TRATADAS CON LOS EXTRACTOS DE *Punica granatum L.* “Granada” A DOSIS DE 10 mg/kg Y 20 mg/kg Y DE SU GRUPO CONTROL (+)

Tabla de concentración de glucosa (mg/dL) del Grupo Control Positivo (+)

NIVEL DE GLUCOSA												
Grupo	N° de animal	Concentración de glucosa (mg/dL)										
		1	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Control +	1	498	506	479	483	468	475	452	461	473	469	456
	2	496	471	451	493	476	501	489	455	467	472	467

Tabla de concentración de glucosa (mg/dL) de los grupos tratados con los extractos de etanol, acetato de etilo y hexano a dosis de 10 mg/Kg

NIVEL DE GLUCOSA							
Grupo		Etanol (I)		Acetato Etilo (I)		Hexano (I)	
N° de animal		3	4	5	6	7	8
Concentración de glucosa (mg/dL)	Día 0	489	491	506	499	507	515
	Día 3	467	474	503	503	505	503
	Día 6	426	438	482	487	476	493
	Día 9	374	395	475	405	412	468
	Día 12	355	361	459	384	396	461
	Día 15	337	343	389	373	391	392
	Día 18	330	329	371	362	380	367
	Día 21	320	316	348	327	319	346
	Día 24	303	305	318	313	308	325
	Día 27	296	292	314	301	302	315
	Día 30	283	278	308	291	294	306

Tabla de concentración de glucosa (mg/dL) de los grupos tratados con los extractos de etanol, acetato de etilo y hexano a dosis de 20 mg/Kg

NIVEL DE GLUCOSA							
Grupo		Etanol (II)		Acetato Etilo (II)		Hexano (II)	
N° de animal		9	10	11	12	13	14
Concentración de glucosa (mg/dL)	Día 0	501	504	491	503	499	493
	Día 3	482	480	476	482	461	474
	Día 6	459	461	450	446	433	441
	Día 9	425	418	411	403	404	412
	Día 12	397	387	387	391	385	397
	Día 15	368	354	369	357	368	372
	Día 18	331	326	328	331	339	341
	Día 21	286	289	305	296	314	306
	Día 24	241	253	283	275	297	293
	Día 27	217	239	256	248	286	283
	Día 30	204	211	231	237	263	265



ANEXO N° 6 PRUEBA EXPERIMENTAL: PESO DE RATAS TRATADAS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

Tabla de pesos (g) de los grupos Controles Negativo (-) y Positivo (+)

PESO						
GRUPO	CONTROL -			CONTROL +		
N°	1	2	3	4	5	6
Basal	224	226	229	227	230	228
0	222	224	225	224	228	226
5	229	227	223	218	222	220
10	227	223	224	213	215	216
15	228	226	222	205	209	207
20	226	220	225	196	202	200
25	223	224	221	190	196	193
30	224	223	226	185	189	195
35	222	220	224	181	183	190
40	226	224	223	178	-	181
45	223	223	228	-	-	177

Tabla de pesos (g) del grupo tratado con Vitamina E

PESO			
GRUPO	VITAMINA E		
N°	7	8	9
Basal	226	228	229
0	223	226	225
5	216	218	222
10	210	213	215
15	198	207	207
20	203	199	200
25	190	193	195
30	187	189	188
35	184	185	182
40	183	179	180
45	181	-	179

Tabla de pesos (g) del grupo tratado con extracto etanólico de “Granada” 20 mg/Kg

PESO			
GRUPO	GRANADA 20 mg/kg		
N°	10	11	12
Basal	224	230	227
0	220	227	225

5	212	215	218
10	199	208	211
15	191	196	202
20	192	189	193
25	185	193	190
30	181	185	188
35	175	180	183
40	171	176	179
45	-	172	174

Tabla de pesos (g) del grupo tratado con extracto etanólico de “Granada” 40 mg/Kg

PESO			
GRUPO	GRANADA 40 mg/kg		
N°	13	14	15
Basal	225	228	229
0	221	225	226
5	214	220	219
10	210	214	212
15	206	203	204
20	208	197	200
25	199	198	195
30	196	195	191
35	191	190	187
40	187	184	188
45	185	181	183

