



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ÁREA ACADEMICA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
Y ALIMENTOS

**Evaluación del efecto hipoglucémico del aguamiel
obtenido de *Agave salmiana* en ratas Wistar con
diabetes inducida.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

Q.A. LOURDES GONZALEZ SALITRE

DIRECTOR

DR. JAVIER CASTRO ROSAS

CO-DIRECTOR

DRA. IZA FERNANDA PÉREZ RAMÍREZ

TULANCINGO DE BRAVO, HGO. SEPTIEMBRE DE 2017



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis titulada: **“Evaluación del efecto hipoglucémico del aguamiel obtenido de *Agave salmiana* en ratas Wistar con diabetes inducida”**, que desarrolla la estudiante Q.A. Lourdes González Salitre.

Asistentes:

- Dr. Javier Castro Rosas
- Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
- Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
- Dra. Esmeralda Rangel Vargas

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, Lourdes González Salitre, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”
DEL INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 30 de agosto de 2017.

Dr. Javier Castro Rosas

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Dra. Esmeralda Rangel Vargas



Dedicatorias

Primeramente, a ti mamá bonita, por todo tu amor y apoyo durante toda mi vida, que siempre has creído en mí, aunque la mayoría de las veces dices que no sabes lo que hago, pero siempre estás ahí para apoyarme, Te Amo.

A mi papito chulo, por lo que siempre llamaste un sacrificio, que ha valido la pena cada día de no verte, espero nunca defraudarte, gracias por tantas atenciones y por tanto amor, Te Amo.

Por último, una dedicatoria muy especial a mis pequeños amores David y Cynthia, saben que los amo demasiado, no pretendió ser un ejemplo, porque no lo soy, pero espero que ustedes logren superarse más que yo, siempre los apoyaré mis pequeños traviesos.

Agradecimientos

A Dios, por prestarme vida para realizar todos mis propósitos y sueños hasta el momento.

Al Doctor Javier C. por guiarme en este camino de investigación con un tema bastante interesante

Al Doctor Carlos G. Aldapa, por su apoyo en estos dos años y hacernos saber que no todo se basa en investigar si no también en socializar

A mi hermana, por brindarme tu apoyo no solo en estos 2 años de maestría, sino también en mi carrera y de paso gracias igual a tu esposo.

A mi hermano, que igual le has batallado, y como hermanos siempre unidos, y a la nueva hermana y la nueva consentida.

A mis amigas Emme, Gris y Liz, excelentes amigas de posgrado, todas ayudándonos a resolver dudas de todo tipo y por todas las pláticas tan interesantes, las quiero.

A mi amiga Sol y Liz, porque a pesar de ya no trabajar juntas, siguieron apoyándome, las quiero.

Finalmente, a Coco, me hiciste terminar de redactar la tesis en una semana y por todo tu apoyo gracias, te quiero

Índice

Relación de tablas.....	V
Relación de figuras	VI
Relación de graficas.....	VII
Glosario de términos	VIII
Resumen.....	1
Abstrac.....	2
1 Introducción	3
2 Marco teórico.....	5
2.1 Agave.....	5
2.1.1 Descripción botánica	5
2.1.2 Usos del agave.....	6
2.2 Aguamiel	8
2.2.1 Proceso de extracción tradicional del aguamiel.	8
2.2.2 Composición fisicoquímica del aguamiel	9
2.3 Fructanos	10
2.3.1 FOS y agave.....	11
2.3.2 Actividad biológica de Agave	11
2.4 Diabetes.....	15

2.4.1	Clasificación y diagnóstico de la diabetes	17
2.4.2	Factores de riesgo y tratamiento.....	20
3	Justificación	23
4	Objetivos	25
4.1	Objetivo general	25
4.2	Objetivos específicos	25
5	Hipótesis.....	26
6	Materiales y métodos.....	27
6.1	El esquema experimental está dividido en dos apartados principales.	27
6.2	Material biológico	27
6.3	Obtención del aguamiel.....	27
6.4	Pasteurización de aguamiel	28
6.5	Análisis fisicoquímico del aguamiel	28
6.5.1	Acidez.....	28
6.5.2	Determinación de pH	28
6.5.3	Determinación de proteína.....	29
6.5.4	Determinación de sólidos solubles totales (SST).	29
6.5.5	Determinación de cenizas.....	29
6.5.6	°Brix.....	29
6.6	Análisis de fructanos	30

6.6.1	Cromatografía en capa fina (TLC)	30
6.7	Efecto del consumo de aguamiel de maguey en ratas diabéticas	30
6.7.1	Mantenimiento de los animales.....	30
6.7.2	Inducción de diabetes	30
6.7.3	Determinación de glucosa sanguínea en ayuno	31
6.7.4	Evaluación hipoglucémica del aguamiel	31
6.7.5	Determinación cuantitativa de colesterol total	32
6.7.6	Determinación de Triglicéridos.....	33
6.7.7	Determinación de Colesterol HDL.....	33
6.8	Análisis histológico a páncreas, hígado y riñón.	33
6.9	Análisis estadístico.....	34
7	Resultados y discusiones	36
7.1	Pasteurización de aguamiel	36
7.2	Análisis fisicoquímico de aguamiel	37
7.2.1	Cromatografía en capa fina (TLC)	39
7.3	Efecto del consumo de aguamiel en las ratas	42
7.3.1	Efecto de aguamiel sobre peso corporal.....	42
7.3.1	Evaluación hipoglucemiante del aguamiel	48
7.3.2	Determinación cuantitativa de colesterol total	53
7.3.3	Determinación de Triglicéridos.....	54

7.3.4	Determinación de Colesterol HDL.....	56
7.4	Análisis histopatológico de los grupos de ensayo.....	59
7.4.1	Grupo control normal	59
7.4.2	Grupo control negativo.....	59
7.4.3	Grupo control positivo	60
7.4.4	Grupo aguamiel natural	61
7.4.5	Grupo aguamiel pasteurizado.....	62
8	Conclusiones	68
9	Perspectivas	69
10	Bibliografía	70

Relación de tablas

Tabla 1. Efecto de productos de agave sobre células o tejido en diferentes estados	14
Tabla 2. Los tres tipos principales de diabetes	19
Tabla 3. Criterios para el diagnóstico de la diabetes	20
Tabla 4. Prevalencia de la diabetes y de los factores de riesgo conexos.	20
Tabla 5. Grupos experimentales para la evaluación del efecto del aguamiel en ratas diabéticas.....	32
Tabla 6. Temperaturas de tratamiento del aguamiel	37
Tabla 7. Análisis químico proximal de aguamiel natural y pasteurizado	38
Tabla 8. pH y acidez titulable y para aguamiel pasteurizado y natural.....	38
Tabla 9. Distribución de las 5 muestras de aguamiel en el TLC	39
Tabla 10. Ganancia y/o pérdida de peso a lo largo del tratamiento en ratas sanas y diabéticas.	44
Tabla 11. Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de los grupos de ratas a lo largo del tratamiento	48

Relación de figuras

Figura 1. Diagrama experimental	31
Figura 2. TLC de 5 muestras de aguamiel de <i>A. salmiana</i>	40
Figura 3. TLC de aguamiel pasteurizado (1), aguamiel natural (2) y estándar de FOS (3).	42
Figura 4. Hígado. H-E. 400x.....	64
Figura 5. Riñón. H-E. 400x.....	65
Figura 6. Páncreas. H-E. 400x.....	66

Relación de graficas

Gráfica 1. Consumo diario de agua (mL) a lo largo del tratamiento por los diferentes grupos de ratas.	47
Gráfica 2. Concentración de glucosa en sangre de los diferentes grupos de ratas durante las 4 semanas de tratamiento.....	49
Gráfica 3. Concentración de glucosa en sangre de los 5 grupos de ratas en la cuarta semana de tratamiento.....	51
Gráfica 4. Concentración de colesterol total en sangre de los 5 grupos de ratas al final del tratamiento.	54
Gráfica 5. Concentración de triglicéridos en los 5 grupos de ratas al final del tratamiento.....	56
Gráfica 6. Concentración de colesterol HDL de los 5 grupos al final del tratamiento	58

Glosario de términos

FOS: fructooligosacáridos

CC. Grupo control sano

CN. Grupo control negativo

CP. Grupo control positivo

AN. Grupo aguamiel natural

CP. Grupo aguamiel pasteurizado

SCFA. (Short-chain fatty acids). Ácidos grasos de cadena corta

ETZ. Estreptozotocina

TLC. Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC por sus siglas en inglés)

FPG. Glucosa plasmática en ayunas (Fasting plasma glucose)

OGTT. Prueba oral de tolerancia a la glucosa (Oral glucose tolerance test)

DP5. 1-Fructofuranosilnístosa

BMA. bacteria mesófila aerobia

Resumen

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de la insulina o defectos en la acción de la insulina o de ambas. La hiperglucemia crónica se asocia a largo plazo con daño, disfunción y fallo de varios órganos, especialmente los ojos, los riñones y los sistemas nervioso y cardiovascular. Por lo que, la disminución de los niveles de glucosa en sangres (efecto hipoglucémico) y su control en las personas con diabetes es una prioridad. El objetivo fue evaluar el efecto hipoglucémico del aguamiel obtenido de maguey pulquero (*Agave salmiana*) en ratas diabéticas. El aguamiel se obtuvo directamente de los magueyes y se transportó al laboratorio bajo refrigeración. Se realizó la caracterización fisicoquímica y el perfil de fructanos tanto de aguamiel pasteurizado como sin pasteurizar (natural). El perfil de fructanos se determinó mediante la técnica de TLC (Thin Layer Chromatography). Se utilizaron ratas Wistar. La diabetes en las ratas se indujo mediante una dieta hipercalórica con posterior administración de estreptozotocina. A las ratas diabéticas se les administró aguamiel natural y pasteurizado. Como controles se incluyeron ratas no diabéticas con dieta normal y ratas diabéticas con y sin la administración de glibenclamida. Finalmente, todas las ratas fueron sacrificadas y se realizaron observaciones histopatológicas del hígado, riñón y páncreas. En ambos tipos de aguamiel se encontró un 0.37% de proteína y se encontró la presencia de kestosa, maltotriosa, maltopentosa, maltoheptosa, glucosa, fructosa y sacarosa. El aguamiel natural presentó un efecto hipoglucémico significativo ($p < 0.05$) en las ratas diabéticas; mientras que con el aguamiel pasteurizado se registró una tendencia a controlar los niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo. Se observó daño principalmente en hígado, debido a la dieta hipercalórica y al desarrollo de la diabetes.

Abstrac

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion or defects in the action of insulin or both. Chronic hyperglycemia is associated in the long term with damage, dysfunction and failure of several organs, especially the eyes, kidneys and nervous and cardiovascular systems. Therefore, lowering blood glucose levels (hypoglycemic effect) and controlling them in people with diabetes is a priority. The objective was to evaluate the hypoglycemic effect of aguamiel obtained from maguey pulquero (*Agave salmiana*) in diabetic rats. The aguamiel was obtained directly from the magueys and transported to the laboratory under refrigeration. The physicochemical characterization and the fructanos profile of both pasteurized and unpasteurized aguamiel (natural) were performed. The fructans profile was determined by the TLC technique (Thin Layer Chromatography). Wistar rats were used. Diabetes in rats was induced by a hypercaloric diet with subsequent administration of streptozotocin. Diabetic rats were given natural and pasteurized aguamiel. Controls included non-diabetic rats with normal diet and diabetic rats with and without glibenclamide administration. Finally, all rats were sacrificed and histopathological observations of the liver, kidney and pancreas were made. In both types of aguamiel of was found 0.37% protein and the presence of kestose, maltotriose, maltopentosa, maltoheptosa, glucose, fructose and sucrose was found. The natural aguamiel had an effect significant hypoglycemic ($p < 0.05$) in diabetic rats; While with pasteurized aguamiel there was a tendency to control blood glucose levels with respect to time. Damage was mainly observed in the liver, due to the hypercaloric diet and the development of diabetes.

1 Introducción

La diabetes es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Y la diabetes tipo 2 es la de mayor prevalencia. Las personas con diabetes tipo 2 pueden vivir por varios años sin complicaciones y con buena salud; esto cuando la diabetes se detecta y se trata correctamente. El principal tratamiento para la diabetes tipo 2 es la dieta y el ejercicio, esta terapia es altamente recomendable contra la resistencia a la insulina y en etapas tempranas de la diabetes tipo 2 (Laguna et al., 2013). Sin embargo, generalmente conforme la enfermedad evoluciona, se requiere el uso de fármacos para controlar los niveles de glucosa, presión y otras alteraciones que se presentan en estas personas enfermas. Por tal razón, se recurre al uso de diferentes tipos de fármacos que se emplean como apoyo para el control de la glucosa en la sangre como por ejemplo la glibenclamida. No obstante, dado que la resistencia a la insulina coexiste en la diabetes tipo 2, es importante combinar la glibenclamida con agentes que favorezcan la acción de la insulina, como la metformina o la tizodiladionas (Laguna *et al.*, 2013). Sin embargo, muchos de estos fármacos, aunque en su mayoría tiene un costo menor que la insulina, aun podrían considerarse como de un costo elevado. Además, a pesar de su costo, no son 100 % efectivos para la regulación de la glucosa. Por otro lado, muchos de estos fármacos tienen efectos secundarios indeseables y pueden tener efectos tóxicos en el paciente a corto, mediano o largo plazo; y la mayoría no han sido suficientemente estudiados.

En consecuencia, existe la necesidad del desarrollo de nuevos fármacos, compuestos, formulaciones y/o productos que contribuyan al control de la glucosa en las personas diabéticas; nuevos productos que sean más baratos, que logren reducir la glucosa sin necesidad de combinarse con otros productos o fármacos, que no sean tóxicos y que no tengan efectos secundarios. Actualmente, el uso de productos naturales o de productos alimenticios para el

control de la glucosa en personas con diabetes tipo 2 ha surgido como una opción viable. Sin embargo, existen limitados estudios sobre este tema. Se ha ensayado por ejemplo el extracto metanólico de la planta *Gymnema sylvestre* en ratas con diabetes; se observó que la administración oral diaria del extracto metanólico en concentraciones de 100, 200 y 400 mg/kg de peso corporal, redujo los niveles de glucosa en sangre en comparación con ratas diabéticas sin ningún tratamiento (Prabhu & Vijayakumur, 2014). Se ha reportado también que extractos de cálices de Jamaica reducen los niveles de glucosa en ratas diabéticas (Faromb & Ige). Existe una diversidad de plantas en todo el mundo a las que se les han atribuido propiedades curativas o terapéuticas contra diversos padecimientos. Sin embargo, la mayoría de estas plantas o sus derivados no han sido evaluados para determinar si efectivamente confieren algún efecto benéfico o terapéutico a las personas que las consumen. Es el caso del aguamiel de maguey (*Agave salmiana*) al que se le han atribuido diferentes propiedades curativas, las cuales no han sido comprobadas. El uso que se le ha dado al aguamiel ha sido principalmente para la producción de pulque. No obstante, en los últimos años el aguamiel se ha comercializado como jarabe de agave. Y recientemente se han reportado que el aguamiel tiene propiedades prebiótico, antioxidante y es buen precursor para la absorción de minerales.

Algunas personas con diabetes refieren que el consumo del aguamiel les ayuda a sentirse mejor ya que al parecer el aguamiel disminuye los síntomas provocados por la diabetes. Sin embargo, no existen evidencias o publicaciones científicas que muestren un posible efecto terapéutico del aguamiel, tampoco sobre su capacidad hipoglucémica en personas con diabetes o bien que muestren que el aguamiel confiere algún efecto en las personas con diabetes que derive en un bienestar físico o fisiológicos. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto hipoglucémico del aguamiel obtenido de maguey pulquero en ratas diabéticas.

2 Marco teórico

2.1 Agave

Los agaves (del griego *agavus*, que significa admirable o noble), mejor conocidos por su nombre vernáculo como magueyes, son plantas endémicas del continente americano, característicos de los paisajes áridos, semiáridos y templados de México. Crecen en suelos pobres y en climas con lluvias escasas o irregulares (Burgos, 2013). Existen más de 250 especies de agaves, localizadas entre el norte de la República Mexicana y Centroamérica (Lorenzo, 2007). Los estados más ricos en diversidad de especies son Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Coahuila, Sonora, Durango y los estados del centro como: Hidalgo, Estado de México, Morelos, Tlaxcala y Puebla (Burgos, 2013).

La palabra “maguey” puede tener varios orígenes, uno de ellos, estipula que esta palabra proviene de una derivación post-conquista de la palabra “metl” (denominación antigua del agave por los mexicas), otro origen de la palabra hace referencia a la diosa náhuatl del pulque “Mayahuel” (Conclaves, 1978).

2.1.1 Descripción botánica

La familia *Agavaceae* es endémica de América, se encuentra en zonas áridas y semiáridas de América Central y América del norte e incluye nueve géneros y 330 especies. Su centro de origen y de mayor diversidad, se encuentra en México donde se encuentran los nueve géneros, representados por 251 especies (García, 2007).

Los agaves son monocárpios, es decir, sólo florecen una vez en su vida, después de la cual, la planta muere. El agave es una planta hermafrodita; y a pesar de que produce una gran cantidad de semillas, alrededor del 96% de estas son estériles y se pierden. Por lo tanto, su propagación

vegetativa es por medio de brotes o hijuelos (mecuates), estos mismos brotan de las raíces de la planta madre, constituyendo plantas nuevas que pueden ser trasplantadas, resultando así nuevos magueyes (Granados, 1993).

Son plantas perennes, con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, el cual puede ser corto y apenas sobrepasar unos centímetros del suelo, o bien, ser largo y erecto. Las hojas por lo general son suculentas, fibrosas y con la base dilatada y carnosa. Su forma varía de lineal a lanceolada u ovada. Los márgenes exhiben una gran diversidad morfológica, los dientes córneos, en la mayoría de las especies, sobresalen como proyecciones de tejido, o bien se ubican sobre una banda córnea continua, mientras que en otras es filítero y se desprende en delgadas fibras o bien muestra diente-cillos microscópicos, semejantes a filosas sierras. La hoja casi siempre tiene una espina al final del ápice que puede medir desde algunos milímetros hasta cinco centímetros (García, 2007).

2.1.2 Usos del agave

Los agaves, de acuerdo con el producto que se extrae de ellos, pueden dividirse en los siguientes grupos: textileros (henequeneros en la península de Yucatán); mezcaleros (en la zona de Oaxaca y Guerrero); Tequileros (en la zona de Jalisco; Nayarit, Michoacán, Guanajuato y Tamaulipas); y pulqueros (en este caso sus variedades son el maguey manso, el cenizo y el ayoteco); el maguey que crece de manera silvestre se llama cimarrón (Lorenzo, 2007).

Otros usos que se le daban al maguey fueron el que de sus pencas se obtenían hilos para la elaboración de costales, tapetes, morrales, ceñidores, redes de pesca y cordeles; las espinas se usaban como agujas o clavos; las pencas completas eran utilizadas como tejas para techar casas; los quiotes servían como vigas o como cercas para delimitar terrenos; con las raíces

elaboraban cepillos, escobas y canastas; y finalmente si se extrae la sabia de la planta, se obtiene el aguamiel, indispensable para obtener la bebida ritual por excelencia “el pulque” (Cervantes, 2005). En el centro de la república mexicana, las pencas del maguey son toda vía utilizadas para la elaboración de la barbacoa, y específicamente en el estado de Hidalgo además para preparar otros alimentos típicos como el Ximbo.

