



**Universidad Autónoma De Querétaro**

**Facultad De Química**

“Compuestos fenólicos del orujo de uva: extracción,  
estabilidad y su asociación con el tratamiento de la  
resistencia a la insulina en un modelo de obesidad inducido  
por una dieta alta en grasa y fructosa”

## Tesis

Que como parte de los requisitos para  
obtener el Grado de  
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

**IQ. AL. Paloma Castilla Ramírez**

Dirigido por:

**Dra. Rosalía Reynoso Camacho**

*Santiago de Querétaro, Qro., diciembre, 2024*

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Compuestos fenólicos del orujo de uva: extracción, estabilidad y su asociación con el tratamiento de la resistencia a la insulina en un modelo de obesidad inducido por una dieta alta en grasa y fructosa”

### **TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

#### **Presenta:**

IQ. AL. Paloma Castilla Ramírez

#### **Dirigido por:**

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

### SINODALES

Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Presidente

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez  
Secretario

Dra. Minerva Ramos Gómez  
Vocal

Dr. Luis M. Salgado Rodríguez  
Suplente

Dr. Iván Andrés Luzardo Ocampo  
Suplente

Centro universitario, Querétaro, Qro.  
Diciembre de 2024  
México

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE:**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Paloma Castilla Ramírez

## **DEDICATORIAS**

A mis papás Pepe y Miriam por apoyarme y cuidarme todo este tiempo.

A mi padrino David por brindarme el apoyo para iniciar mi proceso de ingreso a la maestría.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al consejo Nacional de Humanidades y Ciencias Tecnológicas (CONAHCYT) por el apoyo económico necesario durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por formarme profesionalmente desde licenciatura. A la Facultad de Química por el apoyo económico para realizar este proyecto de investigación.

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho por incentivarme a mejorar y a su vez por la presión y el regaño que me sirvió de práctica para la vida laboral y como impulso a mejorar para seguir mi sueño de ser investigadora.

A los miembros de mi comité por sus aportaciones realizadas. En especial a la Dra. Minerva por su apoyo en las clases para poder solucionar problemas generados durante la investigación

A mis padres por preocuparse por mí, darme un techo, comida y recogerme después de las largas jornadas en el laboratorio.

A Arturo por mostrarme que aún en los peores momentos se le puede ver el lado bueno a las cosas. Por enseñarme que no todo en la vida es la escuela e impulsarme a salir al mundo. Tu cariño me ayudó a seguir adelante.

A Marco y Edgar por estar ahí cuando los necesitaba y brindarme su amistad en estos años, fueron un ejemplo para mí para no darme por vencida.

A Rogelio Iván por todo el apoyo para poder realizar este enorme proyecto, por los fines de semana y las noches de desvelo, por ser un amigo y a la vez por los conflictos que me ayudaron a mejorar como persona.

A Alex, Lupita, Ricardo, Rogelio, Evelyn, Anita, Raúl por integrarme como una más del laboratorio. Evelyn, eres un ejemplo de doctora, gracias por cuidarnos y alentarnos a trabajar en un espacio más ordenado y gracias por apoyarme cuando lo necesitaba.

A Joel, Rogelio y la Dra. Rosalía, sin su esfuerzo no hubiera podido salir el primer artículo de este proyecto.

A Joss por brindarme un espacio para poder trabajar y brindarme tiempos amenos de plática.

A Flor por su apoyo en facilitarme los espacios y equipos de trabajo, así como su ayuda en los momentos difíciles.

A Memo por ser mi mejor amigo, espero que nuestra amistad perdure.

A todos los chicos de licenciatura que me apoyaron, Melissa, Yen, Leo, Angela, Ángel y Betty por su tiempo extra, sus fines de semana y jornadas largas. Sin ustedes este proyecto no se hubiera podido realizar, espero hayan podido aprender mucho y si su sueño es seguir por este camino de investigación estaré encantada de apoyarlos.

<b>ÍNDICE GENERAL</b>		<b>Página</b>
ÍNDICE DE CUADROS		IX
ÍNDICE DE FIGURAS		X
RESUMEN		XI
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>16</b>
2.1.	Insulina	16
2.2.	Resistencia a insulina	17
2.3.	Prevalencia de diabetes DMT2	18
2.4.	Tratamientos para la diabetes	19
2.5.	Orujo de uva	19
<b>2.5.1.</b>	<b>Composición general del orujo</b>	<b>20</b>
<b>2.5.1.</b>	<b>Contenido de fibra de orujo de uva</b>	<b>20</b>
<b>2.5.2.</b>	<b>Compuestos fenólicos</b>	<b>22</b>
<b>2.5.3.</b>	<b>Compuestos fenólicos extraíbles</b>	<b>23</b>
<b>2.5.4.</b>	<b>Compuestos fenólicos no extraíbles</b>	<b>24</b>
2.6.	Extracción de compuestos fenólicos	24
<b>2.6.1.</b>	<b>Extracción de compuestos fenólicos extraíbles</b>	<b>24</b>
<b>2.6.2.</b>	<b>Extracción de compuestos fenólicos no extraíbles</b>	<b>26</b>
<b>2.6.3.</b>	<b>Extractos de compuestos fenólicos de orujo de uva</b>	<b>26</b>
2.1.	Estabilidad de los extractos de compuestos fenólicos	28
2.2.	Estudios de orujo de uva y resistencia a insulina	30
<b>2.2.1.</b>	<b>Estudios con orujo de uva</b>	<b>30</b>
<b>2.2.2.</b>	<b>Estudios con extractos de orujo de uva</b>	<b>32</b>
<b>III.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>34</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
4.1.	Objetivo general	35
4.2.	Objetivo Específico	35
<b>V.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>35</b>
5.1.	Materiales	35
<b>5.1.1.</b>	<b>Animales</b>	<b>35</b>
<b>5.1.2.</b>	<b>Material vegetal</b>	<b>36</b>
<b>5.1.3.</b>	<b>Análisis microbiológico de orujo de uva</b>	<b>36</b>
5.2.	Selección de las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos	37