Tabla de pesos (g) del grupo Preventivo

PESO			
GRUPO	PREVENTIVO		
N°	16	17	18
Basal	229	222	225
0	229	223	224
5	225	217	216
10	220	212	210
15	214	205	204
20	208	199	198
25	201	194	191
30	196	190	187
35	192	186	184
40	188	183	180
45	184	179	178

ANEXO N° 7 PRUEBA EXPERIMENTAL: NIVEL DE GLUCOSA SANGUÍNEA EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

Nivel de glucosa sanguínea en ratas normoglicémicas tratadas con aceite vegetal (GRUPO I – Control negativo)

GRUPO	CONTROL -			
N°	1	2	3	MEDIA
Basal	110	107	93	103.33
0	117	106	96	106.33
3	112	103	117	110.67
6	118	119	97	111.33
9	107	94	98	99.67
12	118	117	98	111.00
15	95	116	106	105.67
18	99	100	93	97.33
21	118	117	105	113.33
24	109	117	99	108.33
27	113	91	96	100.00
30	97	90	104	97.00
33	117	99	110	108.67
36	104	111	116	110.33
39	113	103	99	105.00
42	101	113	114	109.33
45	113	107	115	111.67

Nivel de glucosa sanguínea en ratas diabéticas tratadas con aceite vegetal (GRUPO II – Control positivo)

GRUPO	CONTROL +			
N°	1	2	3	MEDIA
Basal	94	103	98	98.33
0	481	492	477	483.33
3	493	493	496	494.00
6	504	469	471	481.33
9	477	472	486	478.33
12	485	493	490	489.33
15	468	476	477	473.67
18	470	506	460	478.67
21	458	489	472	473.00
24	465	455	485	468.33
27	472	467	479	472.67
30	477	476	465	472.67
33	458	485	483	475.33
36	482	479	484	481.67

39	469	-	480	474.50
42	-	-	476	476.00
45	-	-	478	478.00

Nivel de glucosa sanguínea en ratas diabéticas tratadas con la vitamina E (GRUPO III – Tratamiento control)

GRUPO	VITAMINA E				
	Nº	1	2	3	MEDIA
Basal	111	105	100		105.33
0	485	496	480		487.00
3	452	465	459		458.67
6	416	420	427		421.00
9	384	389	392		388.33
12	342	334	343		339.67
15	309	303	311		307.67
18	280	286	289		285.00
21	248	251	254		251.00
24	211	217	222		216.67
27	187	192	195		191.33
30	152	149	163		154.67
33	150	150	160		153.33
36	152	146	161		153.00
39	147	148	159		151.33
42	149	144	153		148.67
45	146	-	148		147.00

Nivel de glucosa sanguínea en ratas diabéticas tratadas con el extracto etanólico de *Punica granatum L.* “Granada” a dosis 20 mg/kg (GRUPO IV – Tratamiento 1)

GRUPO	GRANADA 20 mg/Kg				
	Nº	1	2	3	MEDIA
Basal	99	102	95		98.67
0	496	479	484		486.33
3	471	468	473		470.67
6	457	452	461		456.67
9	426	431	435		430.67
12	401	395	392		396.00
15	358	364	368		363.33
18	315	329	327		323.67
21	287	290	294		290.33
24	252	260	275		262.33
27	230	231	243		234.67
30	212	209	210		210.33
33	205	207	204		205.33

36	200	203	205	202.67
39	201	202	206	203.00
42	196	199	203	199.33
45	-	201	199	200.00

Nivel de glucosa sanguínea en ratas diabéticas tratadas con el extracto etanólico de *Punica granatum L.* “Granada” a dosis 40 mg/kg (GRUPO V – Tratamiento 2)

GRUPO	GRANADA 40 mg/Kg			
	N°	1	2	3
Basal	106	97	108	103.67
0	479	488	473	480.00
3	457	462	455	458.00
6	429	421	418	422.67
9	400	393	389	394.00
12	371	359	366	365.33
15	345	333	337	338.33
18	306	305	309	306.67
21	283	286	292	287.00
24	243	238	235	238.67
27	199	192	188	193.00
30	147	151	140	146.00
33	140	149	133	140.67
36	142	143	135	140.00
39	139	140	130	136.33
42	135	138	128	133.67
45	136	132	129	132.33

Nivel de glucosa sanguínea en ratas pre y post tratadas con el extracto etanólico de *Punica granatum L.* “Granada” a dosis 20 mg/kg (GRUPO VI - Preventivo)