Después de 20 siglos, el uso más común del agave en la industria alimentaria es en la producción de bebidas alcohólicas destiladas, derivadas de la fermentación de los azúcares del agave. Tal es el caso del tequila y del mezcal. En estos casos, los fructanos se transforman en fructosa, la cual no tiene propiedades funcionales. Sin embargo, una muy importante excepción en la producción de bebidas alcohólicas es el *pulque*, una bebida no destilada, obtenida de la fermentación del *aguamiel*, una savia rica, dulce y nutritiva, extraída de las piñas de agave, mediante un proceso muy delicado. Este procedimiento fue probablemente desarrollado por la cultura *Otomí*, hace 2000 a.C., el cual fue posteriormente heredado por casi todas las culturas de Mesoamérica. El *pulque* tiene varias ventajas nutricionales, derivado tanto del contenido residual de complejos de fructooligosacáridos provenientes del aguamiel, incluyendo glucanos de origen microbiano y fructanos, así como por la microbiota natural presente en la bebida fermentada (Olvera *et al.*, 2015).

Se ha reportado la composición de metabolitos primarios y secundarios de diferentes especies de *Agave*. Dentro de los metabolitos primarios se incluyen los carbohidratos simples.

Los jarabes de *Agave* son reconocidos cada vez más como edulcorantes naturales, alimentos funcionales y prebióticos. Como metabolitos secundarios, las plantas de agave contienen sapogeninas y saponinas esteroides, esteroides, flavonoides, homoisoflavonoides, ácidos

fenólicos, taninos, cumarinas volátiles, alcanos de cadena larga, ácidos grasos y alcoholes (Sidana, Singh, & Sharma, 2016).

2.2 Aguamiel

El aguamiel (savia azucarada que se extrae de varias especies de agave) se obtiene mediante un proceso que interrumpe el desarrollo normal de la planta. Dependiendo de la especie de la planta, normalmente es un líquido ambarino o incoloro y transparente; tiene un sabor dulce y presenta un aroma herbáceo característico (Loyola, 1956). El aguamiel es extraído de las especies nativas, principalmente *Agave salmiana* var. *Salmiana* (verde o agave manso), *A. atrovirens* (agave blanco), y *A. mapisaga* (mexicano o agave mano larga), y en menor proporción de *A. lehmanni* y *A. altísima*, distribuidos principalmente en los estados de la meseta del centro de México (Escalante *et al.*, 2012).

La savia de agave ha sido consumida por los seres humanos como una bebida llamada “aguamiel”, o es utilizada como materia prima para néctares o bebidas alcohólicas como la antigua bebida alcohólica tradicional conocida como “pulque” (Santos-Zea *et al.*, 2012). Esta bebida alcohólica se produce por la fermentación del jarabe de agave por la microflora natural, en un proceso corto (12-24 h), con una concentración final de alcohol del 3% al 6% (Valadez *et al.*; 2012).

2.2.1 Proceso de extracción tradicional del aguamiel.

El aguamiel se extrae de agaves maduros de 7 a 10 años aproximadamente, que están a punto de producir inflorescencia (quiote). A las plantas maduras se les rompe o elimina la yema floral (castración), dejando una cavidad (cajete) en el centro del vástago del agave. Esta operación se realiza generalmente en primavera o finales del otoño. Si la inflorescencia de la planta crece,

el maguey nunca va a producir aguamiel, y si la castración se realiza antes de la maduración del agave, el rendimiento en la producción de aguamiel será escaso. La cavidad resultante se cubre con trozos de hojas del mismo agave para evitar la exposición de la cavidad al medio ambiente. La pared exterior de la cavidad abierta se raspa para abrir los vasos, promoviendo el flujo de savia y su acumulación en la cavidad. La savia se recoge dos veces al día (al amanecer y al atardecer) mediante la succión oral a través de una calabaza seca, llamada acocote o con un recipiente. La producción de aguamiel dura de 3 a 6 meses hasta que la planta muere, con una producción aproximada de 1.000 L/ planta (Escalante *et al.*, 2012).

2.2.2 Composición fisicoquímica del aguamiel

Se ha reportado que el aguamiel en general contiene 85% de humedad, 15% de materia seca, del cual, el 0.69% es de proteína cruda, 0.27 de extracto etéreo, 0.57% de fibra cruda, 0.39% de ceniza y 98% de extracto libre de nitrógeno (Silos-Espino *et al.*, 2011), y con un contenido de 7 a 14 °Brix. El aguamiel puede ser ácido o ligeramente alcalino, con pH cercano a la neutralidad (6.8), incoloro y transparente (Burgos, 2013). Ortiz-Basurto *et al* (2008), han reportaron que el aguamiel obtenido de *Agave mapisaga* contenía 11.5% en peso de materia seca, que estaba compuesta principalmente de azúcares (75% en peso), de los cuales, el 10% en peso eran fructooligosacáridos, entre otros componentes encontrados, reportan 0.3% en peso de aminoácidos libres, 3% en peso de proteína y 3% en peso de cenizas.

En base seca, el aguamiel tiene alrededor del 90% de azúcares, principalmente sacarosa, fructosa y glucosa, pero también, alrededor del 10% de agavin-fructooligosacáridos (*agave-FOS*). Estos azúcares son liberados, debido a la acción de la enzima fructosil hidrolasa, durante el tiempo de almacenamiento entre colecciones. Cuando el aguamiel es posteriormente

fermentado y los azúcares simples transformados en productos microbianos, el contenido de *agave-FOS* se conservan, constituyendo un importante valor prebiótico del pulque. El aguamiel también contiene aminoácidos esenciales, proteínas, vitaminas, gomas y minerales, y constituyen un sustituto del agua o un alimento alternativo en lugares donde el agua es escasa o donde no hay proteína disponible (Olvera *et al.*, 2015).

Uno de los principales intereses nutricionales del aguamiel y del pulque radica en su contenido de fructanos y fructooligosacáridos como fuente de fibra soluble y de prebióticos. Se cree que, tras su consumo, los FOS modulan la microflora colónica, promoviendo el crecimiento de microorganismos tales como Bifidobacterias y Lactobacilo. La microflora benéfica produce ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que desencadenan un conjunto de procesos que benefician al huésped (Olvera *et al.*, 2015; Kolida, Tuohy, & Gibson, 2002). Ortiz-Basurto *et al.*, (2008), reportan un contenido de fructooligosacáridos de 7.5% (b. s.) presente en aguamiel, motivo por el cual Santos-Zea *et al.*, (2012), reportan al *Agave* como fuente importante de prebióticos que podrían ser utilizados como ingredientes en alimentos funcionales. Debido al contenido nutricional del aguamiel, ha sido considerado como una bebida funcional y alternativa alimentaria en lugares donde la calidad del agua es pobre y el consumo de carne es limitado (Silos-Espino *et al.*, 2011)

2.3 Fructanos

Los fructanos son polímeros de fructosa, derivados de la sacarosa y sintetizados como carbohidratos de reserva en aproximadamente el 15% de las plantas con flores. De acuerdo con su enlace fructosil, se clasifican como inulinas y levanas, con residuos lineales de fructosa unidos por enlaces β (2-1) y β (2-6), respectivamente; gramíneas, que tienen ambos tipos de

enlaces β (2-1) y β (2-6), respectivamente; y las neoserias de fructano, que se caracterizan por tener una molécula de glucosa interna que puede ser alargada por β (2-1) y/o β (2-6), produciendo neoserias de inulina y/o levana, respectivamente (Mellado-Mojica & López, 2012). La presencia de fructanos en *agave* fue reportado en 1888, inicialmente se describieron como “inulinas” por similitud con los β 2-1 fructanos (Olvera *et al.*,2015), pero López *et al.*, (2003), demostraron que los fructanos de *agave* no son inulinas sino mezclas complejas de fructooligosacáridos (FOS) y fructanos que contienen enlaces β (2-1) y β (2-6), con unidades de glucosa interna (neoserias de fructanos) y externas (gramineas de fructanos).

2.3.1 FOS y *agave*

Los fructooligosacáridos (FOS), son compuestos bioactivos, con importantes efectos benéficos, que favorecen una buena absorción de minerales en el cuerpo, regulan los niveles de glucosa y colesterol en sangre y su actividad más importante, es la inducción del crecimiento de microorganismos probióticos en el tracto gastro-intestinal, contribuyendo a la prevención del cáncer de colon (Muñiz-Márquez *et al.*, 2016).

Los estudios realizados sobre fructooligosacáridos y *agave*, son mayoritariamente sobre la piña y el jarabe de *agave*, este último, se define como la sustancia naturalmente dulce, producida cuando se cocinan los pinos de *agave*. Los jarabes de *agave* están en gran demanda como sustitutos del azúcar, debido a su bajo índice glucémico y capacidad antioxidante (Mellado-Mojica & López, 2015).

2.3.2 Actividad biológica de *Agave*

Las plantas de *agave* se han utilizado, por sus propiedades medicinales, desde tiempos inmemorables. La mayoría de los usos etnofarmacológicos de estas plantas, pueden atribuirse

a sus actividades antimicrobiana y antioxidantes. Algunas actividades biológicas de los compuestos de *Agave* (y extractos) han sido científicamente probadas y sus mecanismos de acción han sido establecidos con la ayuda de diferentes ensayos y modelos *in vitro* e *in vivo*. Estas actividades son de importancia medicinal y farmacológica, así como agrícola (Sidana, Singh, & Sharma, 2016).

Se ha reportado evidencia directa de la actividad prebiótica de los fructanos de *Agave* (*A. tequiliana*) *in vitro*, mediante el incremento del número de *bifidobacterias* y *lactobacilos*, como consecuencia del impacto diferencial de fructanos de agave sobre la ecología microbiana en el tracto digestivo humano, así como los cambios selectivos en el metabolismo del colon, lo que se refleja en un incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta (Olvera *et al.*, 2015). En otro estudio realizado por Gómez *et al.* (2010), mediante un estudio *in vitro*, indican que la inulina derivada del *Agave tequiliana Weber var. Azul*, tiene un efecto prebiótico potencial, ya que aumenta el crecimiento de *bifidobacterias* y *lactobacilos*, efecto similar al observado para los prebióticos tipo inulina, derivados de la raíz de achicoria, justificando así el potencial del agave como prebiótico.

Respecto al aguamiel, los estudios realizados para probar actividad biológica, son en realidad limitados, por ejemplo, Tovar-Robles *et al.* (2011) analizaron el efecto del consumo de aguamiel (*Agave salmiana*) fresco y hervido sobre la biometría hemática en conejos, así como su actividad antioxidante, con el fin de determinar su valor nutricional, encontrando que el aguamiel fresco promovió aumentos de peso, alrededor del 13% en la séptima semana de tratamiento, en cuanto a los recuentos de hemoglobina, aumentaron en un 4.5% y 9%, cuando los conejos fueron alimentados con aguamiel fresco y hervido, respectivamente, así como el contenido de Fe aumentó con el aguamiel fresco; respecto a su actividad antioxidante, estos autores

reportaron que el aguamiel, posee una actividad antioxidante superior a las bebidas comerciales de café y jugo de uva, ellos sugieren que el aguamiel puede ser propuesto como un producto nutracéutico para reducir las deficiencias de hierro.

Otro estudio sobre aguamiel, no precisamente con actividad biológica, es el realizado por Muñiz-Márquez *et al.* (2016), en donde su objetivo fue mejorar la producción de fructosiltransferasa (FTasa) mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando aguamiel como medio de cultivo y *Aspergillus oryzae* como cepa productora, concluyendo que se puede utilizar el aguamiel como medio de cultivo para la producción de FOS, lo cual es una alternativa económica para la producción industrial de FOS y FTasa enzimática.

En la tabla 1, se muestra la recopilación de información sobre los beneficios probados para la salud de los productos alimenticios de agave, dicha revisión fue realizada por Santos-Zea *et al.*, (2012).

Finalmente, un estudio más reciente sobre aguamiel fue el realizado por Leal-Díaz *et al.*, (2016), donde evaluaron *in vivo*, los compuestos bioactivos presentes en el concentrado de aguamiel de *Agave salmiana*, encontrando que el consumo de un extracto de concentrado de aguamiel rico en saponinas redujo la ganancia de peso corporal y de masa grasa, disminuyendo los niveles de glucosa en suero, insulina y colesterol LDL, en ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Además, encontraron que los ratones alimentados con el extracto de saponinas presentaron un índice HOMA reducido y niveles de lípidos hepáticos y una expresión aumentada de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos y concluyeron que las saponinas de *Agave salmiana*, pueden ser una alternativa para atenuar los cambios metabólicos que acompañan a la obesidad.

Tabla 1. Efecto de productos de agave sobre células o tejido en diferentes estados

Efecto terapéutico	Especie	Producto	Modelo	Resultados
Anticancerígeno	<i>Agave spp.</i>	Concentrado de saponinas, durante al menos 8 semanas	<i>In vitro</i>	Inhibición del crecimiento del colon humano Caco-2 (84.8%) y cáncer hepático HepG2 (67.9%) de las líneas celulares en 15 mg/mL (Uribe & Saldivar, 2009)
	<i>A. durangensis</i>	Mezcal envejecido en barricas de roble blanco americano de 0 a 207 días	<i>In vitro</i>	La concentración fenólica total aumentó (214.24 a 852.38 mg/L), así como su complejidad del perfil (hasta 11 ácidos fenólicos y 3 flavonoides) aumentada debido a la lixiviación de los barriles de roble. La capacidad de barrido radical aumentó con el tiempo de envejecimiento (EC50 de 2.034 a 6.392 µg/mL) (Ávila-Reyes <i>et al</i> ; 2010).
Antioxidante	<i>A. salmiana</i> <i>Agave spp.</i>	"Aguamiel" y pulque	<i>In vitro</i>	La capacidad antioxidante DPPH en "aguamiel" fue de 1096.8 µM TE y 567.2 µM TE en pulque. El contenido total de fenoles en aguamiel fue de 904.8µM GAE y 452 µM GAE en pulque. El ácido ascórbico fue de 140.5 mg/L en aguamiel y 93.8 mg/L en pulque (Tovar-Robles <i>et al</i> ; 2011).
	<i>A. atrovirens</i>	Concentrado de "aguamiel" de 3 fuentes diferentes	<i>In vitro</i>	La capacidad antioxidante varió de 44.51 a 182.10 µmol TE/g de extracto y el contenido fenólico de 6.64 a 19.26 mg GAE/g en los extractos metanólico y de acetona, respectivamente (Cerde-de los Santos, 2011)
Absorción de minerales	<i>A. salmiana</i>	"Aguamiel" (F) fresco y (B) hervido	<i>In vivo</i>	La hemoglobina aumentó 4.5% en F y 9% en conejos alimentados con B. El hematocrito aumentó 2.6% con F y 5.3% con B comparado con el agua utilizada como control (Tovar-Robles <i>et al</i> ; 2011)
	<i>A. Salmiana</i>	Jarabe de agave de alta fructosa (HFAS) de piña de agave prensada	<i>In vivo</i>	HFAS a dosis de 2.0 y 5.0 g/kg tuvieron un efecto protector sobre la esteatosis hepática en ratas diabéticas (D). El aumento de peso no se vio afectado. La ingesta de alimentos disminuyó en las ratas D a medida que aumentaba HFAS. La glucosa alcanzó un nivel mínimo en D (300 mg/dL) a una dosis de 0.5 g/kg, y la hemoglobina glicada fue (7.5%) máxima a la misma dosis (García-Pedraza <i>et al</i> ; 2009)
Antidiabético	<i>A. atrovirens</i>	Concentrado de saponinas	<i>In vitro</i>	El extracto metanólico (200 µg/mL) aumentó la secreción de insulina similar a la glibenclamida en las células RIN5F. El extracto metanólico introducía enzimas digestivas de carbohidratos (Cerde-de los Santos, 2011)
	<i>A. angustifolia</i>	Fructanos de agave	<i>In vivo</i>	Fase 1: la suplementación de fructanos disminuyó el peso corporal total en las ratas D y ND. En ratas D la glucosa plasmática, la LDL y la esteatosis hepática de grado 2 disminuyeron. Fase 2: el peso de las ratas OD, el colesterol total y la LDL disminuyeron, pero también disminuyeron HDL (22%). la esteatosis hepática disminuyó, cuando se suplemento con agave de fructanos (Rendon-Huerta <i>et al</i> ; 2012)

	<i>Agave spp.</i>	"Aguamiel" como termoprotector	-	Después de cinco semanas de almacenamiento a 4°C, se preparó el polvo de <i>Bifidobacterium bifidum</i> con "aguamiel" aumentó cinco veces la viabilidad celular en comparación con el probiótico sin aguamiel (Rodríguez-Huezo <i>et al</i> ; 2007)
	<i>A. angustifolia</i>	Fructanos de agave	<i>In vitro</i>	Los fructanos de <i>A. angustifolia</i> promovieron el crecimiento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i> a medida que aumentaba la concentración de fructanos (0-21 g/L), medida como disminución del pH y aumento de OD600 (Rendón-Huerta <i>et al</i> ; 2011)
Prebiótico	<i>A. angustifolia</i>	Fructanos de agave	<i>In vivo</i>	Fase 1: la ingesta de fructanos durante 6 semanas aumentó a nivel gastrointestinal 1.4 veces <i>Lactobacillus spp.</i> y <i>Bifidobacterium spp.</i> > 3 veces. Fase 2. la ingesta de fructanos durante 6 semanas aumentó <i>Lactobacillus spp.</i> 1.9 veces en OND y 2.4 veces OD. La población de <i>Bifidobacterium spp.</i> aumento 3.7 veces en OND y 3.4 veces en OD (Rendon-Huerta <i>et al</i> ; 2012)
	<i>A. tequiliana</i>	Fructanos de agave	<i>In vitro</i>	El uso de fructanos de agave aumentó la población de <i>Bifidobacterium spp.</i> (de 7.79 a 8.99 log ₁₀ células/mL) y <i>Lactobacillus spp.</i> (de 7.75 a 8.43 log ₁₀ células/mL) en comparación con el uso de celulosa. La Producción total de SCFA aumentó a través del tiempo y alcanzó el nivel más alto después de 24 horas (49.15 mmol/L) (Gómez, Tuohy <i>et al</i> ; 2010)
	<i>Agave spp.</i>	Inulina de agave	<i>In vitro</i>	Después de 12 horas, el total de SCFA fue de 452 mg/g de materia seca (DM) compuesto por acetato (229 mg/g de DM), propionato (52 mg/g de DM) y butirato (172 mg/g) de DM). Después de 8 horas, la inulina de agave mostró un aumento de <i>Bifidobacterium spp.</i> (7.4 a 8.0 log ₁₀ UFC/tubo) y <i>Lactobacillus spp.</i> (8.6 a 9.7 log ₁₀ UFC/tubo) (Hernot <i>et al</i> ; 2009)

Fuente: (Santos-Zea *et al*; 2012).

2.4 Diabetes

La diabetes mellitus es un conjunto de alteraciones metabólicas caracterizada por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de la insulina, la acción de esta o de ambas (Laguna *et al.*, 2013). La OMS (2016), define a la diabetes, como una enfermedad crónica, que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (OMS, 2016). La hiperglucemia crónica, propia de la diabetes, se asocia a largo plazo, con el daño, disfunción y fallo de varios órganos, especialmente los ojos, los riñones, el sistema nervioso y el sistema cardiovascular (ADA., 2004).