5.2.1.	Preparación de extractos	37
5.2.2.	Cuantificación de compuestos fenólicos totales extraíbles	39
5.2.3.	Compuestos fenólicos no extraíbles	41
5.2.4.	Identificación de compuestos fenólicos extraíbles por HPLC-DAD	42
5.2.5.	Identificación de compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles por UPLC de los extractos administrados en el modelo animal	43
5.3.	Estabilidad de compuestos fenólicos extraíbles	44
5.3.1.	Medición de color e índice de pardeamiento	44
5.3.2.	Cinética de degradación de antocianinas y proantocianidinas	45
5.3.3.	Evaluación <i>in vivo</i> de tratamiento de la resistencia a insulina de los compuestos fenólicos no extraíbles del orujo de uva	46
5.3.4.	Análisis estadístico	50
VI.	<b>RESULTADOS</b>	<b>51</b>
6.1.	Selección de las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos	51
6.1.1.	Identificación de compuestos extraíbles por HPLC-PDA en los extractos de orujo de uva	55
6.2.	Evaluación del índice de pardeamiento y estabilidad de antocianinas y proantocianidinas	59
6.3.	Evaluación <i>in vivo</i> de tratamiento de la resistencia a insulina de los compuestos fenólicos no extraíbles del orujo de uva	70
6.3.1.	Perfil fitoquímico de los extractos EPP y NEPP	70
6.3.1.	Cuantificación de solventes residuales en los extractos liofilizados de EPPs y NEPPs	72
6.3.1.	Análisis microbiológico	77
6.3.2.	Estudio <i>in vivo</i> para la evaluación de los compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles sobre resistencia a la insulina	78
VII.	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>85</b>
VIII.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>86</b>
IX.	<b>ANEXOS</b>	<b>109</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Composición proximal del orujo de uva	20
<b>Cuadro 2.</b> Fibra dietaria de orujo de uva	21
<b>Cuadro 3.</b> Compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles en orujos de uva	25
<b>Cuadro 4.</b> Condiciones de extracción de compuestos fenólicos de orujo de uva	27
<b>Cuadro 5.</b> Mezclas de solventes utilizados en la primera etapa de extracción de EPPs de orujo de uva	38
<b>Cuadro 6.</b> Mezclas de solventes utilizados en la primera y segunda etapa de extracción de EPPs de orujo de uva	39
<b>Cuadro 7.</b> Contenido nutrimental de la dieta estándar y alta en grasa y fructosa para el estudio in vivo	48
<b>Cuadro 8.</b> Cuantificación de compuestos fenólicos totales, antocianinas y proantocianidinas de diferentes tipos de extracciones de orujo de uva	53
<b>Cuadro 9.</b> Cuantificación de compuestos fenólicos totales, antocianinas y proantocianidinas de diferentes extracciones de orujo de uva Syrah utilizando diferentes proporciones de solventes en ambas etapas de extracción	54
<b>Cuadro 10.</b> Compuestos fenólicos cuantificados por HPLC/DAD en extractos de orujo de uva	56
<b>Cuadro 11.</b> Cinética de degradación de antocianinas de orujo de uva	66
<b>Cuadro 12.</b> Cinética de degradación de extractos de proantocianidinas del orujo de uva	68
<b>Cuadro 13.</b> Cambios de color ( $\Delta E$ ) de los extractos de orujo de uva al finalizar los estudios de estabilidad	69
<b>Cuadro 14.</b> Compuestos fenólicos de la fracción EPPs y NEPPs del orujo de uva	71
<b>Cuadro 15.</b> Compuestos fenólicos identificados por UPLC-MS en las fracciones EPPs y NEPPs del orujo de uva ( $\mu\text{g/g}$ de peso seco)	73
<b>Cuadro 16.</b> Análisis de solventes residuales de las fracciones EPP y NEPP del orujo de uva de la variedad Syrah	77
<b>Cuadro 17.</b> Análisis microbiológico de las fracciones EPP y NEPP del orujo de uva de la variedad Syrah	77
<b>Cuadro 18.</b> Concentración de glucosa, insulina e índice HOMA-IR al inicio del tratamiento de resistencia a la insulina en animales con dieta DAGF suplementados con EPPs y NEPPs de orujo de uva	78
<b>Cuadro 19.</b> Concentración de glucosa, insulina e índice HOMA-IR en ratas suplementadas con EPPs y NEPPs de orujo de uva a las 22 semanas del estudio	79
<b>Cuadro 20.</b> Peso corporal y parámetros antropométricos de obesidad al terminar el tratamiento de ratas obesas alimentados con una dieta suplementada con EPPs y NEPPs	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cascada de señalización de la insulina.	17
<b>Figura 2.</b> Compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles.	23
<b>Figura 3.</b> Análisis estadístico multivariante de extractos de orujo de uva en base a compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante, principales fitoquímicos cuantificados e índice de pardeamiento.	58
<b>Figura 4.</b> Índice de pardeamiento de los extractos de orujo de uva almacenados a 60 °C (a), 80 °C (b) y 100 °C (c).	61
<b>Figura 5.</b> Contenido de antocianinas de los extractos de orujo de uva almacenados a 60 °C (a), 80 °C (b) y 100 °C (c).	63
<b>Figura 6.</b> Contenido de proantocianidinas de extractos de orujo de uva almacenados a 60 °C (a), 80 °C (b) y 100 °C (c).	65

## RESUMEN

El orujo de uva es un subproducto de la industria vitivinícola con capacidad para reducir la resistencia a la insulina (RI) debido a su alto contenido de compuestos fenólicos extraíbles (EPPs). Sin embargo, se ha sugerido que los compuestos fenólicos no extraíbles (NEPPs) podrían tener este beneficio, lo cual no ha sido demostrado. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes solventes y ácidos en la separación de EPPs y NEPPs, determinar su estabilidad térmica y perfil fitoquímico, y evaluar el efecto de los NEPPs en el tratamiento de la RI y control de peso corporal. Por lo tanto, primero se identificó las mejores condiciones de extracción de EPPs al variar el tipo de solvente (metanol y etanol), ácido (ácido cítrico y HCl) y concentración de solventes de la primera etapa (2:2, 5:5 y 8:2 v/v) y segunda de extracción (5:5 y 7:3 v/v) de EPP del orujo de uva, siendo EA<sub>HCl</sub>/CeA 8:2/5:5 v/v (etanol:ácido cítrico/ acetona:agua) un solvente apto para obtener un mayor contenido de compuestos fenólicos totales (CFT 26%) y mayor  $t_{1/2}$  de proantocianidinas a 60, 80 y 100 °C que el método convencional MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3 (metanol:ácido clorhídrico/ acetona:agua), en 6, 1.8 y 1.7 veces mayor respectivamente. Posteriormente, las fracciones resultantes (EPPs y NEPPs) del extracto anteriormente mencionado fueron evaluadas *in vivo*. Se trabajó con 4 grupos de ratas Wistar macho: dieta estándar (DE), dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), DAGF-EPPs (al 2.6%) y DAGF-NEPPs (al 1.4 %), a partir de la semana 14 se suplementaron los grupos correspondientes durante 8 semanas. El tratamiento con EPP redujo el peso corporal (9.6 %) y la tasa de ganancia de peso (72 %), la fracción NEPP no tuvo efectos significativos. Sin embargo, ni EPPs ni NEPPs mejoraron significativamente la resistencia a la insulina (HOMA-IR: 22.0 ± 2.01 y 18.51 ± 1.70 respectivamente) con respecto al grupo DAGF (HOMA-IR: 20.28 ± 2.83), sugiriendo que el control de peso corporal está relacionado con la diversidad de compuestos fenólicos en cada fracción, pero no implica un efecto sobre la RI. A pesar del alto contenido de proantocianidinas de los NEPPs (99.56 ± 14.79 mg/g) con respecto al grupo EPPs (31.83 ± 5.03 mg/g) la dosis no fue suficiente para producir un efecto sobre RI y peso corporal.