GRUPO	PREVENTIVO			
	N°	1	2	3
Basal	106	97	112	111.67
0	382	394	376	384.00
3	369	376	358	367.67
6	352	348	339	346.33
9	330	327	314	323.67
12	307	305	298	303.33
15	290	288	277	285.00
18	271	273	262	268.67
21	248	252	245	248.33
24	223	229	223	225.00
27	196	206	198	200.00
30	174	181	175	176.67

33	163	172	169	168.00
36	165	169	165	166.33
39	160	167	165	164.00
42	159	168	167	164.67
45	157	165	164	162.00



ANEXO N° 8 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA BASAL ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	360.5	72.10	2.16
Error	12	400.0	33.33	
Total	17	760.5		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 9 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 0

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	344225	68844.9	907.84
Error	12	910	75.8	
Total	17	345135		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 10 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 3

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	315371	63074.2	1917.80
Error	12	395	32.9	
Total	17	315766		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 11 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 6

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	278062	55612.4	499.01
Error	12	1337	111.4	
Total	17	279399		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 12 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 9

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	269119	53823.8	1376.18
Error	12	469	39.1	
Total	17	269588		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 13 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 12

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	238967	47793.4	1159.41
Error	12	495	41.2	
Total	17	239462		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 14 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 15

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	218356	43671.3	993.78
Error	12	527	43.9	
Total	17	218884		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 15 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 18

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	223621	44724.1	374.43
Error	12	1433	119.4	
Total	17	225054		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 16 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 21

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	200934	40186.9	692.88
Error	12	696	58.0	
Total	17	201630		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 17 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 24

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	209080	41816.0	492.27
Error	12	1019	84.9	
Total	17	210099		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 18 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 27

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	238651	47730.2	964.25
Error	12	594	49.5	
Total	17	239245		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 19 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 30

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	270092	54018.4	1659.27
Error	12	391	32.6	
Total	17	270482		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 20 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 33

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	271385	54277.0	757.94
Error	12	859	71.6	
Total	17	272244		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 21 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 36

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	281519	56303.9	2591.99
Error	12	261	21.7	
Total	17	281780		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 22 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 39

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	199216	39843.2	1238.65
Error	12	354	32.2	
Total	17	199570		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 23 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 42

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	112637	22527.3	830.25
Error	12	271	27.1	
Total	17	112908		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 24 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES AL DÍA 45

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	112372	22474.3	1774.29
Error	12	101	12.7	
Total	17	112473		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 25 COMPARACIÓN DEL ÁREA BAJO LA CURVA ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

ANOVA

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	5	360.5	72.10	2.16
Error	12	400.0	33.33	
Total	17	760.5		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

ANEXO N° 26 COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE “Granada” Y LA VITAMINA E.

ANOVA

- **Análisis de Varianza de las muestras**

Fuente	GL	S.C.	M.C.	Valor F
Factor	3	341.610	113.870	127.64
Error	8	7.137	0.892	
Total	11	348.747		

GL: Grados de Libertad S.C.: Suma de cuadrados. M.C.: Media de cuadrados

- **Promedio, Desviación Estándar e Intervalos de confianza de las muestras**

Factor	N	Media	D.E.	IC de 95%
Etanol	3	31.670	0.840	(30.412; 32.928)
Acetato de Etilo	3	28.790	1.138	(27.532; 30.048)
Hexano	3	17.883	0.705	(16.626; 19.141)
Vitamina E	3	29.400	1.035	(28.142; 30.658)

D.E.: Desviación estándar. IC: Intervalos de confianza.

TEST DE TUKEY

- **Comparaciones en parejas:** Pruebas simultáneas para diferencias de las medias.

Grupos	Diferencia del promedio	IC de 95%	Valor p ajustado
Acetato de Etilo - Etanol	-2.880	(-5.350; -0.410)	0.0238
Hexano - Etanol	-13.787	(-16.257; -11.316)	4.7418×10^{-7}
Vitamina E - Etanol	-2.270	(-4.740; 0.200)	0.0720
Hexano - Acetato de Etilo	-10.907	(-13.377; -8.436)	2.8628×10^{-6}
Vitamina E - Acetato de Etilo	0.610	(-1.860; 3.080)	0.8566
Vitamina E - Hexano	11.517	(9.046; 13.987)	1.8839×10^{-6}
Nivel de confianza individual = 98.74%			

IC: Intervalos de confianza.