La diabetes mellitus es una de las enfermedades más frecuentes en el mundo. Durante las últimas décadas, este padecimiento ha experimentado un aumento explosivo, alcanzando en la actualidad, proporciones epidémicas. Cambios en el estilo de vida, debido a un aumento en el consumo de azúcar y grasas, mayor disponibilidad de alimentos y reducción de la actividad física, han dado como resultado los altos índices actuales de obesidad y diabetes (Laguna, *et al.*, 2013).

Según las estimaciones, 422 millones de adultos, en todo el mundo, tenían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980. La prevalencia mundial (normalizada por edades) de la diabetes, casi se ha duplicado desde ese año, pasando del 4.7% al 8.5% en la población adulta. En México, para datos de mortalidad, de acuerdo con la población total de 127,000.000, la OMS (2016) reportó que el número de muertes por diabetes, en hombres con una edad entre 30 a 69 años fue de 23,100 y en mujeres de 22,000, y para una edad de 70 años o más en hombres fue de 17,600 y en mujeres de 24,300. El número de muertes atribuibles a la hiperglucemia en hombres de una edad de 30 a 69 años fue de 28 100 y en mujeres de 25 400 (OMS, 2016).

La OMS (2016) clasificó a la diabetes dentro de una de las cuatro enfermedades no transmisibles (ETN) o crónicas, que son afecciones de larga duración y generalmente con una progresión lenta. Dentro de este tipo de enfermedades, también se encuentran el cáncer, enfermedades cardiovasculares, y las enfermedades respiratorias crónicas. Hoy en día, las enfermedades no transmisibles, suponen el 43% de la carga mundial de morbilidad. Se calcula que para el año 2020, esta cifra alcanzará el 60% y que esas dolencias serán la causa de un 73% de las muertes. La mayor parte de ese incremento se deberá a epidemias emergentes de enfermedades no transmisibles en los países en desarrollo (OMS, 2016).

2.4.1 Clasificación y diagnóstico de la diabetes

Los tipos de diabetes más comunes son: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y diabetes gestacional.

A continuación, se describe cada tipo de diabetes.

2.4.1.1 *Diabetes tipo 1:*

Esta forma de diabetes se presenta solo en el 5-10% de las personas con esta enfermedad, identificado previamente por el término diabetes insulina-dependientes, la diabetes Tipo 1, o diabetes de inicio juvenil, resulta de una destrucción autoinmune de las células β del páncreas (ADA, 2004). Se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona. Se desconoce aún la causa de la diabetes Tipo 1 y no se puede prevenir con el conocimiento actual. Sus síntomas consisten, entre otros, en excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio. Estos síntomas pueden aparecer de forma súbita (OMS, 2016).

2.4.1.2 *Diabetes tipo 2:*

Esta forma se presenta en el 90-95% de las personas con diabetes, se había referido a la diabetes no dependiente de insulina, diabetes Tipo II, o diabetes del adulto, abarca las personas que tienen resistencia a la insulina y por lo general tienen relativa (no absoluta) deficiencia de insulina (ADA., 2004). Puede estar asociada con niveles elevados, normales o bajos de insulina, dependiendo en la etapa de progresión de la diabetes. Se reconoce como un trastorno progresivo, que se asocia a una disminución de la función pancreática con el tiempo (Cefalu, 2006), al menos al principio, y muchas veces a lo largo de su vida, estas personas no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir (ADA., 2004). Si bien, el factor genético participa en el desarrollo de diabetes Tipo 2, el modo de vida es determinante en la aparición de la enfermedad.

La excesiva ingesta de alimentos con alto índice de calorías y la disminución de la actividad física, predisponen al desarrollo de la misma (Laguna *et al.*, 2013).

Dependiendo de la etapa de diabetes en que se encuentre el individuo, el control efectivo puede requerir la modificación del estilo de vida, la terapia con fármacos orales, de agentes orales combinados con insulina o la insulina sola (Cefalu, 2006).

Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes Tipo 1, pero a menudo menos intensos. En consecuencia, la enfermedad puede diagnosticarse, solo cuando ya tiene varios años de evolución y han aparecido complicaciones (OMS, 2016)

2.4.1.3 Diabetes gestacional

La diabetes gestacional se presenta en alrededor de 7% de los embarazos (Laguna *et al.*, 2013). La OMS indica que la diabetes gestacional corresponde a una hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre) que se detecta durante el embarazo y alcanza valores que, pese a ser superiores a los normales, son inferiores en los establecidos para diagnosticar una diabetes. Las mujeres con diabetes gestacional corren mayor riesgo de sufrir complicaciones durante el embarazo y el parto, así como de padecer diabetes Tipo 2 en el futuro. Suele diagnosticarse mediante las pruebas prenatales, más que porque el paciente refiera síntomas (OMS, 2016).

Puesto que se requieren sofisticadas pruebas de laboratorio para distinguir entre la diabetes de Tipo 1 (que exige inyecciones de insulina para la supervivencia del paciente) y la diabetes de Tipo 2 (en la que el organismo no puede utilizar adecuadamente la insulina que produce), no se dispone de estimaciones mundiales separadas sobre la prevalencia de la diabetes de Tipo 1 y de Tipo 2. La mayoría de las personas afectadas tienen diabetes de tipo 2, que solía ser exclusiva de adultos, pero que ahora también se da en niños (OMS, 2016).

En la Tabla 2, se resumen los tres tipos principales de diabetes. Todos los tipos de diabetes pueden provocar complicaciones en varias partes del organismo e incrementar el riesgo general de muerte prematura. Entre las posibles complicaciones se incluyen: ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal, amputación de piernas, pérdida de visión y daños neurológicos. Durante el embarazo, si la diabetes no se controla de forma adecuada, aumenta el riesgo de muerte fetal y otras complicaciones (OMS, 2016).

Tabla 2. Los tres tipos principales de diabetes

Diabetes Tipo 1	Diabetes Tipo 2	Diabetes gestacional
<ul style="list-style-type: none"> • Factores de riesgo: antecedentes familiares de diabetes, genética, infecciones y otras influencias ambientales. • Aparece de manera muy repentina y actualmente es incurable. • Sin insulina, una persona con diabetes Tipo 1 moriría. 	<ul style="list-style-type: none"> • Factores de riesgo: exceso de peso corporal, inactividad física, mala nutrición, genética, antecedentes familiares con diabetes, antecedentes de diabetes gestacional y edad avanzada. • Puede pasar desapercibida y no diagnosticada por años. • A menudo se puede manejar con cambios en la dieta y con aumento de la actividad física. En algunos casos se requiere medicación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Aparece durante el embarazo. • Puede ocasionar graves riesgos para la salud tanto de la madre como del niño. • Asociado con mayor riesgo de que la madre y el niño desarrollen diabetes Tipo 2 más tarde en su vida.

Fuente: (IDF, 2015)

2.4.1.4 Diagnóstico

La diabetes se diagnostica generalmente basándose en los criterios de glucosa plasmática, glucosa plasmática en ayunas (FPG) o el valor de la glucosa plasmática de 2 horas (PG de 2 horas) después de una prueba oral de tolerancia a la glucosa de 75 g (OGTT) (ADA, 2014), en la Tabla 3 se muestran los criterios para el diagnóstico de diabetes.

Tabla 3. Criterios para el diagnóstico de la diabetes

Parámetros	Valor recomendado
FPG (Fasting plasma glucose)	≥126 mg/dL (7.0 mmol/L)
OGTT (Oral glucose tolerance test)	≥200 mg/dL (11.1mmol/L)
Glucosa plasmática aleatoria	≥200 mg/dL (11.1mmol/L)

Fuente: (ADA, 2014)

2.4.2 Factores de riesgo y tratamiento

La genética, la edad y el historial familiar son factores que no se pueden cambiar e incrementan el riesgo de desarrollar diabetes de Tipo 2. Sin embargo, existen otros factores de riesgo que, si pueden cambiarse, como lo es el sobrepeso y la obesidad, este factor de riesgo puede cambiarse mediante una alimentación saludable y actividad física (OMS, 2016). Este factor de riesgo (obesidad) en los últimos años ha aumentado entre adultos y niños en todo el mundo, lo cual se asocia con diferentes complicaciones como enfermedad hepática grasa, la diabetes Tipo 2 y complicaciones del corazón (Haslam & James., 2005; Kotronen *et al.*, 2011). Se ha observado que 9 de cada 10 personas con diabetes Tipo 2, recién diagnosticadas, tienen sobrepeso, por lo tanto, la importancia de la prevención temprana de la obesidad y por ende la intervención contra la diabetes Tipo 2 (ADA, 2014). En la Tabla 4 se muestran algunos datos importantes sobre la prevalencia de la diabetes y de los factores de riesgo conexos para México.

Tabla 4. Prevalencia de la diabetes y de los factores de riesgo conexos.

	hombres	mujeres	total
Diabetes	9.7%	11.0%	10.4%
Sobrepeso	61.6%	65.0%	63.4%
Obesidad	22.1%	32.7%	27.6%
Inactividad física	18.9%	31.2%	25.4%

Fuente (OMS, 2016)

De acuerdo con la OMS (2016), se deben de seguir medidas simples, relacionadas con el estilo de vida, para prevenir la diabetes Tipo 2 o bien retrasar su aparición, las cuales consisten en:

- Alcanzar y mantener un peso corporal saludable.
- Mantenerse activo físicamente: al menos 30 minutos de actividad regular de intensidad moderada la mayoría de los días de la semana.
- Consumir una dieta saludable, que evite el azúcar y las grasas saturadas.
- Evitar el consumo de tabaco, puesto que aumenta el riesgo de sufrir diabetes y enfermedades cardiovasculares (OMS, 2016).

El principal tratamiento para la diabetes Tipo 2, es la combinación de una dieta saludable y el ejercicio, esta terapia es altamente recomendada contra la resistencia a la insulina y en las etapas tempranas de la diabetes Tipo 2. La pérdida de peso causa reducción del tamaño de los adipocitos, lo que revierte las anomalías en la secreción de citocinas y en la liberación de ácidos grasos, disminuyendo así, la resistencia a la insulina. Así mismo una dieta rica en fibra, produce beneficios, al disminuir la velocidad de absorción de la glucosa y, por ende, retrasar su aparición en la sangre, lo que permite un mejor manejo de la glucosa por las diferentes vías metabólicas que la captan. El ejercicio, por su parte, además de disminuir los depósitos de grasa, produce efectos favorables en la captación de la glucosa y la oxidación de los ácidos grasos, otro de los efectos principales del ejercicio es aumentar el transporte y la utilización de glucosa (hasta 50 veces) en el músculo (Laguna *et al.*, 2013).

Otro compuesto utilizado durante décadas en el tratamiento de la diabetes tipo 2 es la glibenclamida, el cual es un compuesto, que induce la secreción de la insulina, al interactuar con el canal de potasio sensible a ATP, uno de los componentes del proceso de secreción

de la insulina en respuesta a la glucosa. Dado que la resistencia a la insulina coexiste en la diabetes Tipo 2, es importante combinar la glibenclamida con agentes que favorezcan la acción de la insulina, como la metmorfin, la tizodiniladonas u otros agentes sensibilizadores a la acción de la hormona (Laguna *et al.*, 2013).

Se han realizado diversos estudios sobre tratamientos alternativos para la diabetes, como lo es el uso de plantas con efecto hipoglucemiante, por citar algunos ejemplos, está el caso de *Gymnema sylvestre*, en el cual estudiaron el extracto metanólico de esta planta para analizar sus propiedades antidiabéticas en ratas inducidas a diabetes mediante el uso de estreptozotocina, encontrando que la administración oral diaria del extracto metanólico de *Gymnema sylvestre* (100, 200 y 400 mg/kg de peso corporal) mostró efectos beneficiosos sobre el nivel de glucosa en sangre, concluyendo así, que esta planta posee propiedades antidiabéticas, además de mejorar el peso corporal y los niveles totales de lípidos (Prabhu & Vijayakumur, 2014). Otro estudio que prueba la capacidad hipoglucemiante es el realizado por Morales (2009), en el cual evaluaron el consumo de epidermis y pulpa de xoconostle cuaresmeño (*Opuntia matudae*) sobre parámetros bioquímicos de ratas diabéticas, observando que el consumo de pulpa al 0.3% disminuyó la proteinuria hasta un 50% en ratas diabéticas, pero respecto a los niveles de glucosa no encontraron efecto significativo, pero concluyen que podría ayudar a reducir las complicaciones de enfermedad (Morales, 2009).

En los estudios antes mencionados, existe evidencia, de su uso para el tratamiento de la diabetes probado en ratas, en esta investigación se pretende realizar un estudio similar, pero sobre el aguamiel, una alternativa de tratamiento contra la diabetes Tipo 2,

3 Justificación

La diabetes es una enfermedad que afecta a millones de personas en el todo el mundo; y en México es una de las principales causas de mortalidad. El costo anual de la atención de la diabetes en México se estima en 77, 440 millones de pesos. La diabetes tipo 2 es la más frecuente entre la población. El principal tratamiento para la diabetes tipo 2 es la dieta y el ejercicio. Sin embargo, generalmente conforme la enfermedad evoluciona, se requiere el uso de fármacos para controlar los niveles de glucosa, presión y otras alteraciones que se presentan en los diabéticos. Por tal razón, se recurre al uso de diferentes tipos de fármacos que se emplean como apoyo para el control de la glucosa en la sangre. No obstante, dado que la resistencia a la insulina coexiste en la diabetes tipo 2, es necesario combinar diferentes fármacos en el tratamiento. Desafortunadamente muchos de estos fármacos tienen un costo elevado. Además, no son 100 % efectivos para la regulación de la glucosa, tienen efectos secundarios indeseables y pueden ser tóxicos para el paciente. En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar nuevos productos que contribuyan al control de la glucosa en las personas diabéticas, que sean más baratos, que logren reducir la glucosa sin necesidad de combinarse con otros productos, que no sean tóxicos y que no tengan efectos secundarios. Actualmente, el uso de productos naturales para el control de la glucosa en personas con diabetes tipo 2 ha surgido como una opción viable. Sin embargo, existen limitados estudios sobre este tema. Recientemente, se han reportado que el aguamiel de maguey tiene propiedades prebióticas y antioxidante y favorece la absorción de minerales. En el centro del país, algunas personas con diabetes refieren que el consumo del aguamiel les ayuda a tener un mejor bienestar ya que al parecer disminuye los síntomas provocados por la diabetes. Sin embargo, no existen evidencias o publicaciones científicas que muestren un posible efecto

terapéutico del aguamiel en personas con diabetes, tampoco sobre su capacidad hipoglucémica en personas con diabetes o bien que muestren que el aguamiel confiere algún efecto en las personas con diabetes que derive en un bienestar físico o fisiológicos. Por lo tanto, surge la necesidad de analizar al aguamiel para determinar su posible potencial como hipoglucemiante en las personas con diabetes Tipo 2. Esto, como una manera de contribuir al desarrollo de una alternativa a los tratamientos con fármacos, el cual muy posiblemente sería más económico que la insulina (lo que podría reducir costos a las gobiernos federales, estatales y municipales), o que el tratamiento en el que se utiliza la combinación de 2 o más fármacos; contribuyendo con esto a una posible mejor calidad de vida para las personas con diabetes.

Además de lo anterior, es importante señalar que la siembra y cultivo del Maguey pulquero en el centro del país, y específicamente en el estado de Hidalgo, está en decremento; por lo que autoridades de la secretaría de agricultura tanto estatales como federales han declarado que esta planta está en el límite para ser considerada como en peligro de extinción en el estado. Aunque por muchos años en la región centro del país (como en el estado de Hidalgo) se ha fomentado la siembra del maguey mediante diferentes programas denominados como “rescate del maguey”, no se ha logrado un incremento importante en el número de plantas adultas. El problema principal por la falta de interés por cultivar el maguey y llevarlo hasta la etapa adulta, es que los productores no reciben una remuneración económica adecuada por estas plantas o por los pocos productos que actualmente se obtiene de ella. Además de la depredación de las pencas, generalmente, por parte de los productores de barbacoa. Por lo que, es necesario el desarrollo de nuevos productos o subproductos del maguey que le confieran un valor agregado atractivo para los productores, lo que conllevó a un incremento importante en la siembra y cultivo del maguey de tal manera que se contribuya a la reforestación y al rescate del maguey.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto hipoglucémico del aguamiel obtenido de *Agave salmiana* en ratas Wistar con diabetes inducida.

4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar fisicoquímicamente el aguamiel natural y pasteurizado
2. Inducir diabetes Tipo 2 a ratas Wistar mediante una dieta hipercalórica y estreptozotocina
3. Evaluar el efecto hipoglucémico del aguamiel en ratas con diabetes tipo 2.
4. Evaluar el efecto del aguamiel sobre el daño pancreático, renal y hepático asociado a la diabetes.

5 Hipótesis

El aguamiel obtenido del maguey pulquero (*Agave salmiana*) tiene efecto hipoglucémico en ratas Wistar con diabetes inducida.

6 Materiales y métodos

6.1 El esquema experimental está dividido en dos apartados principales.

1. Se realizaron pruebas para determinar la temperatura de pasteurización del aguamiel, cuantificación de los parámetros fisicoquímicos del aguamiel natural y pasteurizado (pH, acidez, Brix, sólidos totales, cenizas, proteína), así como la determinación del perfil de fructanos en el aguamiel.
2. Inducción de la diabetes a un grupo de 50 ratas, y la determinación de la capacidad hipoglucémica del aguamiel.

6.2 Material biológico

- Aguamiel de maguey pulquero (*Agave salmiana*).
- Ratas Wistar con un peso de 180-200 g de peso corporal obtenidas del bioterio de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

6.3 Obtención del aguamiel.

Se trabajó con un lote de 10 L de aguamiel; éste se recolectó en septiembre de 2016. El aguamiel se obtuvo directamente de los magueyes y por la mañana (6:30 a.m.); con la finalidad de evitar la fermentación o degradación del aguamiel, este fue recolectado 2 horas después de que la cavidad de los magueyes fue raspada para estimular la liberación de la savia. Así, al momento de la recolección el aguamiel presentó un aspecto ligeramente café, sin turbidez, y sin signos de fermentación. El aguamiel fue recolectado en recipientes estériles de vidrio de 1 litro; los frascos fueron transportados al laboratorio en hieleras que contenían bolsas con gel congelado especial para el transporte de muestras. En el laboratorio, el aguamiel se filtró con

el material denominado como “manta de cielo” para eliminar materia extraña. El aguamiel filtrado se distribuyó en frascos de plástico de 150 mL y se almacenaron en un ultracongelador (Thermo scientific) a una temperatura de -74 °C hasta su uso. El aguamiel fue descongelado en baño maría a 40 °C.

6.4 Pasteurización de aguamiel

Se realizó el proceso de pasteurización mediante baño maría, buscando temperatura y tiempo adecuado de pasteurización (72 °C/20 s, 72 °C/1 min y 63 °C/15 min). Para comprobar la eficiencia de la pasteurización se realizó recuento de bacterias mesófilas aerobias (BMA), mediante la técnica de vertido en placa, utilizando agar para métodos estándar, el conteo de bacterias se realizó a una dilución de 10^{-1} .

6.5 Análisis fisicoquímico del aguamiel

6.5.1 Acidez

Se realizó utilizando el método descrito por la AOAC (1990), método oficial 950.07. Diez mililitros de aguamiel se diluyeron en 100 mL de agua destilada, se adicionó 0.2 mL de fenolftaleína y se realizó una titulación con NaOH 0.1 N. Se registro el volumen de NaOH que se requirió para la aparición de un color rojo rosado permanente.