Palabras claves: Orujo de uva, EPPs, NEPPs estabilidad de EPPs, resistencia a insulina.

## ABSTRACT

Grape pomace is a by-product of the wine industry with the ability to reduce insulin resistance (IR) due to its high content of extractable phenolic compounds (EPPs). However, it has been suggested that non-extractable phenolic compounds (NEPPs) could have this benefit, which has not been proven. The aim of this study was to evaluate the effect of different solvents and acids on the separation of EPPs and NEPPs, determine their thermal stability and phytochemical profile and evaluate the effect of NEPPs in the treatment of IR and body weight control. Therefore, the best extraction conditions of EPPs were first identified by varying the type of solvent (methanol and ethanol), acid (citric acid and HCl) and solvent concentration of the first (2:2, 5:5 and 8:2 v/v) and second extraction stages (5:5 and 7:3 v/v) of EPP from grape pomace, being EA<sub>HCl</sub>/CeA 8:2/5:5 v/v (ethanol: citric acid/acetone:water) a suitable solvent to obtain a higher content of total phenolic compounds (CFT 26 %) and higher t<sub>1/2</sub> of proanthocyanidins at 60, 80 and 100 °C than the conventional method MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3 (methanol:hydrochloric acid/acetone:water), by 6, 1.8 and 1.7 times higher respectively. Subsequently, the resulting fractions (EPPs and NEPPs) were evaluated *in vivo*. Four groups of male Wistar rats were worked with: standard diet (SD), high fat and fructose diet (HFD), HFD-EPPs (2.6%) and HFD-NEPPs (1.4 %). From week 14, the corresponding groups were supplemented for 8 weeks. Treatment with EPP reduced body weight (9.6 %) and weight gain rate (72 %), the NEPP fraction had no significant effects. However, neither EPPs nor NEPPs significantly improved insulin resistance (HOMA-IR: 22.0 ± 2.01 and 18.51 ± 1.70 respectively) with respect to the DAGF group (HOMA-IR: 20.28 ± 2.83), suggesting that body weight control is related to the diversity of phenolic compounds in each fraction, but does not imply an effect on IR. Despite the high proanthocyanidin content of the NEPPs (99.56 ± 14.79 mg/g) compared to the EPPs group (31.83 ± 5.03 m/g), the dose was not sufficient to produce an effect on RI and body weight.

Keywords: Grape pomace, EPPs, NEPPs, EPPs stability, insulin resistance.

## I. INTRODUCCIÓN

La resistencia a la insulina (RI) es una afección en la que las células (principalmente de músculo, hígado y tejido adiposo) muestran una respuesta reducida a esta hormona, lo que contribuye al desarrollo de diabetes tipo II (DMT2), (Pirola *et al.*, 2004; Petersen & Shulman, 2018). Para prevenir estas alteraciones, se ha propuesto consumir fuentes ricas en compuestos fenólicos, como el orujo de uva, el cual contiene compuestos fenólicos extraíbles (EPP) y no extraíbles (NEPP) (Kar *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016). Los EPP son solubles en disolventes orgánicos; mientras que, los NEPP permanecen en el residuo de extracción, unidos a la fibra dietaria o las proteínas (Saura-Calixto & Pérez-Jiménez, 2018).

El método más común de separación de estos compuestos es la maceración sólido-líquido, en el cual el metanol y la acetona se emplean como solventes de extracción (Acosta-Estrada *et al.*, 2014; Pérez-Jiménez *et al.*, 2014). Sin embargo, estos solventes son altamente tóxicos, siendo el etanol una alternativa, ya que presenta una alta solubilidad y menor toxicidad en comparación con esos solventes (Do *et al.*, 2014).

Adicional a una extracción con un alto rendimiento de los compuestos fenólicos es importante identificar la estabilidad de las antocianinas y las procianidinas, componentes relacionados con los beneficios sobre la RI (Yogalakshmi *et al.*, 2014; Belwal *et al.*, 2017; Pascual-Serrano *et al.*, 2017). Estos compuestos bioactivos son termolábiles, por lo que su concentración puede disminuir durante el almacenamiento, conservar la estabilidad de los compuestos fenólicos a temperaturas superiores a la de almacenamiento garantiza un mayor control sobre las dosis administradas y sus efectos benéficos sobre la salud (Dangles *et al.*, 2018; Esparza *et al.*, 2020; Albuquerque *et al.*, 2021; Serea *et al.*, 2022).

Respecto a los beneficios de los EPPs, en estudios preventivos en ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa y suplementadas con 300 mg/kg peso corporal/día de EPP de orujo de uva, los animales han presentado un menor índice HOMA-IR comparado con el grupo con obesidad, siendo 40 % menor en el estudio realizado por Rodríguez-Lanzi y colaboradores (2016);

mientras que, Rodríguez-Lanzi y colaboradores (2020) presentaron un HOMA-IR 70 % menor que el grupo con obesidad con la misma dieta y la dosis administrada. Adicionalmente, estudios en los que se utilizaron extractos como tratamiento de la RI en ratas Wistar alimentadas con una “dieta de cafetería” (35 % grasa y 51 % carbohidratos) y administradas por vía oral con proantocianidinas extraíbles de semilla de uva a una dosis de 25 mg/kg peso corporal/día, presentaron una disminución de la RI del 15%. En otro estudio utilizando el mismo modelo animal (en ratas Wistar alimentadas con una “dieta de cafetería”), el consumo de un extracto de proantocianidinas a diferentes dosis (25 a 200 mg/kg peso corporal/día) no mostró un efecto sobre la RI. Sin embargo, estos últimos autores no presentan una discusión sobre la falta de esta respuesta (Pascual-Serrano *et al.*, 2017; Pascual-Serrano *et al.*, 2018). Estos reportes demuestran que las proantocianidinas (EPPs) en concentraciones menores a 200 mg/kg/día tienen un efecto bajo en la prevención de RI, mientras que administrar el extracto completo de EPPs tiene un mayor efecto benéfico sobre dicha enfermedad

Respecto a NEPPs aislados del orujo de uva y sus efectos sobre la RI, no hay información reportada hasta el momento, no hay información reportada hasta el momento, pero se estima que al estar unidos a fibra dietaria y llegar al llegar al colon, estos compuestos pueden metabolizarse en metabolitos capaces de ejercer un efecto bioactivo sobre el metabolismo de la glucosa (Vitaglione & Fogliano, 2010; Lizarraga *et al.*, 2011). Con el objetivo de realizar una aproximación a estos conocimientos y determinar la participación de EPPs y NEPPs del orujo de uva sobre la RI, nuestro grupo de trabajo realizó estudios con ratas alimentadas con una dieta hipercalórica y suplementadas con orujo de uva (8000 mg de orujo/kg peso corporal/día) de distintas variedades (Malbec, Garnacha y Syrah). Todos los orujos de estas variedades tuvieron un efecto significativo en la prevención de la RI en un 62, 67 y 74 % respectivamente a pesar de las concentraciones contrastantes de EPPs: NEPPs de 1:2 para Malbec, 1:1 para Garnacha y 1:10 para Syrah. Por lo tanto, no fue posible identificar la asociación de estas fracciones de compuestos fenólicos con el beneficio de la RI (Buergo-Martínez, 2023).

Por otro lado, la concentración de los compuestos fenólicos responsables de estos beneficios puede cambiar dependiendo la variedad de la uva, el cultivo, clima y el proceso de vinificación (de la Cerda-Carrasco *et al.*, 2015; Ferri *et al.*, 2017). Esto trae como consecuencia una gran variabilidad en el contenido de dichos bioactivos y el esclarecer la participación de la fracción de NEPPs con respecto a los EPPs es fundamental para la selección de los orujos generados por diferentes regiones y empresas vitivinícolas con el objetivo de ser utilizados para la prevención de esta enfermedad.

Con base a lo anterior, este estudio tuvo como objetivo evaluar la extracción y estabilidad de la fracción de EPP y determinar el efecto de EPPs y NEPPS sobre la prevención de la RI en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.

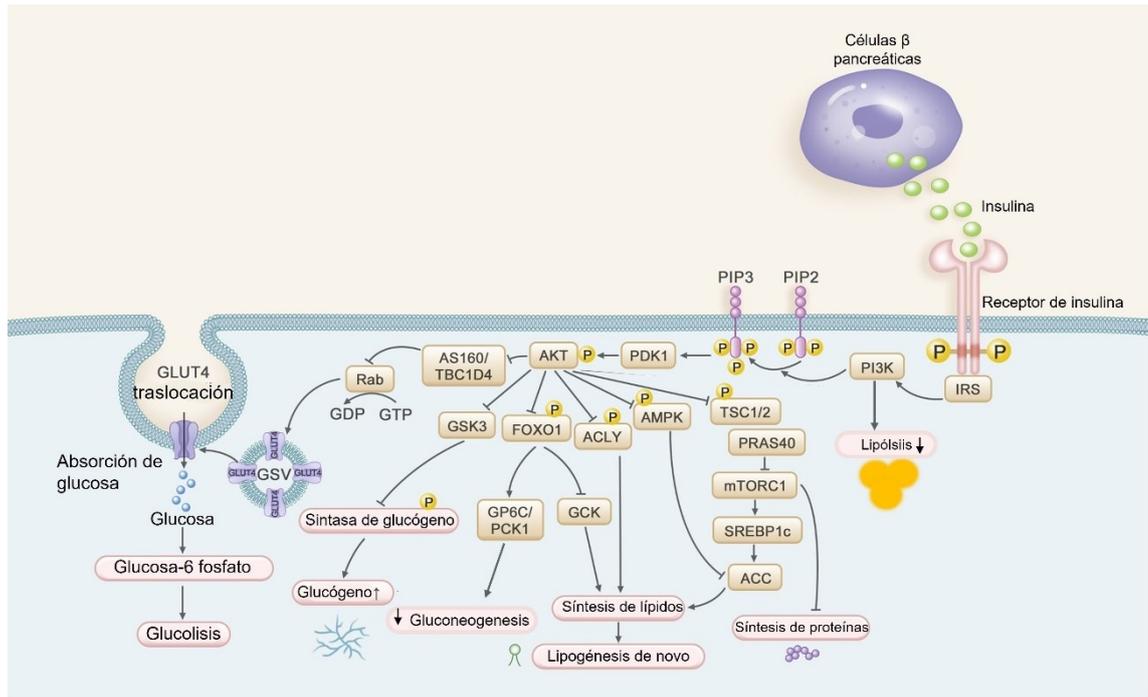
## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Insulina

La insulina es una hormona secretada por las células  $\beta$ -pancreáticas y su síntesis y liberación depende de la concentración de glucosa plasmática. Este carbohidrato se incorpora a las células para ser metabolizado, lo que incrementa los niveles citoplasmáticos de ATP, esto induce el cierre de los canales de  $K_{ATP}$  y la despolarización de la membrana, lo que conlleva a la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  y, por ende, a un aumento de su concentración en el citoplasma. Este aumento de concentración de  $Ca^{2+}$  incrementa la exocitosis y síntesis de la insulina (Komatsu *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2022).

La insulina promueve la absorción de glucosa en tejidos dependientes de esta hormona, como el tejido adiposo y el músculo esquelético; también induce la síntesis de glucógeno, ácidos grasos y triglicéridos. Adicionalmente, la insulina inhibe la síntesis de glucosa hepática y la lipólisis (Moore *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2022).

Para que la insulina pueda activar algunas de las vías anteriormente mencionada, se requiere de la unión de esta hormona a su receptor (IR). Este receptor se autofosforila y fosforila a otras proteínas como el sustrato del receptor de insulina (IRS1), el cual activa la vía de PI3K (fosfatidilinositol-3-OH quinasa) lo que promueve la translocación del transportador de glucosa (GLUT4) a la membrana celular, excepto en aquellos tejidos en los que GLUT4 está ausente, como la glándula mamaria (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2023). A su vez, esta vía inhibe la expresión de enzimas gluconeogénicas disminuyendo la producción de glucosa hepática (Petersen & Shulman, 2018; Khalid *et al.*, 2021) (Figura 1).