6.5.2 Determinación de pH

Se realizó mediante el método de la A.O.A.C (1990), método oficial 945.10. Se tomó una alícuota de aguamiel bajo condiciones asépticas, y se midió el pH utilizando el sistema de electrodo de referencia/pH, siguiendo las instrucciones del fabricante. El equipo se calibró con soluciones buffer de pH 4 y 7.

6.5.3 Determinación de proteína

Se utilizó el método 920.105 de la AOAC (1995). Dos gramos de aguamiel se colocaron en tubos de digestión, se agregó 10 mL de ácido sulfúrico a cada tubo y una pastilla catalizadora de sulfato de sodio-cobre. Los tubos se introdujeron en el digestor y la reacción se mantuvo durante 1.25 h. Después, los tubos se dejaron a temperatura ambiente y el contenido se transfirió a un destilador Kjendal. El factor de conversión utilizado fue de 6.25.

6.5.4 Determinación de sólidos solubles totales (SST).

Se realizó de acuerdo con lo descrito por la AOAC (1990). Se colocaron 2 g de aguamiel en charolas de aluminio y se introdujeron en una estufa a 90 °C / 4 h para llegar hasta peso constante. Los resultados fueron obtenidos por diferencia de peso.

6.5.5 Determinación de cenizas

Se realizó mediante lo descrito por la AOAC (1990) método 14.006. Se colocaron 2 g de aguamiel en un crisol (previamente puesto a peso constante), se precalentó la muestra en placa calefactora y posteriormente se colocó en una mufla y se incinero a 600 °C hasta obtener cenizas blancas; se dejó enfriar en desecador y se pesó. Los resultados se obtuvieron mediante gravimetría.

$\% \text{ de cenizas totales} = (\text{g de cenizas} / \text{g de muestra}) \times 100.$

6.5.6 °Brix

Se tomó una muestra directa de aguamiel y se midió con un refractómetro digital AR200 marca Reichert® Analytical Instruments.

6.6 Análisis de fructanos

6.6.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

Se realizó de acuerdo con lo descrito por Mellado-Mojica & López (2012); Un μL de aguamiel se colocó en una placa de TLC de silica gel con soporte de aluminio. La placa de TLC se depositó en una mezcla de disolventes de butanol/propanol/agua (3:12:4 por volumen) (Kanaya, Chiba, & Shimora, 1978), y a las placas de TLC se le agregó una mezcla de anilina/difenilamina/ácido fosfórico en acetona para revelar las bandas de fructanos.

6.7 Efecto del consumo de aguamiel de maguey en ratas diabéticas

Este estudio se realizó en el Bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. El protocolo científico se presentó ante el Comité Institucional Ético para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CIEQUAL), obteniendo la aprobación para el desarrollo de los experimentos con aguamiel en las ratas Wistar.

6.7.1 Mantenimiento de los animales

Se utilizaron ratas machos Wistar, con un peso inicial de 180 a 200 g. Los animales se alojaron en jaulas individuales en el bioterio, bajo condiciones de temperatura controlada de 22 ± 2 °C, con un ciclo invertido de 12 h de luz/oscuridad, con alimento estándar (Formulab Chow) que contenía 12% de humedad, 23% de proteína, 6.5% de grasa, 4% de fibra y 8% de cenizas.

6.7.2 Inducción de diabetes

Para la inducción de la diabetes en las ratas primero se les provocó obesidad y posteriormente la diabetes (Figura 1). Para la obesidad se les proporcionó una dieta hipercalórica a base de alimento estándar y manteca de cerdo, y se adicionó vitaminas y minerales. Una vez que las ratas alcanzaron un peso de 380 ± 20 g, se indujo la diabetes con estreptozotocina (Sigma-Aldrich, Toluca, México); el compuesto se administró vía intraperitoneal a 40 ratas a una dosis

de 35 mg/kg de peso corporal, previo ayuno nocturno de 8 horas. Para la preparación de la estreptozotocina (STZ), esta se disolvió en una solución amortiguadora de citrato 0.1 M a pH 4.5, la solución se preparó minutos antes de la administración. Cuatro días después de la administración se cuantificó la glucosa en sangre. Se consideraron como ratas diabéticas a aquellos animales que presentaron una concentración de glucosa mayor a 180 mg/dL.

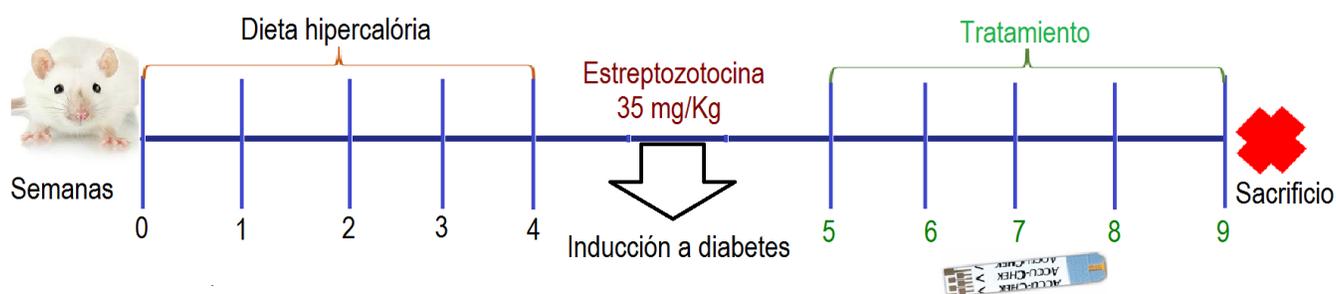


Figura 1. Diagrama experimental

6.7.3 Determinación de glucosa sanguínea en ayuno

La glucosa en ayuno se cuantificó utilizando un glucómetro marca Accutrend Plus, el cual tiene un rango de sensibilidad de 20 a 600 mg/dL de glucosa, con un tiempo de medición de 12 segundos y empleando tiras reactivas Accutrend glucose. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena caudal de las ratas en un estado de ayuno de 8 h.

6.7.4 Evaluación hipoglucémica del aguamiel

Para este estudio se utilizaron 50 ratas, de las cuales, 10 no fueron inducidas a diabetes (grupo sano) el resto de las ratas diabéticas fueron divididas como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Grupos experimentales para la evaluación del efecto del aguamiel en ratas diabéticas.

Grupo	Ratas	Tratamiento
CC	Sanas (n=6)	Ninguno
CP	Diabéticas (n=6)	Control positivo. Recibieron hipoglucemiante oral (glibenclamida) a lo largo del tratamiento
CN	Diabéticas (n=6)	Control negativo. No recibieron ningún tratamiento.
AP	Diabéticas (n=6)	Aguamiel pasteurizado, a una dosis de 11 mL.
AN	Diabéticas (n=6)	Aguamiel sin pasteurizar, a una dosis de 11 mL

Durante los 28 días que duró el tratamiento, a las ratas se les monitoreo glucosa cada semana; y diariamente se monitoreo ingesta de alimento, consumo de agua, ganancia/ pérdida de peso corporal, comportamiento conductual, piloerección y sobrevivencia. Al finalizar el tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante punción cardiaca, previa insensibilización en cámara de CO₂, y dislocación cervical. Se obtuvieron muestras de hígado, riñón y páncreas, los cuáles fueron fijados en formol al 10 % hasta su análisis.

6.7.5 Determinación cuantitativa de colesterol total

Para estas determinaciones se utilizó el suero sanguíneo, previamente recolectado después del sacrificio de las ratas. La medición se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, SPINREACT CHOLESTEROL-LQ.

El reactivo utilizado consistió en PIPES pH 6.9 (90 mmol/L), fenol (26 mmol/L), colesterol esterasa (CHE, 1000 U/L), colesterol oxidada (CHOD, 200 U/L), peroxidasa (POD, 650 U/L) y 4 aminofenaza (4-AF, 0.4 mmol/L), así mismo se utilizó un patrón primario de colesterol. Primeramente, se pipeteo el blanco de reactivos, posteriormente la muestra patrón (reactivo

más patrón), y finalmente las muestras (reactivo más muestra). Se mezcló y se incubó 5 min a 37 °C, se leyó la absorbancia a 505 nm del patrón y de la muestra, frente al blanco de reactivo.

6.7.6 Determinación de Triglicéridos

Se realizó con kit enzimático SPINREACT TRIGLYCERIDES-LQ, para ello se utilizaron las muestras de suero sanguíneo, se utilizó reactivo y estándar listos para su uso, se utilizó un blanco de reactivo, solución patrón y la muestra, todos se leyeron a una longitud de onda de 505 nm, previa incubación a 37 °C por 5 min. El cálculo de triglicéridos se realizó de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\frac{(A)Muestra - (A)Blanco}{(A)Patrón - (A)Blanco} \times \text{Conc. Patrón} = \text{mg/dL de triglicéridos en la muestra}$$

6.7.7 Determinación de Colesterol HDL

Se realizó mediante un kit enzimático, siguiendo las instrucciones del fabricante SPINREACT HDL COLESTEROL D. Se utilizó plasma sanguíneo, dos reactivos listos para usarse (R1 y R2) y una muestra estándar HDLc. Se preparó un blanco con el reactivo R1, el calibrador (reactivo y estándar) y las muestras (reactivo 1 más muestra), se mezcló y se incubó 5 min a 37 °C y se leyó su absorbancia a 570 nm (A1), posteriormente se añadió en todos los casos el reactivo R2, se mezcló e incubó 5 min a 37 °C se leyó su absorbancia a 570 nm (A2). Para el cálculo de HDL, se utilizó la siguiente fórmula.

$$\frac{(\Delta A)Muestra}{(\Delta A)Calibrador} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{mg/dL de HDL colesterol en la muestra}$$

6.8 Análisis histológico a páncreas, hígado y riñón.

Posterior al sacrificio de los animales, se recolectaron los órganos, iniciando con el páncreas, posteriormente se recolectó el hígado y por último el riñón derecho, los tres órganos se lavaron para eliminar la sangre y se fijaron en formol al 10%. Después de una semana se analizaron los

órganos; se realizaron pequeños cortes de los mismos y se prepararon en histocassetts, deshidratándose en el equipo MICROMM (procesadora anatómica de tejidos, modelo Leica TP1020), posteriormente, se introdujeron en parafina para poder llevar a cabo los cortes. Para realizar los cortes se utilizó un micrótopo marca Leica RM 2125RT, los cortes se realizaron a 4 micras, en un ángulo de 3.5, los cortes obtenidos se colocaron en flotación en baño maría a una temperatura de 40 °C, posteriormente se secaron a 60°C, para fijar la muestra y eliminar la mayor cantidad de parafina.

Una vez terminado este procedimiento, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, y se realizó una limpieza con xilenos, para posteriormente deshidratarlos con alcoholes de mayor a menor concentración (100%-70%), se enjuagó en agua, seguidamente se realizó la tinción con hematoxilina, con el objetivo de teñir el núcleo de las células, se eliminó el exceso de hematoxilina y se realizó una segunda tinción, ahora con eosina, esto con el objetivo de teñir el citoplasma, se siguió con lavados en alcoholes de menor a mayor concentración (70%-100%), y se terminó con xilenos. Por último, se fijó con resina sintética y cubre objetos para observar en microscopio óptico marca Olympus, donde se observaron los cambios, para finalizar se utilizó un microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX41, donde se realizó la toma de fotografías a una magnitud de 400X.

6.9 Análisis estadístico

Los resultados del análisis proximal del aguamiel fueron expresados como la media + la desviación estándar (DE) de cada experimento con tres repeticiones cada uno. Para el efecto del consumo de aguamiel en ratas diabéticas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba Tukey para la comparación entre los grupos. Se empleó un nivel de

significancia de $P < 0.05$, con un nivel de confianza del 95%. Todo el análisis estadístico fue realizado en el programa IBM SPSS Statistics 20.

7 Resultados y discusiones

7.1 Pasteurización de aguamiel

Como todos los alimentos crudos, el aguamiel presenta una microbiota específica y determinada, la cual proviene del mismo medio en donde se obtiene la savia. Parte de esta microbiota fermenta los azúcares y produce alcohol y otros microorganismos producen polímeros dando como resultado el pulque. El proceso de fermentación y formación de polímeros (degradación o transformación) a partir del aguamiel puede ocurrir incluso dentro de la misma cavidad del maguey si el aguamiel no es retirado. El proceso de fermentación o degradación del aguamiel es relativamente rápido (Olvera *et al.*, 2015). Como la finalidad del estudio no era la producción del pulque sino el utilizar el aguamiel, este se colectó como máximo 2 horas después de que la cavidad de los magueyes productivos fue raspada; y el producto se transportó bajo refrigeración. En el laboratorio se diseñó un experimento procedimiento para eliminar a los microorganismos deterioradores o fermentadores del aguamiel para tener un producto estable para su posterior uso en los estudios con las ratas. El aguamiel natural o crudo presentó una concentración de bacterias mesófilas aerobias (BMA) de $9,860 \pm 140$ UFC/mL. En la

Tabla 6 se presentan las temperaturas y tiempos de tratamiento del aguamiel junto a el recuento de UFC/mL. Con los tratamientos a 72°C por 20 s y por 1 min se logró reducir la concentración de BMA a un nivel de 10 UFC/mL y no detectable (0 UFC/mL). En adelante se decidió pasteurizar el aguamiel a 72 °C por 1 minuto. En la tabla 6 se puede observar que entre más alta la temperatura de tratamiento es menor el tiempo que se requiere para reducir la

concentración de microorganismos. Posteriormente, tanto el aguamiel natural como el pasteurizado se conservaron en congelación hasta su uso.

Tabla 6. Temperaturas de tratamiento del aguamiel

Temperatura de pasteurización	Tiempo de pasteurización	UFC/mL
72°C	20 s	10±0.00 ^a
	1 min	0
63°C	15 min	100±10 ^b

Cada valor representa la media ± desviación estándar de tres determinaciones independientes. Medias en columnas con diferentes letras indican diferencia significativa por la prueba de Tukey, (P<0.05). (UFC/mL recuento en placa en medio de cultivo cuenta estándar)

7.2 Análisis fisicoquímico de aguamiel

Los resultados del análisis proximal para el aguamiel de *Agave salmiana* pasteurizado y natural se presentan en la Tabla 7. Se puede observar que el aguamiel no sufre ningún cambio estadísticamente significativo en el contenido de proteína por efecto del tratamiento térmico. No obstante, sí se observaron cambios estadísticamente significativos para el contenido de cenizas y sólidos solubles; los valores aumentaron en el aguamiel pasteurizado. En un estudio realizado por Muñiz-Márquez *et al.*, (2015), en donde usaron temperaturas de esterilización (121 °C por 15 minutos), para jarabe de agave, estos investigadores no encontraron diferencias estadísticamente significativas sobre los resultados de proteína, cenizas y sólidos solubles, concluyendo que la aplicación de temperatura al aguamiel no afecta el contenido de proteína, siendo este parámetro, uno de los más importantes en el aguamiel.

En nuestro estudio, una explicación sobre la diferencia observada en el contenido de ceniza y sólidos totales entre el aguamiel natural y el pasteurizado es que durante el tratamiento térmico

se perdió agua por vaporización (debido a la forma en cómo se realizó la pasteurización) de tal manera que los compuestos solubles e insolubles se concentraron; por lo que al realizar las determinaciones, las muestras del aguamiel pasteurizado desde el inicio presentaban ya un mayor contenido de algunos de sus componentes.

Tabla 7. Análisis químico proximal de aguamiel natural y pasteurizado

Aguamiel	Proteína	Cenizas	Sólidos Solubles
Pasteurizado	0.37±0.005a	0.39±0.01a	12.96±0.03a
Natural	0.37±0.005a	0.33±0.02b	12.69±0.02b

Cada valor representa la media ± desviación estándar de tres determinaciones independientes. Medias en columnas con diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa por la prueba de Tukey, (P<0.05).

Es importante resaltar que el contenido de proteína en el aguamiel analizado resulto ser similar al reportado por Ramírez (2010), el cual fue de 0.332 (%p/v) para aguamiel de *Agave salmiana*. Algunos autores reportan que la composición del aguamiel varía de acuerdo con la especie de agave, época del año, las condiciones climáticas y otros factores (Ortiz-Basurto *et al.*, 2008).

En la Tabla 8 se muestran valores de pH y acidez, para el aguamiel natural y pasteurizado. Los valores de pH y de acidez son mayores para el aguamiel pasteurizado; esto se puede deber a que en el aguamiel natural los microorganismos han iniciado el proceso de fermentación, lo que provoca que estos niveles disminuyan. Respecto al contenido de °Brix para aguamiel natural fue de 13.4 y para pasteurizado de 13.6.

Tabla 8. pH y acidez titulable y para aguamiel pasteurizado y natural

Aguamiel	pH	Acidez titulable (%)
Pasteurizado	6.58±0.00	0.50±0.00
Natural	5.8±0.00	0.30±0.00

Muñiz-Márquez et al., (2015), reportaron un contenido de °Brix de 9.67 y 10.60 para jarabe de agave estéril y natural, respectivamente; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

7.2.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

Para la identificación cualitativa de azúcares de aguamiel, se utilizó el análisis de cromatografía en capa fina (TLC). En la Tabla 9 se ejemplifica la distribución de las muestras de aguamiel y estándares en el TLC. Se analizaron 5 muestras de aguamiel con la finalidad de identificar los principales compuestos y la variabilidad entre ellas. Se usó 1 microlitro de solución estándar de FOS (glucosa-fructosa, sacarosa, kestosa, nistosa y DP 5) y se colocó en los carriles 1 y 13; en los carriles 2 y 14 se colocó 1 microlitro de estándar de MOS (glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetrosa, maltopentosa, maltohexosa, maltoheptosa).

En la Figura 2 se muestra el TLC de las 5 muestras de aguamiel; se observa que el aguamiel contiene en todos los casos glucosa y fructosa, y en mayor proporción sacarosa. El único FOS que se observa en todas las muestras es la 1-kestosa. Los disacáridos que se pudieron distinguir en las placas de TLC fueron la maltotriosa, maltopentosa y maltoheptosa.