**Figura 1.** Cascada de señalización de la insulina (Adaptada de Lee, *et al.*, 2022). IRS: sustrato del receptor de insulina, PI3K: quinasa de fosfatidilinositol 3-OH, PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, PDK1: quinasa-1 dependiente de 3-fosfoinosítido, AKT: proteína quinasa de serina/treonina, AMPK: Proteína quinasa activada por AMP, GSV: vesículas de almacenamiento, GLUT4 transportador de glucosa tipo 4, Rab: pequeñas proteínas que se unen a GTP, AS160: sustrato de AKT de 160 kDa, GSK3: glucógeno sintasa cinasa 3, FOXO1: caja del cabezal de horquilla O1, SREBP1c: proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c, GTP: trifosfato de guanosina, mTORC1: complejo de rapamicina 1, TSC1/2: complejo de esclerosis tuberosa 1/2. ACC: acetil-CoA carboxilasa.

## 2.2. Resistencia a insulina

La resistencia a insulina (RI) se define como la incapacidad de los tejidos a responder a los niveles normales de esta hormona por lo que se requieren mayores concentraciones de la misma para mantener sus funciones normales como la captación de glucosa. Dicha resistencia genera un estado de hiperinsulinemia crónica que, en conjunto con niveles normales de glucosa (menor a 110 mg/dL en ayuno), se clasifica como una condición prediabética (Kahn, 2003; Carmina *et al.*, 2014).

En un estado de RI, la capacidad de esta hormona para activar las cascadas de fosforilación está disminuida, lo que genera una disminución en el transporte de glucosa y una falta de inhibición de la gluconeogénesis, produciendo una mayor concentración de glucosa en sangre (Pirola *et al.*, 2004; Petersen & Shulman, 2018).

Para un estado metabólico saludable se deben mantener los niveles basales de glucosa en un rango de 79.27 a 110 mg/dL y de insulina menores a 15  $\mu$ U/mL (Carmina *et al.*, 2014; Gromova *et al.*, 2021). Para diagnosticar un estado de RI se utiliza ampliamente el índice HOMA-IR, que relaciona la concentración de glucosa e insulina en ayunas (Haffner *et al.*, 1996). En humanos, valores mayores de 3.16 se diagnostican como estados de RI (Keskin *et al.*, 2005).

Otro índice subrogado para medir la RI es el índice de triglicéridos y glucosa, medido en ayuno. Este marcador tiene una alta sensibilidad y especificidad para predecir la RI en diferentes poblaciones, además es un método más simple y menos costoso que el índice HOMA-IR (Ramdas Nayak *et al.*, 2022).

Uno de los principales problemas de la RI es que incrementa el riesgo de desarrollar DMT2, dislipidemias y enfermedad del hígado graso no alcohólico (Pirola *et al.*, 2004; Cerf, 2013).

### **2.3. Prevalencia de diabetes DMT2**

En México, el 15.8 % de la población mayor a los 20 años se ha diagnosticado con diabetes, siendo la segunda causa de muerte en hombres y mujeres en el año 2022 (Chandel, 2021; OPS, 2021; SSA, 2022; INEGI, 2023).

La DMT2 se asocia con un aumento en el riesgo cardiovascular, la enfermedad renal crónica, la retinopatía diabética, las amputaciones de extremidades, entre otras, convirtiéndose en una de las principales causas de discapacidad prematura. Estas condiciones son consecuencias de un alto nivel de glucosa en sangre a largo plazo (Ninomiya, 2014; Bello-Chavolla *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018).

#### **2.4. Tratamientos para la diabetes**

Las estrategias para controlar la DMT2 incluyen desde el ejercicio moderado hasta el consumo de medicamentos. Sin embargo, éstos últimos pueden producir efectos secundarios como hipoglucemia, retención de fluidos y osteoporosis (Ghosh & Parida, 2016; Xu *et al.*, 2018).

Por lo tanto, los productos naturales han incrementado en popularidad para el tratamiento de la DMT2 y entre estos destacan los compuestos fenólicos como el resveratrol y las antocianinas (Beaudoin *et al.*, 2013; Les *et al.*, 2021). Entre otros compuestos fenólicos también utilizados con fines terapéuticos destacan las flavononas como la quercetina, flavanoles como la catequina y ácidos fenólicos como el ácido gálico (Vazquez-Prieto *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2021).

Una fuente importante de estos compuestos fenólicos son los subproductos agroindustriales, entre los que se encuentra el orujo de uva, al cual se ha demostrado que mejora la sensibilidad a la insulina, la salud gastrointestinal y previene las enfermedades cardiovasculares (Pozuelo, 2012; Zhu *et al.*, 2015).

#### **2.5. Orujo de uva**

La uva (*Vitis vinifera*) es la principal especie cultivada para la industria vitivinícola (Mourtzinou & Goula, 2019). En México, las principales entidades que cultivan uva industrial son Zacatecas, Baja California, Aguascalientes, Coahuila, Guanajuato y Querétaro. Específicamente, respecto a la producción de vino, en el país se elaboran 4 millones de cajas anuales, lo que equivale a casi 36 millones de litros de vino, concentrándose el 75% de la producción en Baja California (3 millones de cajas). Mientras que, el 25 % restante se distribuye en Coahuila, Querétaro, Chihuahua, Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas, San Luis Potosí, Puebla, Sonora y Nuevo León (Reyes-Martín, 2020).

Los beneficios socio económicos de la producción de vino han sido sumamente importantes para nuestro país. Sin embargo, durante la elaboración de estos se generan subproductos que representan un 30% de las uvas utilizadas en el proceso de vinificación (Fontana *et al.*, 2013; Mourtzinou & Goula, 2019). En

México se estima la generación de hasta 22.5 mil toneladas de orujo de uva (SIAP, 2022).

Por lo tanto, buscar alternativas de aprovechamiento del orujo de uva puede ayudar a reducir el impacto ambiental de este subproducto. Este tiene una amplia gama de aplicaciones, incluyendo la producción de biocombustibles, la alimentación animal, la fabricación de cosméticos y productos alimenticios (Teixeira *et al.*, 2014).

### 2.5.1. Composición general del orujo

El orujo de uva se compone de semillas (38–52%), piel (5–10%) y tallo (25%) (Nerantzis & Tataridis, 2006; Brenes *et al.*, 2016). Los componentes mayoritarios del orujo son carbohidratos (14.1 a 53.5 g/100 g), proteína (8.5 – 13.9 g/100 g) y grasa (2.1 – 12.5 g/100 g) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

**Cuadro 1.** Composición proximal del orujo de uva

Componentes	Materia seca (g/100 g)	Parte de la uva	Referencias
Humedad	3.33 – 4.31	Orujo completo	(Beres <i>et al.</i> , 2019; Spinei & Oroian, 2021)
	7.06	Semillas	(D'Eusanio <i>et al.</i> , 2023)
Cenizas	7.59	Piel	(Deng <i>et al.</i> , 2011)
	4.52 – 7.59	Mezcla de orujo	(Zhu <i>et al.</i> , 2015; Jin <i>et al.</i> , 2019)
Grasa	2.12 – 12.5	Mezcla de orujo	(Zhu <i>et al.</i> , 2015; Beres <i>et al.</i> , 2019; Jin <i>et al.</i> , 2019)
	3.35	Piel	(Deng <i>et al.</i> , 2011)
Proteína cruda	11.26	Piel	(Deng <i>et al.</i> , 2011)
	8.49 – 13.87	Mezcla de orujo	(Beres <i>et al.</i> , 2019; Jin <i>et al.</i> , 2019; Spinei & Oroian, 2021)
	8.94	Semillas	(D'Eusanio <i>et al.</i> , 2023)
Carbohidratos	14.17 - 29.2	Mezcla de orujo	(Beres <i>et al.</i> , 2019; Spinei & Oroian, 2021)
	79-80	Semillas	(D'Eusanio <i>et al.</i> , 2023)

### 2.5.1. Contenido de fibra de orujo de uva

Las fibras dietéticas (FD) están definidas por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales como los polisacáridos y restos de materiales vegetales resistentes a hidrólisis (digestión) por enzimas digestivas humanas (McCleary *et al.*, 2013). La recomendación de consumo de fibra debe incluir una proporción 1:3 de fracciones solubles e insolubles, respectivamente (Kunzek *et al.*, 2002).

La fibra dietética en el orujo de uva está distribuida en las semillas y tallos, siendo el componente principal del orujo seco y se ha reportado que este contiene de 46.1 a 80% de fibra (Rodríguez-Lanzi *et al.*, 2016; D'Eusanio *et al.*, 2023). La fibra dietética soluble en el orujo está presente entre 1.5 - 9.7 g/100 g, mientras que, la fracción insoluble está en un rango de 14.2-50.8 g/100 g del orujo y en esta se ha cuantificado la lignina (17.4-42.5 g/100 g); la hemicelulosa (0.7-1.3 g/100 g) y la celulosa (30.7-37.0 g/100 g) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Fibra dietaria de orujo de uva

Compuestos fenólicos	Materia seca (g/100 g)	Cultivar	Parte de la uva	Referencias
Fibra dietaria total	53.5	Malbec	Mezcla de orujo	(Zhu <i>et al.</i> , 2015; Rodríguez-Lanzi, <i>et al.</i> , 2016; Beres <i>et al.</i> , 2019; Spinei & Oroian, 2021)
	59.13 46.17 – 75	Merlot Uvas rojas		
	79-80	Uvas rojas	Semillas	(D'Eusanio <i>et al.</i> , 2023)
Soluble	2.7	Malbec	Mezcla de orujo	(Rodríguez-Lanzi <i>et al.</i> , 2016; Beres <i>et al.</i> , 2019; Spinei & Oroian, 2021)
	2.35 – 9.76	Uvas rojas		
	1.51	Merlot	Semillas	(Deng <i>et al.</i> , 2011)
Insoluble	50.8	Malbec	Mezcla de orujo	(Rodríguez-Lanzi <i>et al.</i> , 2016; Beres <i>et al.</i> , 2019; Spinei & Oroian, 2021)
	14.23 -36.4	Uvas rojas		
	49.59	Merlot	Semillas	(Deng <i>et al.</i> , 2011)
Lignina	17.4- 42.53	Uvas rojas	Mezcla de orujo	(Beres <i>et al.</i> , 2019; Spinei & Oroian, 2021)
	28	Merlot	Semillas	(Deng <i>et al.</i> , 2011)
Hemicelulosa	1.34	Merlot	Mezcla de orujo	(Zhu <i>et al.</i> , 2015)
	0.78	Merlot	Semillas	Deng <i>et al.</i> , 2011)
Celulosa	30.7-37	Uvas rojas	Mezcla de orujo	(Spinei & Oroian, 2021)

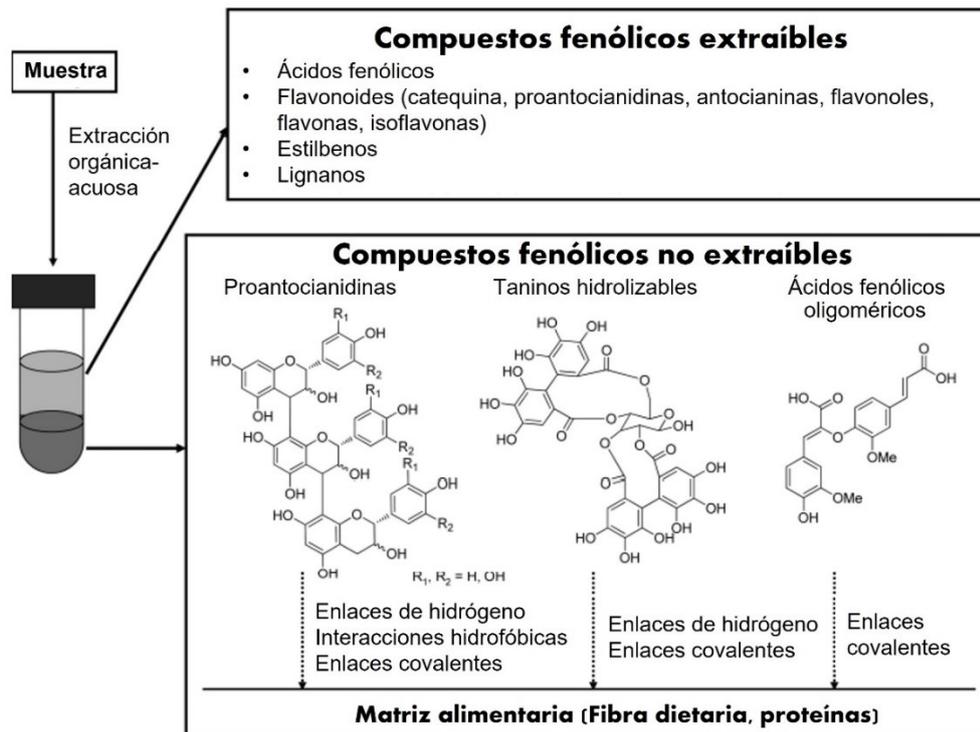
### 2.5.2. Compuestos fenólicos

El orujo de uva se considera rico en compuestos fenólicos y estos se encuentran presentes en un 60-70 % en las semillas y 28-35 % en la piel (Nawaz et al., 2006).