Tabla 9. Distribución de las 5 muestras de aguamiel en el TLC

Muestra de aguamiel	Carril en TLC	
	Aguamiel sin diluir (1µL)	Aguamiel diluido 1:10 (1µL)
AM1	3 y 8	15 y 20
AM2	4 y 9	16 y 21
AM3	5 y 10	17 y 22
AM4	6 y 11	18 y 23
AM5	7 y 12	19 y 24

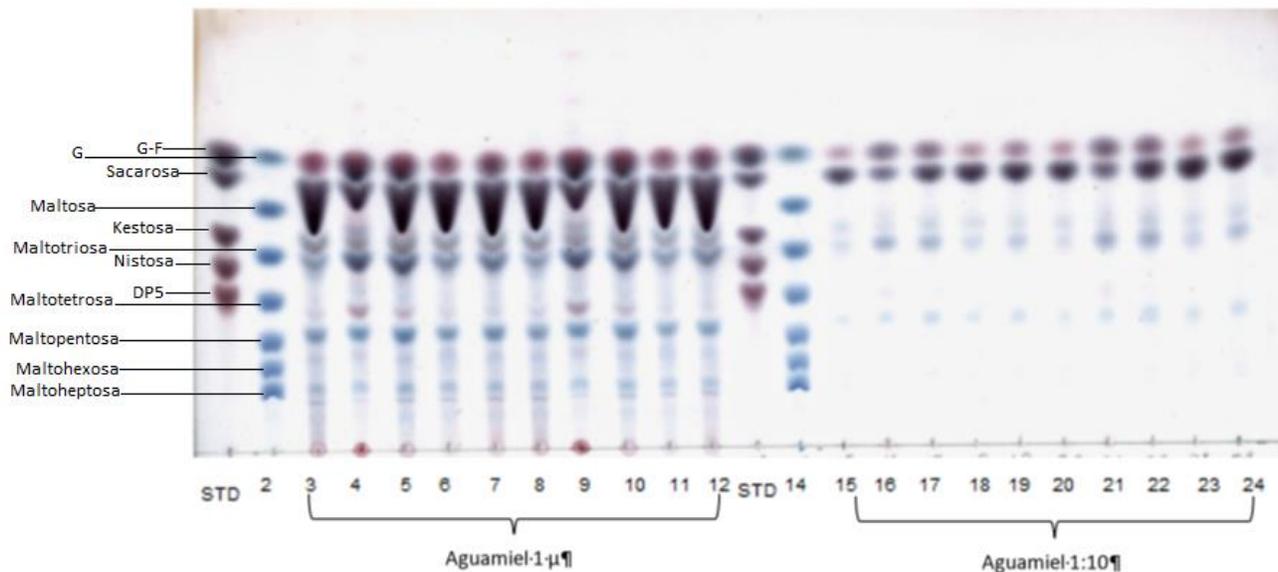


Figura 2. TLC de 5 muestras de aguamiel de *A. salmiana* (2-12(1µL) y 15-24(1:10)), con 2 repeticiones cada una. En los carriles 2 y 14 se encuentran estándares de FOS y un estándar de MOS.

Como se puede observar el aguamiel de estudio es complejo ya que se pueden notar otras bandas de carbohidratos que no son fructanos y que valdría la pena analizar. En un estudio similar realizado por Muñiz-Márquez *et al.* (2015), en el jarabe de agave encontraron fructosa, glucosa y kestosa, mediante un estudio de TLC. En otro estudio realizado por López *et al.* (2003), demostraron que los fructanos presentes en agave no son tipo inulina, sino mezclas complejas de fructooligosacáridos y fructanos que contienen enlaces β (2-1) y β (2-6). Mientras que en otro estudio Mellado-Mojica & López (2012) estudiaron la piña de *A. tequiliana* weber variedad azul y encontraron fructanos, sacarosa, fructosa, glucosa y almidón como carbohidratos más abundantes; y en el estudio por cromatografía en capa fina, demostraron que las plantas de 2-5 años almacenaban principalmente fructooligosacáridos. Los FOS son

compuestos bioactivos con importantes efectos benéficos que favorecen una buena absorción de minerales en el cuerpo, regulan los niveles de glucosa y colesterol en la sangre y la actividad más importante es la inducción de crecimiento de microorganismos probióticos en el tracto intestinal (Muñiz-Márquez *et al.*, 2016).

En nuestro estudio se observaron carbohidratos tipo FOS y MOS, los que sería importante estudiar en que cantidad están presentes y cuáles son los otros carbohidratos que no se pudieron identificar.

En la Figura 3 se muestra el perfil de carbohidratos obtenido mediante TLC para el aguamiel pasteurizado, aguamiel natural y estándares de FOS (glucosa-fructosa, sacarosa, 1-kestosa, nistosa y DP5). En este TLC, lo más importante de notar es la diferencia que existe ente el aguamiel pasteurizado y el aguamiel natural; se observó que el aguamiel que recibió tratamiento térmico presenta mayor contenido de sacarosa. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Muñiz-Márquez *et al.* (2015), donde observaron que el jarabe de agave sometido a un proceso de esterilización (15 libras/121°C/ 15 minutos) presentó cambios en el contenido de azúcares. Se encontró que la sacarosa estuvo presente en mayor concentración después de la esterilización; los análisis fueron realizados por TLC y HPLC. En un estudio realizado por Leal-Díaz *et al.*, (2016) en aguamiel concentrado, encontraron una alta concentración de carbohidratos disponibles (43%), principalmente de sacarosa (44.4%), glucosa (29.1%) y fructosa (26.5%).

Cabe señalar que en los dos estudios anteriores se observó la presencia de kestosa, al igual que se detectó en las muestras de aguamiel que analizamos. Se ha reportado que la kestosa tiene efecto prebiótico por lo que puede tener efectos benéficos para la salud (Muñiz-Márquez *et al.*, 2015).

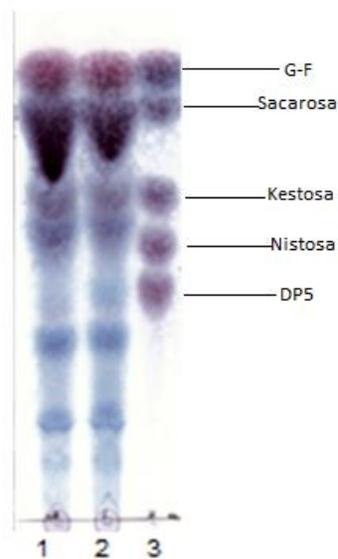


Figura 3. TLC de aguamiel pasteurizado (1), aguamiel natural (2) y estándar de FOS (3).

Este primer estudio sobre la identificación de compuestos del aguamiel es muy importante ya que es la base para identificar compuestos con posible valor nutricional y para poder definir al aguamiel como una bebida funcional. Se han realizado pocos estudios sobre el efecto biológico del aguamiel; dentro de ellos podemos destacar el realizado por Tovar-Robles *et al.* (2011) en donde, después de estudios aplicados a conejos, proponen al aguamiel como un producto nutracéutico que puede ayudar a reducir las deficiencias de hierro.

7.3 Efecto del consumo de aguamiel en las ratas

7.3.1 Efecto de aguamiel sobre peso corporal

Desde el inicio todos los animales fueron alimentados con una dieta hipercalórica para conseguir una ganancia de peso acelerada. En la Tabla 10 se presenta la ganancia y/o pérdida de peso de las ratas Wistar desde el día en que se recibieron las ratas hasta el día en que se

realizó el sacrificio. En este periodo se incluye la etapa en la que las ratas de indujeron a la diabetes, y su posterior comportamiento como ratas diabéticas.

Tabla 10. Ganancia y/o pérdida de peso a lo largo del tratamiento en ratas sanas y diabéticas.

Grupos	Semanas										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Fin
CC	24.66±13. 8c	49±8.41 d	41±20.92 c	29.66±8.28 c	34.33±20.6 1cd	-0.833±2.4 ab	11.66±12.7 8a	22.33±15.4 7ab	17.5±6.97a b	10.83±7.9 ab	11.16±2.78 b
CN	45.33±8.6 8c	54.33±7 d	33±15.21 c	25.83±4.07 c	36.16±7.54 cd	5.33±6.18a b	7.66±10.98 a	3.33±22.34 ab	-11±41.06 ab	24.5±44.46 ab	10.16±3.06 b
CP	33±12.24 c	53.5±14.62 d	27.83±12.4 8c	24.83±8.68 c	43.5±7.44 cd	-4.5±2.25 ab	10.83±11.3 3a	9.33±26.74 ab	13.5±6.28 ab	-4.33±9.75 ab	2.16±4.66 b
AN	42.33±9.0 2c	43.33±8.86 d	42.66±40.8 1c	11.5±39.37 c	32.33±12.0 4cd	-3.83±4.07 ab	-11.5±8.5 a	12.16±35.5 8ab	7.83±21.71 ab	2±11.36 ab	6.83±6.91 b
AP	37.66±10. 15c	54.33±3.98 d	21.66±15.8 3c	40.33±14.3 8c	48.83±8.18 cd	-9.66±2.8 ab	17.66±18.9 2a	3.5±24.99a b	1.33±10.57 ab	0.66±5.04 ab	9.5±9.07 b

Cada valor representa la media ± desviación estándar de seis determinaciones independientes. Medias en columnas con diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Tukey, (P<0.05) (CC; Control sano, CN; Control negativo, CP; Control positivo, AN; Aguamiel Natural, AP; Aguamiel pasteurizado).

Cabe señalar que también en la tabla se incluyen el comportamiento de las ratas control normal, es decir el grupo al que no se le indujo la diabetes y fueron alimentadas con una dieta normal.

En la semana 0, que fue donde todas las ratas recibieron dieta normal por la adaptación al ciclo invertido que se les impuso, no se muestran diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos. De la semana 1 a la 4, todos los grupos tuvieron una ganancia significativa de peso. De e la semana 0 hasta el fin del tratamiento el grupo CC tuvo ganancia de peso, debido a que estaban en etapa de crecimiento; mientras que los demás grupos tuvieron un comportamiento de pérdida y ganancia de peso, ganancia en las primeras semanas debido a su desarrollo fisiológico y a la dieta hipercalórica y pérdida de peso de la semana 5 en adelante debido a la inducción a diabetes y el desarrollo de la enfermedad. El estado más avanzado y peligroso de la diabetes se debe a la cetosis. El problema inicia con una lipólisis descontrolada que disminuye los depósitos de triacilglicéridos en el tejido adiposo, causando pérdida de peso, aumento de ácidos grasos en sangre y oxidación de éstos en el hígado (Laguna *et al.*, 2013).

Se inició con un peso promedio de las ratas de 176 g, y al momento de la inducción a diabetes se tuvo un peso promedio de 358 gramos. Se logró inducir al 65% de las ratas a la diabetes. Este modelo de inducción a la diabetes en las ratas que consistió en alimentarlas con dieta alta en grasa y posteriormente inyectarlas con estreptozotocina, es ampliamente utilizado. En este modelo se trata de semejar la progresión natural y los cambios que se producen gradualmente en el metabolismo de las personas que desarrollan diabetes Tipo 2 (Radenkovic´, Stojanovic´, & Prostran, 2016). Srinivasan *et al.* (2005), realizaron un estudio similar, trabajando con ratas Sprague-Dawley macho. En ese estudio la dieta consistió en 58% de grasa, 17% de carbohidratos y 25% de proteínas, la dieta se administró durante dos semanas y posteriormente se administró una dosis de 35 mg/kg de estreptozotocina vía intraperitoneal. Se concluyó que

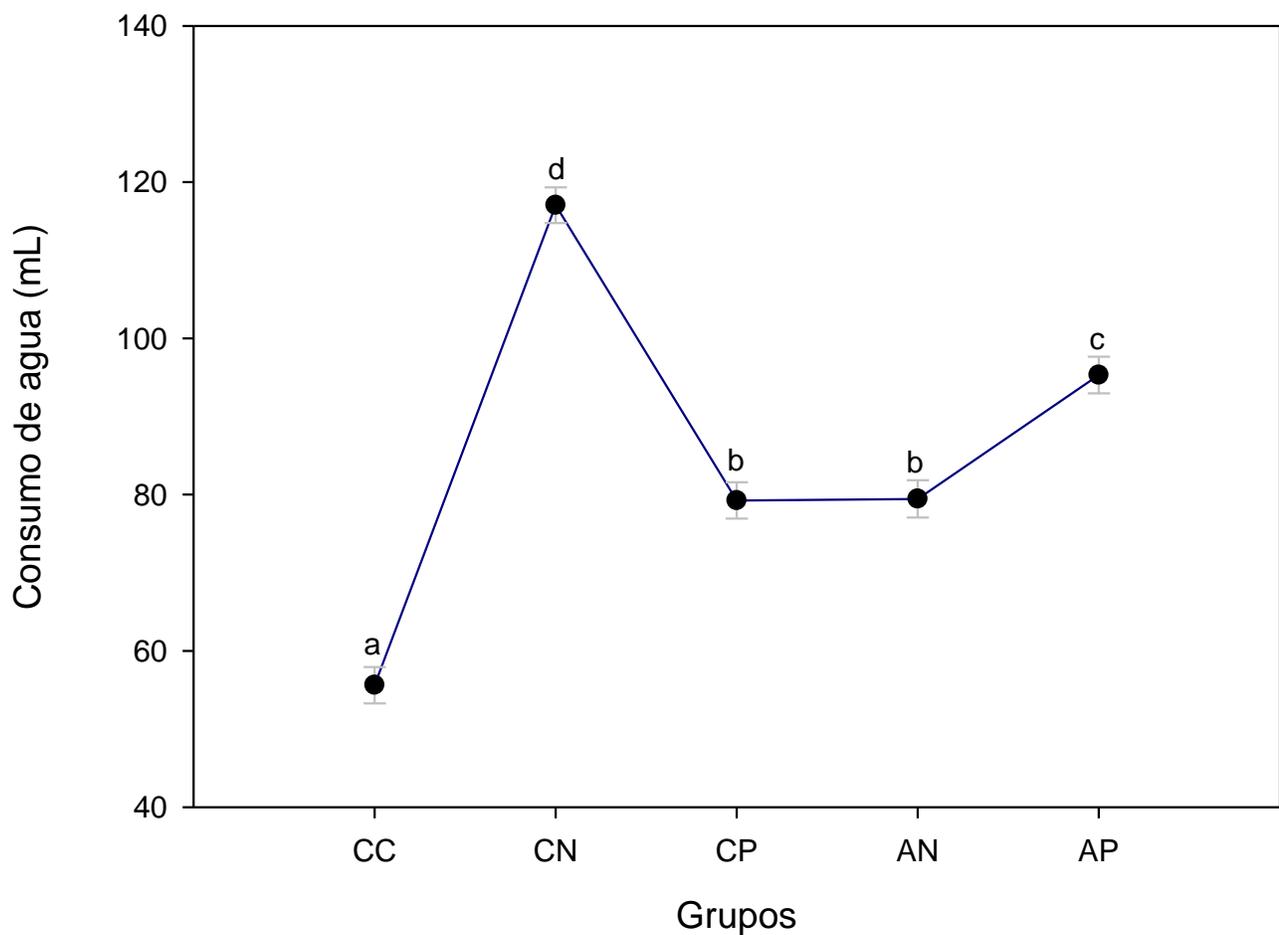
la combinación de una dieta alta en grasas junto con una inyección a dosis baja de estreptozotocina, sirve como un modelo alternativo para la inducción de diabetes Tipo 2. En otro estudio Zhang *et al.* (2008), alimentaron ratas Wistar macho con una dieta rica en grasas durante 4 semanas y posteriormente recibieron inyección doble de estreptozotocina con dos semanas de diferencia. Se tuvo una tasa de inducción a la diabetes del 85%.

El modelo de inducción a la diabetes utilizado en nuestro estudio tuvo una tasa de éxito del 65%; por lo que se considera como un modelo adecuado para el desarrollo de la diabetes tipo 2 en las ratas que se usaron en los estudios con el aguamiel.

Respecto al comportamiento conductual, se pudo observar que una vez que las ratas adquirieron la diabetes, empezaron a mostrarse agresivas y a orinar en mayor cantidad; la orina presentó un olor intenso. De acuerdo con Laguna *et al.* (2013), los síntomas y signos de la diabetes son poliuria (aumento en la producción de orina), polidipsia (aumento en la sed), polifagia (hambre), pérdida de nitrógeno, cetosis y pérdida de peso.

De acuerdo con el consumo de agua, se presentan los resultados en la Gráfica 1. Se muestran los grupos de ratas contra el consumo de agua promedio en mililitros; primeramente, se observa al grupo control (CC), las cuales eran ratas sanas y su consumo de agua promedio puede usarse para representar lo que consume el animal en condiciones normales (55 mL/día). El grupo control negativo (CN), consumió cerca de los 120 mL/día; a este consumo excesivo de agua se le denomina polidipsia. En condiciones normales, la glucosa sanguínea se reabsorbe en su totalidad al nivel de las nefronas donde se depura la sangre. Sin embargo, cuando los niveles de glucosa en la sangre rebasan la capacidad de reabsorción en el riñón (una cifra de alrededor de 180 mg/dL de glucosa en sangre), se elimine glucosa por la orina (glucosuria) para

compensar la hiperglucemia lo cual arrastra consigo agua, generando el síntoma de poliuria. A su vez, la pérdida de agua es la causante de la polidipsia (Laguna *et al.*, 2013). De acuerdo con la Gráfica 1, se observa que los grupos control positivo (CP) y el que recibió tratamiento con aguamiel natural (AN), estabilizaron su consumo de agua prácticamente a 80 mL/día, y no se observó diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos.



Gráfica 1. Consumo diario de agua (mL) a lo largo del tratamiento por los diferentes grupos de ratas (CC; Control sano, CN; Control negativo, CP; Control positivo, AN; Aguamiel Natural, AP; Aguamiel pasteurizado).

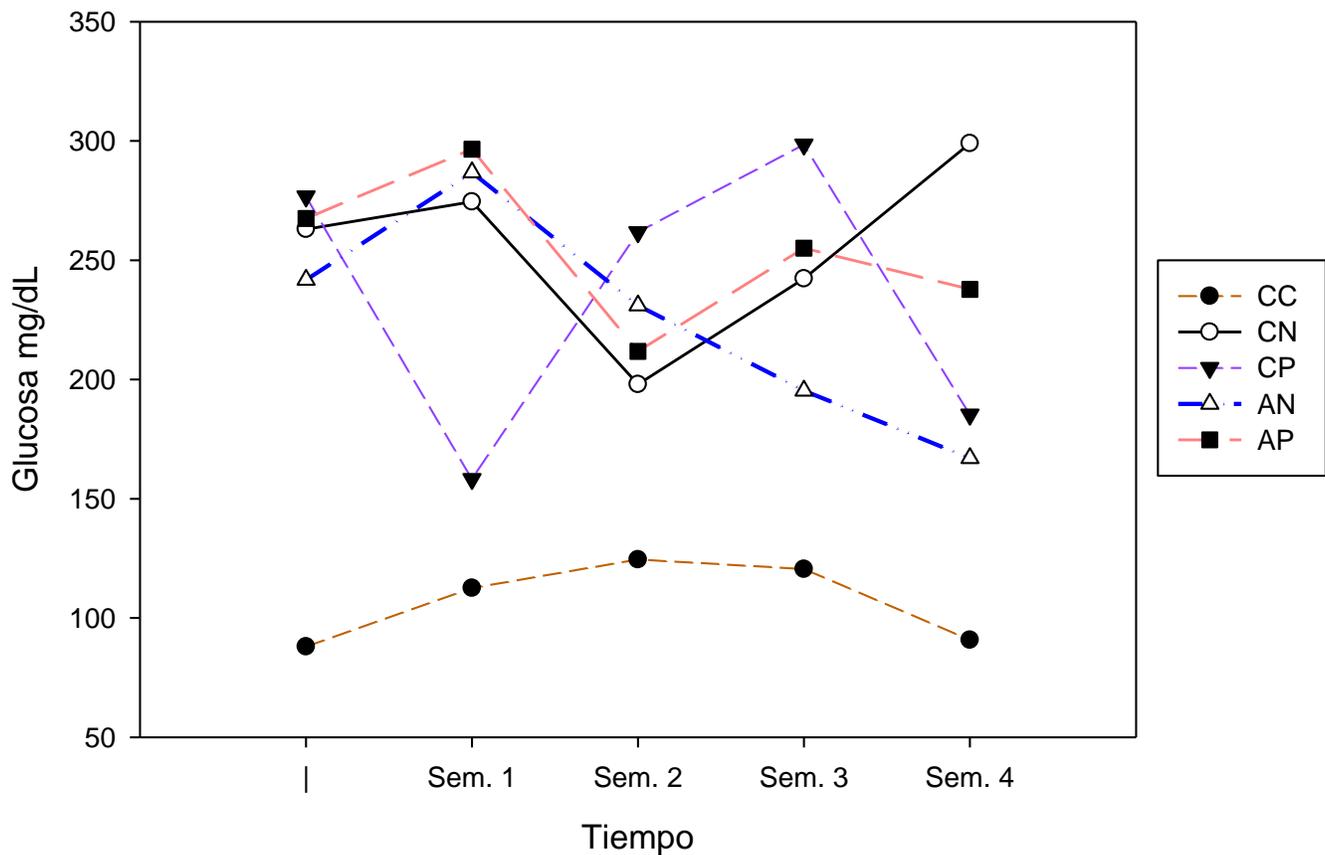
7.3.1 Evaluación hipoglucemiante del aguamiel

Los niveles de glucosa obtenidos tanto en las ratas diabéticas sometidas a los diferentes tratamientos como en las no diabéticas (CC) se presentan en la Tabla 11 y en la Gráfica 2. Los valores de glucosa en las ratas estuvieron entre 60 a 350 mg/dL desde el inicio de los tratamientos y hasta el final. En el grupo CC los niveles de glucosa oscilaron entre los 70 y 120 mg/dL. Todos los grupos diabéticos iniciaron con una glucosa en sangre de alrededor de 250 mg/dL, se puede observar que durante la primera semana de tratamiento la glucosa en sangre aumento para los grupos AP, AN y CN, al notar este cambio en los grupos que recibieron aguamiel se decidió duplicar la dosis de aguamiel de 5.5 a 11 mL por rata.