En la composición fenólica del orujo de uva se encuentran dos categorías de compuestos; compuestos fenólicos extraíbles (EPPs) y los compuestos fenólicos no extraíbles (NEPPs). Los EPPs son aquellos que, para ser extraídos, se solubilizan fácilmente mediante disolventes orgánicos y en estos están incluidos los ácidos fenólicos libres o esterificados, los flavonoides, las proantocianidinas de bajo peso molecular, así como los taninos hidrolizables.

Por otro lado, los NEPPs permanecen en los residuos de las extracciones anteriores y en estos se encuentran las proantocianidinas no extraíbles (NEPAs), compuestos fenólicos de menor peso molecular y taninos hidrolizables ligados a los constituyentes de la pared celular, como polisacáridos o proteínas, o bien, atrapados en la matriz alimentaria (Saura-Calixto & Pérez-Jiménez, 2018).

Las NEPAs son polímeros de flavan-3-oles de alto peso molecular, las cuales están libres en la matriz alimentaria. Los polifenoles de menor peso molecular como los ácidos fenólicos están unidos a proteínas o polisacáridos de pared celular. Respecto a los taninos hidrolizables, estos tienen un centro de glucosa u otro poliol esterificado con ácido gálico, llamados galotaninos o con ácido elágico, llamados elagitaninos (Figura 2). Estos NEPPs permanecen en el residuo de la extracción acuosa-orgánica y para extraerse se requiere de una hidrólisis enzimática o química mediante el uso de álcalis o ácidos (Pérez-Jiménez *et al.*, 2014; Cutrim & Cortez, 2018; Pérez-Ramírez *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles (Adaptada de Pérez-Jiménez & Torres, 2011).

### 2.5.3. Compuestos fenólicos extraíbles

Se ha reportado que el contenido de compuestos fenólicos extraíbles del orujo se encuentra en el rango de 3.9 a 72.6 mg/g; mientras que el contenido de compuestos fenólicos no extraíbles es de 107.2 a 114.6 mg/g (Peixoto *et al.*, 2018; Copado-Romero, 2020; Martínez-Meza *et al.*, 2022) (Cuadro 3).

Entre los compuestos fenólicos reportados para el orujo de uva se encuentran los ácidos hidroxibenzoicos (0.17 mg/g) e hidroxicinámicos (0.07 mg/g). Principalmente se han detectado al ácido gálico y siríngico como ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos *p*-cumárico y ferúlico como ácidos hidroxicinámicos (Rodríguez-Lanzi *et al.*, 2018).

Respecto a los flavonoides se han reportado concentraciones entre 18.9-61.7 mg/g, los cuales incluyen a las proantocianidinas (4-19.6 mg/g) y las antocianinas ( $2.25 \times 10^{-3}$ - 4.4 mg/g) (Cuadro 3). De las principales antocianinas detectadas se incluye la malvidina 3-*O*-glucósido y los monómeros de proantocianidinas como la (+)-catequina (-)-epicatequina. Los estilbenos se encuentran en menor

concentración ( $0.23 \times 10^{-3}$ - $2.1 \times 10^{-3}$  mg/g), siendo el resveratrol el más abundante (Rodríguez-Lanzi *et al.*, 2018).

#### **2.5.4. Compuestos fenólicos no extraíbles**

Los NEPPs se encuentran en una proporción de 107.2-114.6 mg/g y en esta fracción se encuentra una alta concentración de compuestos de alto peso molecular, clasificados como NEPA. Estos compuestos están fuertemente unidos a proteínas o polisacáridos de la pared celular en concentraciones de 19.5-85.5 mg/g. Mientras que, los polifenoles hidrolizables se encuentran en una menor cantidad (18.1-23.6 mg/g) (Copado-Romero, 2020; Martínez-Meza *et al.*, 2022) (Cuadro 3).

Es importante mencionar que el contenido de compuestos fenólicos del orujo de uva está determinado por factores como el cultivar de uva, el tipo de suelo, el clima, la ubicación geográfica y el proceso de elaboración de vino (de la Cerda-Carrasco *et al.*, 2015; Ferri *et al.*, 2017). También el componente del orujo analizado como el tallo, la piel y las semillas tienen efecto en la composición, puesto que las semillas tienen una mayor cantidad de compuestos fenólicos (Spinei & Oroian, 2021).

## **2.6. Extracción de compuestos fenólicos**

### **2.6.1. Extracción de compuestos fenólicos extraíbles**

Para recuperar los compuestos EPPs se usa la extracción sólido-líquido, combinando una mezcla de solventes con agua. Comúnmente los solventes utilizados son alcoholes como el metanol y etanol, acetona, éter dietílico y acetato de etilo. El agua se utiliza para facilitar la extracción de compuestos fenólicos extremadamente polares como los ácidos benzoico e hidroxicinámico (Acosta-Estrada *et al.*, 2014; Pérez-Jiménez *et al.*, 2014).