Tabla 11. Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de los grupos de ratas a lo largo del tratamiento

Tiempo	CC	CN	CP	AN	AP
Sem. 0	88±15.38a	263±75.53b	276.75±36.85b	241.75±74.32b	267.5±61.58b
Sem. 1	112.5±22.35a	274.5±113.4b	158.25±35.31b	286.75±115.09b	296.5±63.34b
Sem. 2	124.5±10.21a	198±110.23b	261.75±76.03b	231±69.02b	211.75±47.47b
Sem. 3	120.5±17.71a	242.25±83.33b	298.5±107.11b	195.25±58.46b	255±32.38b
Sem. 4	90.75±24.10a	299±94.45b	185.25±30.08b	167±54.04b	237.75±14.63b

Cada valor representa la media \pm desviación estándar de seis determinaciones independientes. Medias en filas con diferentes letras indican diferencia significativa por la prueba de Tukey, ($P < 0.05$). (CC; Control sano, CN; Control negativo, CP; Control positivo, AN; Aguamiel Natural, AP; Aguamiel pasteurizado).

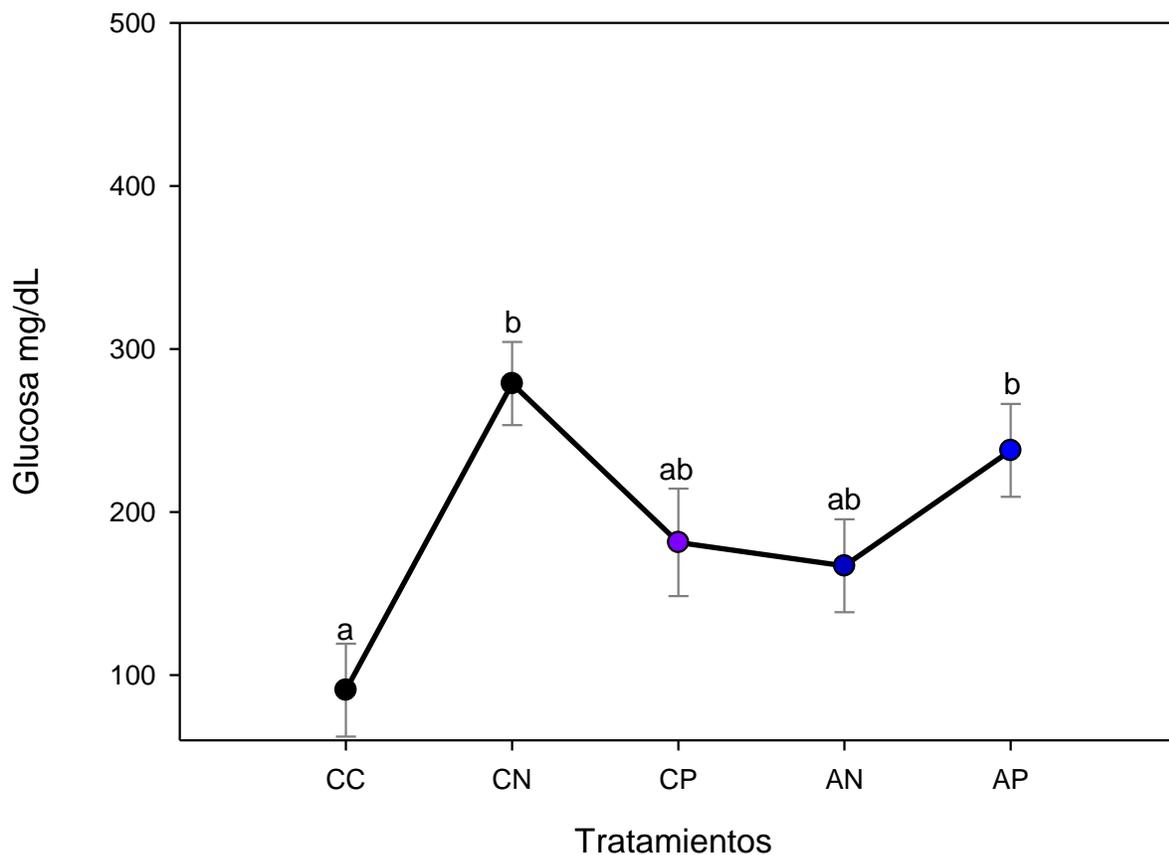


Gráfica 2. Concentración de glucosa en sangre de los diferentes grupos de ratas durante las 4 semanas de tratamiento (CC; Control sano, CN; Control negativo, CP; Control positivo, AN; Aguamiel Natural, AP; Aguamiel pasteurizado).

En la segunda semana se observó una disminución de la glucosa en los grupos que recibieron aguamiel, pero en la semana 3 y 4, el grupo que recibió aguamiel pasteurizado, incremento ligeramente sus niveles de glucosa, mientras que el grupo que recibió aguamiel natural tuvo una tendencia a disminuir glucosa hasta 167 mg/dL. El grupo CN, mostro una tendencia de glucosa no controlada, como se observa en la gráfica 2, terminando con niveles cercanos a los 300 mg/dL. Respecto al grupo que recibió glibenclamida, en la primera semana de tratamiento se observó una disminución de glucosa, pero en la semana 2 y 3 se mostró un incremento; para la semana 4 se notó nuevamente una disminución. Este comportamiento poco controlado del

medicamento se puede deber a que la glibenclamida es útil en los estadios de diabetes tipo 2 en los cuales las células β poseen reservas de insulina, sin embargo, cuando el daño por la hiperglucemia se ha extendido y afectado por la producción de ésta, el uso de glibenclamida resulta poco eficaz (Laguna *et al.*, 2013).

En la Gráfica 3 se presentan los resultados de glucosa en sangre en la última semana de tratamiento; se observa que el grupo CC presento niveles normales de glucosa (alrededor de 80 mg/dL), el grupo CN término con niveles de glucosa cercano a los 300 mg/dL, el grupo AP por arriba de 200 mg/dL, y los grupos CP y AN con niveles por debajo de los 200 mg/dL, no existió diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CP, AN y CC.



Gráfica 3. Concentración de glucosa en sangre de los 5 grupos de ratas en la cuarta semana de tratamiento (CC; Control sano, CN; Control negativo, CP; Control positivo, AN; Aguamiel Natural, AP; Aguamiel pasteurizado).

Con base en estos resultados, se puede decir, que tanto el aguamiel natural como el pasteurizado mostraron un efecto hipoglucémico igual que el fármaco administrado. No obstante, el efecto del aguamiel que recibió tratamiento térmico fue ligeramente menor que el observado con el aguamiel natural. Es posible que los componentes del aguamiel que participan o provocan el efecto hipoglucémico hayan sufrido algún daño al aplicar el tratamiento térmico. En tal caso, es necesario realizar estudios semejantes valorando ahora el efecto del tratamiento térmico (y otros factores como el pH, por ejemplo) en el efecto hipoglucémico del aguamiel.

Como se observó en la Figura 2, el aguamiel tiene diversos componentes por lo que al momento no se sabe cuál de ellos ocasionó el efecto hipoglucémico en las ratas diabéticas. Rendon-Huerta *et al.* (2012), analizaron el efecto de fructanos de *Agave angustifolia ssp. tequilana* sobre parámetros fisiológicos en ratas; se observó que los fructanos disminuyeron niveles de glucosa en sangre y esteatosis hepática, mientras que las concentraciones sanguíneas de HDL y *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* aumentaron. Urías-Silvas *et al.* (2008), evaluaron el efecto de fructanos de *Agave tequiliana Gto.* y *Dasyilirion spp.*, sobre el metabolismo de glucosa y lípidos en un ensayo *in vivo* en roedores; observaron un efecto positivo similar a los ya descritos para fructanos de tipo inulina, logrando una disminución de la glucemia y la triacilglicerolemia.

Es complicado dilucidar sobre que componente del aguamiel del maguey pulquero es el que logra tener este efecto hipoglucémico en ratas y cuál es su posible mecanismo de acción, pero en base a la literatura semejante al aguamiel, se puede sugerir o especular que el efecto

hipoglucémico podría ser debido al contenido de fructanos presentes en el agave y se sabe que éstos tienen su efecto al ser fermentados en los intestinos, la cual debe tenerse en cuenta en la interpretación de los efectos metabólicos de los fructanos dietéticos, dicha fermentación de fructanos en el colon caceo conduce a la producción de SCFA (Short-chain fatty acids), siendo el propionato un inhibidor de la síntesis de lípidos hepáticos. El propionato, que se produce en gran parte a través de la fermentación de todos los fructanos probados, ha demostrado disminuir la síntesis de colesterol en diferentes modelos (Demigné, Rémésy, & Morand, 1999), de igual manera la producción de estos SCFA, también podría estar implicada en la modulación de la expresión del gen del proglucagón, derivado del intestino y, posteriormente, en la secreción de péptidos derivados del proglucagón tales como GLP-1, este péptido actúa como hormona incretina y se conoce como un agente antidiabético que combina efectos insulíntrópicos y anoréxicos (Tappenden *et al.*, 2003; Meier *et al.*, 2002).

Por otra parte, Leal-Díaz *et al.* (2016), reportaron que el concentrado de aguamiel tiene bajos índices glicémicos e insulinémicos; el concentrado de aguamiel produjo un menor aumento en la glucosa en sangre y la insulina sérica en comparación con la respuesta de referencia (50 g de glucosa), a pesar de la sacarosa elevada y los contenidos de glucosa en los 50 g de carbohidratos disponibles en el aguamiel concentrado. Este efecto se atribuyó a las saponinas presentes en el concentrado de aguamiel.

En consecuencia, en nuestro estudio el efecto hipoglucémico del aguamiel no se puede atribuir a un compuesto en específico; hace falta más estudios sobre el aguamiel para determinar que compuesto o grupo de compuestos son los responsables del efecto observado.

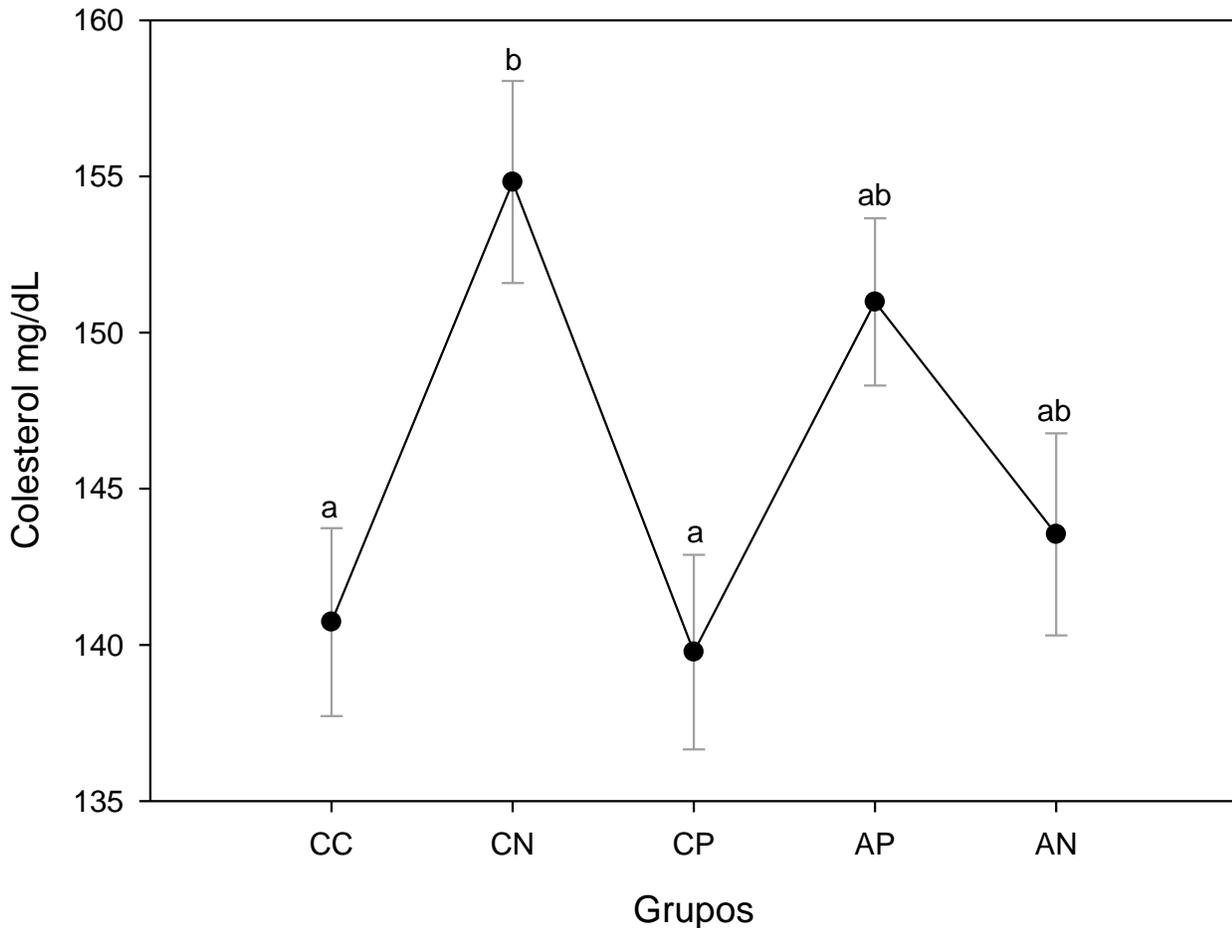
7.3.2 Determinación cuantitativa de colesterol total

El colesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el colesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir algunas hormonas. La cuantificación de colesterol es una de las herramientas más importantes, para el diagnóstico y clasificación de las dislipidemias. El aumento del nivel de colesterol es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular.

En la Gráfica 4 se muestran los valores de colesterol en plasma de todos los grupos de experimentación, se puede observar que en general solo el grupo CN fue diferente significativamente con los grupos AP y AN; todos los demás grupos fueron iguales estadísticamente. Aunque los valores de colesterol son ligeramente altos para CN, se encuentran toda vía dentro de en los límites de los parámetros normales. Es posible que el incremento en los niveles de colesterol se deba principalmente a la dieta hipercalórica. En un estudio similar realizado por Rendon-Huerta *et al.* (2012), en donde evaluaron el efecto de los fructanos de diferentes fuentes (entre ellas fructanos de *Agave*); encontraron que las concentraciones de colesterol total fueron mayores en las ratas diabéticas que en las no diabéticas. En un segundo experimento que realizaron los mismos investigadores trabajando ahora con ratas obesas diabéticas, encontraron que la concentración de colesterol disminuyó solamente en las ratas que recibieron fructanos de *Agave angustifolia spp tequiliana*. En contraparte Daubioul *et al.* (2000), encontraron que la adición de oligofruktosa a la dieta de ratas Zucker, no disminuyó el colesterol plasmático.

En nuestro caso, no se observó una disminución significativa de colesterol en los grupos diabéticos; aunque existió una tendencia a disminuir dichos valores para el grupo que recibió aguamiel. No obstante, es posible que si los tratamientos se prolongan por un mayor tiempo se

pueda presentar una diferencia significativa. En tal caso, es necesario mayores estudios al respecto.



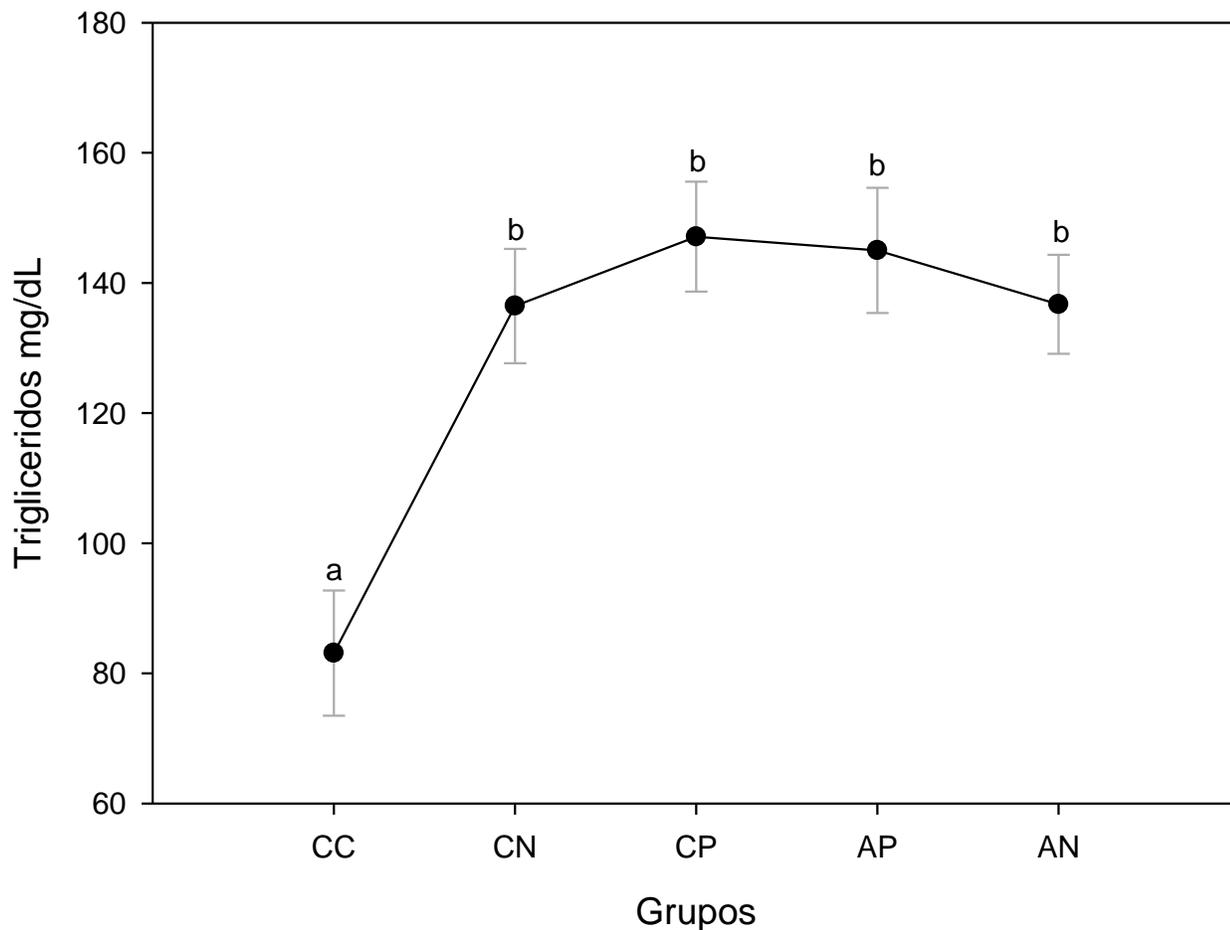
Gráfica 4. Concentración de colesterol total en sangre de los 5 grupos de ratas al final del tratamiento (CC; Control sano, CN; Control negativo, CP; Control positivo, AN; Aguamiel Natural, AP; Aguamiel pasteurizado).

7.3.3 Determinación de Triglicéridos

Los triacilglicéridos o triglicéridos son grasas que suministran energía a la célula. Al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas en la sangre. Una dieta alta en grasas saturadas o carbohidratos puede elevar los niveles de triglicéridos. Su

aumento es relativamente inespecífico. Diversas dolencias como ciertas disfunciones hepáticas (cirrosis, hepatitis, obstrucción biliar) o diabetes mellitus, pueden estar asociadas con su elevación.

En la Gráfica 5 se muestran los valores de triglicéridos para todos los grupos de experimentación. Se observó que los grupos diabéticos que recibieron dieta hipercalórica, presentaron mayor concentración de triglicéridos en sangre que el grupo control sano. Y todos los demás grupos presentaron estadísticamente los mismos niveles. Dichas concentraciones de triglicéridos para los grupos diabéticos están por arriba de los valores de referencia, su aumento se debe principalmente a la dieta hipercalórica y a la diabetes. Rendon-Huerta *et al.* (2012), reportan que las concentraciones de triacilglicéridos en sangre no fueron afectadas por la suplementación de fructanos. Otro estudio realizado por Leal-Díaz *et al.* (2016), observaron que después de 12 semanas de alimentar con dietas experimentales a ratones, las concentraciones de colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos (TAG) y concentración de glucosa no fueron significativamente diferentes entre los grupos de tratamiento (C: control; HF: alto contenido de grasa; HFAC: alto en grasa con concentrado de aguamiel; HFL: alto contenido en grasa con dosis baja de saponinas; HFH: alto contenido en grasa y alta dosis de saponina). En nuestro estudio la dieta suplementada durante 4 semanas con aguamiel no tuvo ningún efecto benéfico sobre los niveles de triacilglicéridos en ratas.



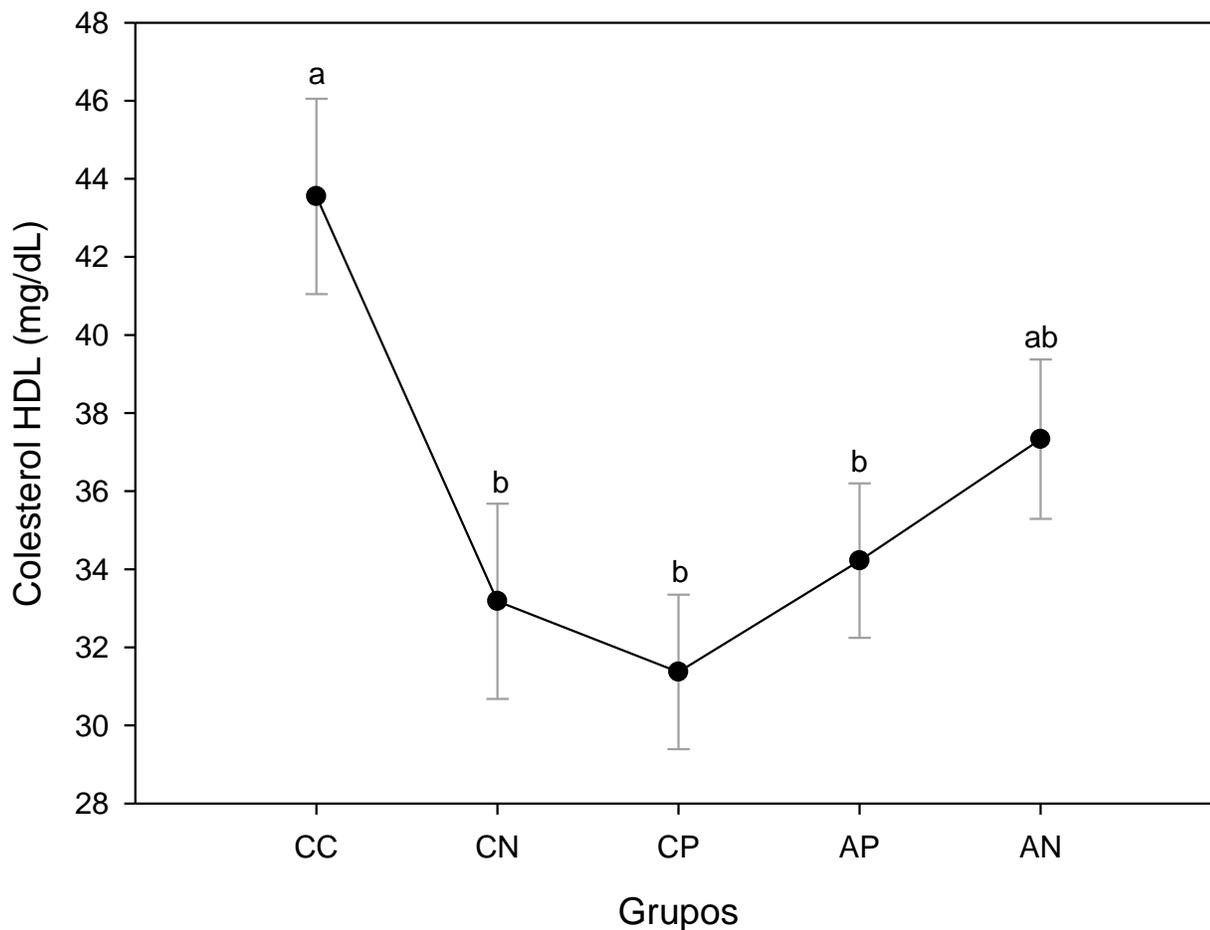
Gráfica 5. Concentración de triglicéridos en los 5 grupos de ratas al final del tratamiento (CC; Control sano, CN; Control negativo, CP; Control positivo, AN; Aguamiel Natural, AP; Aguamiel pasteurizado).

7.3.4 Determinación de Colesterol HDL

Las partículas de HDL son lipoproteínas de alta densidad que transportan el colesterol desde los tejidos del cuerpo hasta el hígado. Debido a que las HDL pueden retirar el colesterol de las arterias y transportarlo de vuelta al hígado para su excreción, se les conoce como el colesterol o “lipoproteína buena”, ya que niveles elevados están relacionados con un menor riesgo

cardiovascular, un nivel bajo de colesterol HDL es considerado uno de los principales factores de riesgo cardiovascular y enfermedades de las arterias coronarias.

En la Gráfica 6 se reportan los niveles de colesterol HDL. Se observó una concentración mayor en el grupo CC, lo cual de acuerdo con los valores de referencia indican un menor riesgo cardiovascular; esto es lógico ya que este grupo de ratas no recibió dieta hipercalórica, ni fueron inducidas a diabetes. Por otra parte, se observa que todos los grupos diabéticos presentaron concentraciones bajas de colesterol HDL; lo cual está relacionado con riesgo cardiovascular y enfermedades de las arterias coronarias. De igual forma, se puede observar que el grupo que recibió aguamiel natural presentó una mayor concentración de HDL, aunque no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos diabéticos y el CC. Rendon-Huerta *et al.* (2012), encontraron que las concentraciones sanguíneas de HDL, fueron menores en ratas diabéticas suplementadas con fructanos de *H. tuberosus* y *A. angustifolia spp. tequiliana*, que las ratas diabéticas no suplementadas. Leal-Díaz *et al.* (2016), reportaron que los valores de colesterol HDL no fueron significativamente diferentes entre los grupos tratados con concentrado de aguamiel. En nuestro estudio, tampoco se encontraron diferencias estadísticas entre grupos; no obstante, se presentó una tendencia a aumentar la concentración de colesterol HDL en los grupos alimentados con aguamiel natural.



Gráfica 6. Concentración de colesterol HDL de los 5 grupos al final del tratamiento (CC; Control sano, CN; Control negativo, CP; Control positivo, AN; Aguamiel Natural, AP; Aguamiel pasteurizado).

En conclusión, los valores de colesterol total, triglicéridos y colesterol HDL no tuvieron una modificación significativa al recibir el tratamiento con aguamiel; sin embargo, el grupo que recibió como tratamiento el aguamiel natural mostro una tendencia a disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos y a aumentar la concentración de colesterol HDL. Debido a que estos cambios no fueron significativos, nos lleva a suponer que el tiempo de experimentación fue muy corto para lograr ver cambios significativos.

7.4 Análisis histopatológico de los grupos de ensayo

7.4.1 Grupo control normal

Hígado

En este grupo el tejido hepático no presentó cambios en su arquitectura tisular, aunque se detectó un proceso de hiperemia pasiva, probablemente asociado al método de sacrificio empleado. Por otra parte, los hepatocitos presentaron degeneración albuminosa probablemente asociada al tiempo de colección de las muestras, y poco más de la mitad de los animales presentaron vacuolas pequeñas y escasas en el citoplasma de sus hepatocitos (Fig. 4A). Dichas observaciones se refieren a un hígado sano.

Riñón

La arquitectura tisular renal se observó sin cambios, con excepción del proceso de hiperemia pasiva mencionado anteriormente, más marcado a nivel de la médula. Del mismo modo, se observó una degeneración albuminosa en las células de los túbulos renales, probablemente asociada al tiempo de colección de las muestras, dichas observaciones referentes al riñón sano de ratas diabéticas (Fig. 5A).

Páncreas

La arquitectura tisular de este órgano se observó sin cambios patológicos aparentes, con excepción de la hiperemia pasiva referida. Así mismo se observó una degeneración albuminosa de las células acinares. Los islotes pancreáticos se observaron sin cambios, algunos de tamaño más pequeño que la mayoría, sin embargo, son referentes a un páncreas sano (Fig. 6A).

7.4.2 Grupo control negativo

Hígado

La arquitectura del hígado se observó sin cambios, con excepción de la hiperemia pasiva y la degeneración albuminosa ya descritas. Sin embargo, en el 66% de los animales, se observó la presencia moderada de vacuolas en el citoplasma de sus hepatocitos, en este grupo se nota un hígado dañado (Fig. 4B).

Riñón

La arquitectura tisular de este órgano se observó muy semejante a lo descrito previamente, aunque en este caso, se observó la presencia moderada de vacuolas pequeñas en las células de los túbulos rectos y en algunos de los animales, en las células de los túbulos contorneados, este grupo presenta un riñón ligeramente dañado (Fig. 5B).

Páncreas

De manera semejante al grupo previo, se observó una leve hiperemia pasiva. Sin embargo, varias de las células de los islotes pancreáticos presentaron pequeñas vacuolas en su citoplasma. El tamaño de los islotes fue mayoritariamente pequeño, aunque también se observaron algunos islotes de tamaño convencional, observaciones referentes a un páncreas dañado (Fig. 6B).

7.4.3 Grupo control positivo

Hígado

En este grupo no se observaron cambios patológicos aparentes, con excepción de la presencia de vacuolas más o menos abundantes en el citoplasma de los hepatocitos en poco más del 30 % del grupo. En otro 30%, la presencia de estas vacuolas fue moderada, se observó hígado ligeramente dañado (Fig. 4C).

Riñón

El aspecto de este órgano fue muy similar a lo referido en el grupo previo, pero la presencia de vacuolas en túbulos rectos fue más notoria, en este grupo el daño al riñón fue mínimo (Fig. 5C).

Páncreas

En este grupo no se observaron cambios patológicos aparentes, con excepción del proceso de hiperemia pasiva leve ya mencionado, además de la presencia de vacuolas pequeñas en las células de los islotes pancreáticos en poco más de la mitad de los animales. Con relación al número de islotes, éstos fueron escasos y de tamaño variable, el daño en este grupo fue mínimo (Fig. 6C).

7.4.4 Grupo aguamiel natural

Hígado

El cambio más notorio fue que la mitad del grupo presentó un número importante de vacuolas en el citoplasma de sus hepatocitos; además, el 16% presentó un daño moderado y el resto de los animales presentó una cantidad leve de vacuolas, aunque con zonas aisladas de cambio moderado, en este grupo de animales se observó un daño mayor en el hígado, probablemente debido a la presencia de alcohol en el aguamiel (Fig. 4D).

Riñón

En este grupo el tejido renal se observó muy similar a lo descrito en los grupos anteriores, sin embargo, se observó un número moderado de vacuolas en el citoplasma de las células de los túbulos rectos en todos los animales, y en 33.3% de los animales un número pequeño de vacuolas en el citoplasma de los túbulos contorneados, los daños observados en este órgano fueron mínimos a comparación del grupo CN (Fig. 5D).

Páncreas

En este grupo, además de la hiperemia pasiva de referencia, se observó un poco más del 80% de los animales, la presencia de vacuolas en los endocrinocitos de los islotes. Con relación al tamaño de los islotes, en la mayoría de los animales, fueron escasos y generalmente pequeños, aunque con cierta variación en su tamaño, se observó un páncreas dañado, aunque aparentemente en recuperación (Fig. 6D).

7.4.5 Grupo aguamiel pasteurizado.

Hígado

En este grupo de animales se observó que el 40% presentó un número importante de vacuolas en el citoplasma de sus hepatocitos y el 60%, una cantidad moderada de éstas en el citoplasma de sus hepatocitos, en general en el grupo de animales se observó daño al hígado debido al desarrollo de la diabetes, aunque el daño fue menor a comparación del grupo que recibió aguamiel natural (Fig. 4E).

Riñón

En este grupo el riñón presentó la hiperemia pasiva y la presencia de vacuolas en las células de los túbulos rectos, en general un riñón con daño mínimo (Fig. 5E).

Páncreas

En este grupo la arquitectura tisular y la hiperemia pasiva fueron similares a lo descrito en los grupos previos. Las células de los islotes presentaron vacuolas citoplásmicas en el 80% de los individuos. Con relación al tamaño de los islotes, en el 60% del grupo éstos fueron de tamaño pequeño y en el 40% fueron de tamaño variable. En el 100% del grupo se observó un número escaso de estas estructuras, refiriéndose a este grupo con un daño general en este órgano similar al grupo CN (Fig. 6E).

Respecto a los cambios observados en el hígado se puede decir que no hubo mucha diferencia entre los grupos que recibieron tratamiento, pero sí con el grupo control. Entre las diferencias más marcadas está la presencia de vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos (Fig. 4). La presencia de las vacuolas se debe principalmente a la dieta hipercalórica que recibieron los grupos diabéticos y a la administración de la estreptozotocina. De igual forma, se pueden observar mayor cantidad de vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos en los animales que recibieron AN (Fig. 4D). La presencia de estas vacuolas en los animales que recibieron AN, pudiera deberse a que el aguamiel administrado a las ratas pudo presentar fermentación y el alcohol está dañando más al hígado, esto porque el daño en el hígado es menor en las que recibieron como tratamiento aguamiel pasteurizado. Leal-Díaz *et al.* (2016), evaluaron el efecto de un concentrado de aguamiel y sus saponinas sobre la esteatosis hepática en ratones alimentadas con una dieta alta en grasas; observaron que éstos ratones acumularon mayor cantidad de grasa hepática, en forma de macro y microvesículas, en comparación con el grupo control. Además, observaron que la acumulación de lípidos hepáticos disminuyó cuando se añadió concentrado de aguamiel a la dieta. En otro estudio realizado por Urías-Silvas *et al.* (2008), evaluaron el efecto de los fructanos de *A. tequiliana*, suplementados en la dieta de ratones C57B1 machos sanos, encontraron en el análisis histológico del hígado, que este no reveló diferencias entre los grupos, una estructura normal de los hepatocitos dispuestos en típicos arreglos radiales caracterizó a todos los grupos.

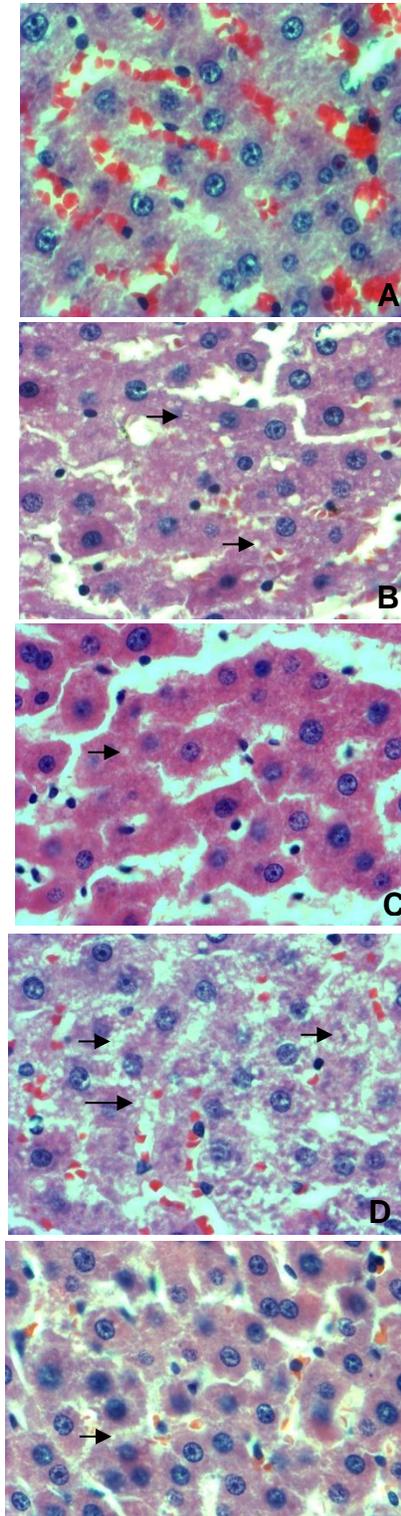


Figura 4. **Hígado. H-E. 400x.** (A) Los hepatocitos del grupo CC presentan escasas vacuolas. (B) En los hepatocitos del grupo CN se observa la presencia moderada de vacuolas. (C) Estas vacuolas son más abundantes en los hepatocitos del grupo CP. (D) Estas vacuolas son aún más numerosas en los hepatocitos del grupo AN. (E) Los hepatocitos del grupo AP son semejantes a lo observado en el grupo CN. Las flechas señalan la presencia de las vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos.

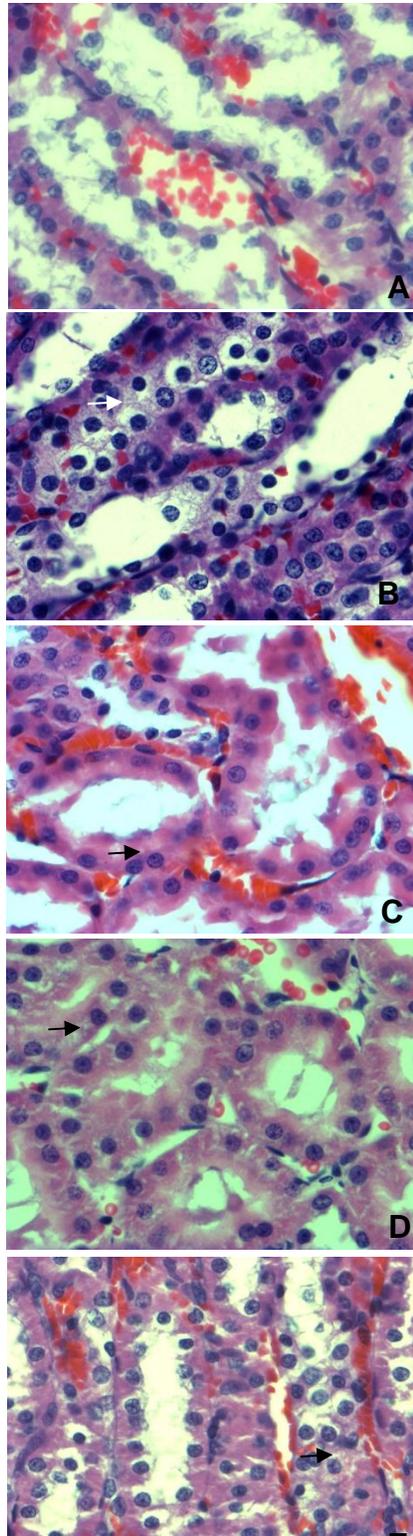


Figura 5. **Riñón. H-E. 400x.** (A) Los riñones del grupo CC no presentan cambios patológicos aparentes. (B) En el tejido renal del grupo CN se observa presencia de vacuolas, especialmente en las células de los túbulos rectos. (C) En el grupo CP se observa la presencia moderada de vacuolas en las células de los túbulos rectos. (D) En el grupo AN se observa un número discreto de vacuolas en las células referidas. (E) En el grupo AP el aspecto es muy similar al del grupo previo. Las flechas señalan la presencia de las vacuolas en el citoplasma de las células de los túbulos rectos.

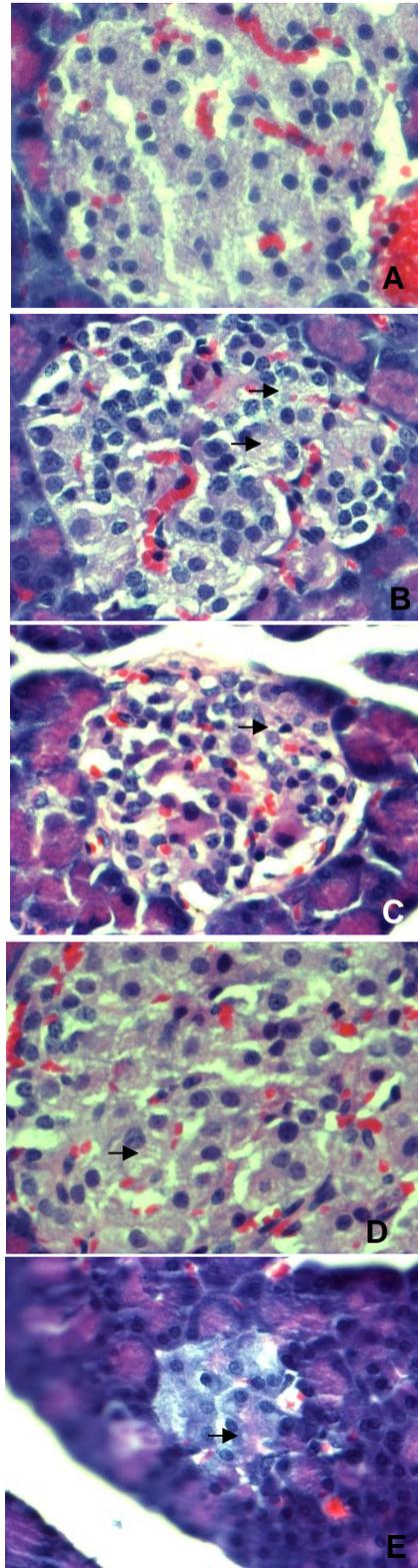


Figura 6. **Páncreas. H-E. 400x.** (A) Las células de los islotes pancreáticos del grupo CC no muestran cambios patológicos aparentes. (B) En los islotes pancreáticos del grupo CN se observan vacuolas pequeñas en el citoplasma de sus células. (C) En los islotes pancreáticos del grupo CP se observan vacuolas pequeñas en sus

células y espacios vacíos en la estructura del islote. **(D)** Las células de los islotes pancreáticos del grupo AN presentan una mayor cantidad de vacuolas en su citoplasma. **(E)** Las células de los islotes pancreáticos del grupo AP presentan un número moderado de vacuolas citoplásmicas, pero el tamaño general de los islotes es reducido. Las flechas señalan la presencia de las vacuolas en el citoplasma de las células de los islotes.

Respecto a los cambios observados en el riñón, el daño fue mínimo. El mayor cambio observado fue una hiperemia pasiva y degeneración albuminosa, debida a el método de sacrificio. La presencia de vacuolas en los túbulos rectos y túbulos contorneados se debe a un daño celular asociado a la diabetes. Este cambio es semejante en los 4 grupos diabéticos y no se observó en el grupo control.

Uno de los cambios más importantes se presentó en el páncreas de los animales de estudio; en el grupo control sano el tamaño de los islotes pancreáticos fue de tamaño normal a diferencia del CN y el AP que presentaron islotes pancreáticos pequeños y en menor cantidad. Se observó también una semejanza del tamaño y de la cantidad de islotes entre los grupos CP y AN. No se encontraron reportes sobre el efecto de aguamiel sobre páncreas como efecto de comparación. Verma *et al.* (2012), investigaron el efecto glucémico y lipidémico del extracto hidroalcohólico de frutos de *Sapindus mukorossi*; observaron que el páncreas de las ratas normales contenía islotes normales, mientras que el de los animales diabéticos, mostró hiperplasia de las células β y congestión de las células parenquimatosas pancreáticas. Observaron también que los animales que recibieron el extracto de estudio y los que recibieron glibenclamida, aumentaron el número de islotes en comparación con los animales diabéticos.

Finalmente, en nuestro estudio los cambios morfológicos negativos que se observaron en el hígado, riñón y páncreas, se relacionan principalmente con el efecto tóxico de la estreptozotocina (Prabhu & Vijayakumur, 2014) y a la dieta hipercalórica.

8 Conclusiones

1. El aguamiel presentó un contenido de proteínas de 0.37%; además se observó una composición compleja de azúcares, sin embargo, se logró identificar la presencia de kestosa, maltotriosa, maltopentosa, maltoheptosa, glucosa, fructosa y sacarosa.
2. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de cenizas y sólidos totales en aguamiel natural y pasteurizado.
3. Se logró una inducción de la diabetes en las ratas del 65% utilizando una dieta hipercalórica y una inyección de estreptozotocina.
4. En el grupo de ratas diabéticas que recibió aguamiel natural se observó una reducción significativa en los niveles de glucosa con respecto al grupo de ratas diabéticas que no recibió ningún tratamiento; además, la concentración de glucosa de estas ratas que recibieron aguamiel fue significativamente igual a la de las que recibieron glibenclamida.
5. En el grupo de ratas diabéticas que recibió aguamiel pasteurizado, se observó una tendencia a la disminución de la glucosa con respecto al tiempo; además, este grupo presentó una desviación estándar menor a la de los demás grupos.
6. El análisis histopatológico de hígado, riñón y páncreas de las ratas diabéticas demostró la presencia de vacuolas en las células de tales órganos, lo cual se asocia principalmente al daño ocasionado por la dieta hipercalórica y la inducción a diabetes.

9 Perspectivas

- Aumentar el periodo experimental en las ratas para observar el efecto del aguamiel en el mayor tiempo posible.
- Incrementar el número de ratas por grupo experimental (al menos 10 por grupo) para disminuir la desviación estándar y para desarrollar un estudio más robusto.
- Someter el aguamiel a diferentes tratamientos térmicos (tiempo/temperatura) y evaluar su efecto hiperglucémico.
- Obtener aguamiel secado por aspersion y evaluar el efecto hipoglucémico del polvo obtenido.
- Procesar al aguamiel por diferentes tratamientos a temperatura ambiente o más baja (liofilización, por ejemplo) y evaluar el efecto hipoglucémico de los productos obtenidos.
- Desarrollar nuevos productos a base del aguamiel con efecto hipoglucémico en diabéticos.
- Realizar estudios clínicos de los productos a base de aguamiel en personas con diabetes.

10 Bibliografía

- A.O.A.C. (1990). *Official Methods of Analysis, Association of Official Chemists*. Washington, D.C.
- ADA. (January de 2014). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 37(1), s14-s80.
- ADA. (January de 2004). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*, 27(1), s5-s10.
- Ávila-Reyes, J. A., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., González-valdez, L. S., Valencia del Toro, L., & Durán-Páramo, E. (2010). Phenol profile and antioxidant capacity of mescal age in oak wood barrels. *Food Res. Int.*, 43, 296-300.
- Burgos, B. I. (2013). *Efecto del método de conservación del inóculo (semilla) de pulque y de la concentración de carbohidratos en la fermentación del aguamiel (tesis de pregrado)*. México, D.F.: Uiversidad Nacional Autónoma de México.
- Cefalu, W. T. (2006). Animal Models of Type 2 Diabetes: Clinical Presentation and Pathophysiological Relevance to the Human Condition. *ILAR Journal*, 47(3), 186-198.
- Cerda-de los Santos, K. L. (2011). Evaluación del contenido de fenólicos, actividad antioxidante y efectos antidiabéticos de extractos de jarabes de agave (*A. atrovirens* Karw). *Tecnologico de Monterrey*.
- Cervantes, R. M. (2005). Plantas de importancia económica en zonas áridas y semiáridas de México. *X encuentro de Geografos de America Latina* (págs. 3388-3407). México D.F.: Ciudad Universitaria: Instituto de Geografía.
- Conclaves, D. L. (1978). *El maguey y el pulque en los codices mexicanos*. México D.F.: Fondo de cultura económica.
- Daubioul, C., Taper, H., De Wispelaere, L., & Delzenne, N. (2000). Dietary oligofructose lessens hepatic steatosis, but does not prevent hypertriglyceridemia in obese Zucker rats. *Journal Ntutrition*, 133, 1314-1319.

- Demigné, C., Rémésy, C., & Morand, C. (1999). Short Chain fatty acids. En *In Colonic Microbiota, Nutrition and Health* (págs. 55-69). Dordrecht: The Netherlands; Kluwer Academic Publisher.
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Esquivel, F. G., Matus, A. V., Moreno, T. R., López-Munguía, A., & Lappe-Olivares, P. (2012). Pulque Fermentation. *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology* (págs. 691-704). México D.F: Handbook of plant-bases fermented food and beverage tecnology. Chapter 43.
- García, M. A. (2007). *Los Agaves de México*. México, D.F.: UNAM.
- García-Pedraza, L. G., Juárez-Flores, B. I., Agurre-Rivera, J. R., Pinos-Rodriguez, J. M., Martínez, J. F., & Santoyo, M. E. (2009). Effects of Agave salmiana Otto ex Salm-Dick high-fructose syrup on non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *J. Med. Plants*, 3(11), 932-940.
- Gomez, E., Touhy, K., Gibson, G. R., Klinder, A., & Costabile, A. (2010). In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic of Agave fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 2214-2121.
- Gomez, E., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Klinder, A., & Costabile, A. (2010). In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *Journal Appl. Microbiol.*, 108(6), 2114-2121.
- Granados, S. (1993). *Los agaves en México*. México D.F.: Imprenta universitaria de Universidad Autónoma de Chapingo.
- Haslam, D., & James, W. (2005). Obesity. *Lancet*, 366, 1197-1209.
- Hernot, D. C., Boileau, T. W., Bauer, L. L., Middelbobs, I. S., Murphy, M. R., Swanson, K. S., & Fahey, G. C. (2009). In vitro fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fractans, galactooligosaccharides, and polydextrose. *Journal Agrucultural Fodd Chemistry*, 57(4), 1354-1361.
- IDF. (2015). International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*. Seventh Edition.

- Kanaya, K., Chiba, S., & Shimora, T. (1978). Thin-layer chromatography of linear oligosaccharides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42, 1947-1948.
- Kolida, S., Tuohy, K., & Gibson, G. R. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(2), s193-s197.
- Kotronen, A., Yki-Järvinen, H., Sevastianova, K., Bergholm, R., Hakkarainen, A., Pietiläinen, K., Lundbom, N. S. (2011). Comparison of the relative contributions of intra-abdominal and liver fat to components of the metabolic syndrome. *Obesity*, 19, 23-28.
- Laguna, J., Piña, G. E., Martínez, M. F., Pardo, V. J., & Riveros, R. H. (2013). *Bioquímica de Laguna* (7a ed.). México, D. F.: UNAM; El Manual Moderno.
- Leal-Díaz, A. M., Noriega, L. G., Torre-Villalvazo, I., Torres, N., Alemán-Escondrillas, G., López-Romero, P. (2016). Aguamiel concentrate from Agave salmiana and its extracted saponins attenuated obesity and hepatic steatosis and increased Akkermansia muciniphila in C57BL6 mice. *Scientific Reports*, 1-15.
- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular Structures of Fructans from Agave tequiliana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7835-7840.
- Lorenzo, M. A. (2007). El maguey y el pulque en México. En *Las haciendas pulqueras de México* (págs. 41-63). México, D.F.: UNAM.
- Loyola, M. E. (1956). *La industria del pulque*. México, D.F.: Departamento de investigaciones industriales. Banco de México SA.
- Meier, J. J., Gallwitz, B., Schmidt, W. E., & Nauck, M. A. (2002). Glucagon-like peptide 1 as a regulator of foos intake and body weight; therapeutic perspectives. *European Journal of Pharmacology*, 440, 269-279.
- Mellado-Mojica, E., & López, G. M. (2012). Fructan Metabolism in A. tequiliana Weber Blue Variety along its Developmental Cycle in the Field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 11704-11713.

- Mellado-Mojica, E., & López, M. G. (2015). Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. *Food Chemistry*, 167, 349-357.
- Morales, M. A. (2009). *Caracterización fitoquímica funcional del fruto de xoconostle cuaresmeño (Opuntia matudae) y el efecto de su consumo en parametros bioquímicos de ratas diabéticas (Tesis de grado)*. Queretaro: UAQ.
- Muñiz-Márquez, D. B., Contreras, J. C., Rodríguez, R. M., Wong-Paz, J. E., Teixeira, J. A., & Aguilar, C. N. (2015). Influence of thermal effect on sugars composition of Mexican Agave syrup. *CyTA Journal of Food*, 13:4, 607-612.
- Muñiz-Márquez, D. B., Contreras, J. C., Rodríguez, R., Mussatto, S. I., Teixeira, J. A., & Aguilar, C. N. (2016). Enhancement of fructosyltransferase and fructooligosaccharides production by *A. oryzae* DIA-MF in Solid-State Fermentation using aguamiel as culture medium. *Bioresource Technology*, 1-7.
- Olvera, C. C., Ávila, F. A., Bustillo, A. G., & López-Munguía, A. (2015). Processing of Fructans and Oligosaccharides from Agave Plants. *Processing and Impact on Active Components in Food*, 121-129.
- OMS. (1 de Septiembre de 2016). *OMS: diabetes*. Obtenido de http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/
- Ortiz-Basurto, R. I., Pourelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M., & Belleville, M.-P. (2008). Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (Agave mapisaga) throughout the Harvest Period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3682-3687.
- Prabhu, S., & Vijayakumar, S. (2014). Antidiabetic, hypolipidemic and histopathological analysis of *Gymnema sylvestre* (R. Br) leaves extract on streptozotocin induced diabetic rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4, 425-430.
- Radenkovic´, M., Stojanovic´, M., & Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78, 13-31.

- Ramírez, H. A. (2010). *Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (Agave salmiana) en Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (tesis de pregrado)*. Mexico, D. F.: IPN.
- Rendón-Huerta, J. A., Juárez-Flores, B. I., Pinos-Rodríguez, J. M., Aguirre-Rivera, J. R., & Delgado-Portales, R. E. (2011). Effects of different kind of fructans on invitro growth of Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei and Bifidobacterium lactis. *African Journal Microbiol. Res*, 5(18), 2706-2710.
- Rendon-Huerta, J. A., Juárez-Flores, B., Pinos-Rodríguez, J. M., Aguirre-Rivera, J. R., & Delgado-Portales, R. E. (2012). Effects of Different Sources of Fructans on Body Weight, Blood Metabolites and Fecal Bacteria in Normal and Obese non-diabetic and Diabetic Rats. *Plan Foods Hum Nutr*, 67, 64-70.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Duran-Lugo, R., Prado-Barragan, L. A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2007). Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of Bifidobacterium bifidum following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Research International*, 40, 1299-1306.
- Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A. M., Cortés-Ceballos, E., & Gutiérrez-Urbe, J. a. (2012). Agave (Agave spp.) and its Traditional Products as a Source of Bioactive Compounds. *Current Bioactive Compun*, 8, 218-231.
- Sidana, J., Singh, B., & Sharma, O. P. (2016). Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 130, 22-46.
- Sidana, J., Singh, B., & Sharma, O. P. (2016). Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 130, 22-46.
- Silos-Espino, H., Tovar-Robles, C. L., González-Cortés, N., Méndez-Gallegos, S. J., & Rossel-Kipping, D. (2011). Estudio integral del maguey (Agave salmiana): propagación y valor nutricional. *Revista Salud Pública y Nutrición.*, 5, 75-82.

- Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C. L., & Ramarao, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research*, 52, 313-320.
- Tappenden, K., Albin, D., Bartholome, A., & Mangian, H. (2003). Glucagon-like peptide-2 and short chain fatty acids: a new twist to an old story. *Journal Nutrition*, 133, 3717-3720.
- Tovar-Robles, C. L., Perales-Segovia, C., Nava-Cedillo, A., Valera-Montero, L. L., Gómez-Leyva, J. F., Guevara-Lara, F., Silos-Espino, H. (2011). Effect of aguamiel (agave sap) on hematic biometry in rabbits and its antioxidant activity determination. *Italian Journal of Animal Science*, 10:e21, 106-110.
- Urías-Silvas, J. E., Cani, P. D., Delmée, E., Neyrinck, A., López, M. G., & Delzenne, N. M. (2008). Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequiliana* Gto. and *Dasyliroium* spp. *British Journal of Nutrition*, 99, 254-261.
- Uribe, J. G., & Saldívar, S. S. (2009). Agave syrup extract having anticancer activity. *US20090124685*.
- Valadez, R., Bravo, G., Santos, N. F., Velasco, S. I., & Montville, T. J. (2012). The artesanal production of pulque, a traditional beverage of Mexican highlands. *Probiotics Antimicrobial Proteins*, 4, 140-144.
- Verma, N., Amresh, G., Sahu, P. K., Mishra, N., Singh, A. P., & Rao, C. (2012). Antihyperglycemic activity, antihyperlipidemic activity, haematological effects and histopathological analysis of *Sapindus mukorossi* Gaerten fruits in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 518-522.
- Zhang, M., Lv, X.-Y., Li, J., Xu, Z.-G., & Chen, L. (2008). The Characterization of High-Fat diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. *Experimental Diabetes Research*, 1-9.