**Cuadro 3.** Compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles en orujos de uva

Compuestos fenólicos	Composición (mg/g)	Variedad	Parte de la uva	Referencias
<b>Extraíbles</b>	4.17-5.38	Uva roja	Mezcla de orujo	(Rodríguez-Lanzi <i>et al.</i> , 2016; Rosenzweig <i>et al.</i> , 2017; Peixoto <i>et al.</i> , 2018; Jin <i>et al.</i> , 2019; de Andrade <i>et al.</i> , 2021; Martínez-Meza <i>et al.</i> , 2021)
	35.80	Merlot		
	41.60 – 72.60	Malbec		
	3.90	Uva roja	Piel	(Peixoto <i>et al.</i> , 2018)
	10.20	Uva roja	Semillas	(Peixoto <i>et al.</i> , 2018)
Ácidos fenólicos	1.34	Uva roja	Mezcla de orujo	(Peixoto <i>et al.</i> , 2018)
	0.45 – 1.92	Syrah & Uva roja	Piel	(Peixoto <i>et al.</i> , 2018; de Andrade <i>et al.</i> , 2021)
	0.60	Uva roja	Semillas	(Peixoto <i>et al.</i> , 2018)
Ácidos hidroxibenzoicos	0.17	Malbec	Mezcla de orujo	(Perdicaro <i>et al.</i> , 2017)
Ácidos hidroxicinámicos	0.06	Malbec	Mezcla de orujo	(Perdicaro <i>et al.</i> , 2017)
Flavonoides	61.35	Malbec	Mezcla de orujo	(Jin <i>et al.</i> , 2019; Martínez-Meza <i>et al.</i> , 2022)
	16.70 – 48.30	Merlot		
	18.96	Syrah		
	28.00	Syrah	Piel	(de Andrade <i>et al.</i> , 2021)
Proantocianidinas	5.78 – 10.48	Malbec	Mezcla de orujo	(Jin <i>et al.</i> , 2019; Martínez-Meza <i>et al.</i> , 2021; Martínez-Meza <i>et al.</i> , 2022)
	7.30 – 19.60	Merlot		
	2.36 – 7.60	Syrah		
Antocianinas	2.25×10 <sup>-3</sup>	Uva roja	Mezcla de orujo	(Perdicaro <i>et al.</i> , 2017; Jin <i>et al.</i> , 2019; Martínez-Meza <i>et al.</i> , 2022)
	1.56-2.86	Malbec		
	0.40-0.80	Merlot		
	0.35-0.49	Syrah		
	7.90×10 <sup>-3</sup>	Uva roja	Piel	(Peixoto <i>et al.</i> , 2018)
	3.40×10 <sup>-5</sup>	Uva roja	Semillas	(Peixoto <i>et al.</i> , 2018)
Estilbenos	2.10×10 <sup>-3</sup>	Malbec	Mezcla de orujo	(Perdicaro <i>et al.</i> , 2017)
	0.23×10 <sup>-3</sup>	Syrah	Piel	(de Andrade <i>et al.</i> , 2021)
<b>No extraíbles</b>	107.16	Merlot	Mezcla de orujo	(Copado-Romero, 2020)
	114.63	Syrah		
Polifenoles hidrolizables	19.79 18.10-19.44 23.61	Malbec Merlot Syrah	Mezcla de orujo	(Copado-Romero, 2020)
Proantocianidinas	40.49 – 64.40 19.60 – 85.49 47.19 – 80.50 26.30 19.53 – 23.17	Malbec Merlot Syrah Quebranta Tempranillo	Mezcla de orujo	(Martínez-Saez <i>et al.</i> , 2019; Jin <i>et al.</i> , 2019; Copado-Romero, 2020; Ramos-Romero <i>et al.</i> , 2020; Martínez-Meza <i>et al.</i> , 2022).

Una de las metodologías más utilizadas incluye en una primera etapa, la extracción de los polifenoles polares como los ácidos fenólicos, con una mezcla de metanol: agua acidificada, seguido de la extracción de polifenoles apolares, como las proantocianidinas, con una mezcla de acetona:agua. La fracción soluble, además de contener EPPs, tiene azúcares solubles, minerales, vitaminas y ácidos orgánicos (Pérez-Jiménez *et al.*, 2014).

### **2.6.2. Extracción de compuestos fenólicos no extraíbles**

Para la extracción de los NEPPs se requieren varias etapas para removerlos debido a su alto peso molecular, estructura compleja y la unión a macromoléculas, principalmente proteínas y fibra (Pérez-Jiménez *et al.*, 2014; Dzah *et al.*, 2020). Esta interacción es fuertemente afectada por la cantidad de galatoninos (taninos hidrolizables simples) en las moléculas fenólicas y su agregación con los polisacáridos. Para hidrolizar estos enlaces se pueden aplicar diferentes métodos como la hidrólisis ácida y alcalina y el uso de enzimas. Actualmente, la hidrólisis ácida es la más utilizada, ya que esta promueve la ruptura de enlaces glucosídicos, pero generalmente deja intactos los enlaces éster (Acosta-Estrada *et al.*, 2014; Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2020).

### **2.6.3. Extractos de compuestos fenólicos de orujo de uva**

Para los extractos de orujo de uva se ha reportado hasta un total de 438.9 mg/g de compuestos fenólicos extraíbles, mientras que para orujo completo una concentración de 64.80 mg/g. En dichos extractos se presenta una cantidad de ácidos fenólicos de 2 a 5.64 mg/g, flavonoides de 2.04 a 74.44 mg/g, encontrando en este último grupo a las antocianinas como mayoritarias (8 a 68.92 mg/g) (Drosou *et al.*, 2015; Gil-Sánchez *et al.*, 2018; Rodriguez-Lanzi *et al.*, 2018). Las concentraciones anteriormente mencionadas se obtuvieron utilizando etanol y metanol como solventes de extracción y con agitación continua o empleando ultrasonido (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Condiciones de extracción de compuestos fenólicos de orujo de uva

Cultivar	Parte de la uva	Condiciones	Compuestos fenólicos	Concentración (mg/g)	Referencias
Malbec	Mezcla de orujos	5 mg de orujo liofilizado + 5 mL de etanol: agua (50:50 v/v) durante 120 min con agitación continua a 60 °C.	<b>Extraíbles</b>	195.10	(Rodríguez-Lanzi <i>et al.</i> , 2016)
Malbec	Mezcla de orujos	500 mg de orujo liofilizado + 5 mL de metanol con ultrasonido por 30 min (agitando cada 5 min).	<b>Ácidos fenólicos</b>	2.00	(Rodríguez-Lanzi <i>et al.</i> , 2018)
			Ácidos hidroxibenzoicos	1.99	
			Ácidos hidroxicinámicos	0.10	
			<b>Flavonoides</b>	74.74	
			Antocianinas	68.92	
			Flavonoles	0.67	
			Flavanoles	5.15	
<b>Estilbenos</b>	8.70 x10 <sup>-2</sup>				
Cabernet Sauvignon	Mezcla de orujos	50 g de orujo + 300 mL metanol con 1% de HCl (1N) a 25 °C por 4 h (3x extracción) con agitación continua.	<b>Flavonoides</b>	10.05	(Ruberto <i>et al.</i> , 2007)
			Antocianinas	9.61	
			Flavonoles	1.04	
Cabernet Sauvignon	Mezcla de orujos	Orujo + etanol:agua acidificada en una relación 1:2, a 40-55 °C por 3-4 horas El solvente tiene una relación 50:50 de etanol:agua (ác. sulfúrico) a pH 1.	<b>Extraíbles</b>	37.40	(Gil-Sánchez <i>et al.</i> , 2018)
			<b>Ácidos fenólicos</b>	5.64	
			<b>Flavonoides</b>	2.04	
			Flavonoles	0.76	
			Flavanoles	1.28	
Uva roja de Alicante	Mezcla de orujos	10 g de orujo + 90 mL etanol agua (30:70 v/v) a 85 °C a vacío con microondas.	<b>Extraíbles</b>	230 – 400	(Boussenna <i>et al.</i> , 2014)
			Antocianinas	8.00 – 45.00	
Agiorgitiko	Mezcla de orujos	1 g orujo + 70 mL etanol: agua (50:50 v/v) en extracción por ultrasonido por 60 min	<b>Extraíbles</b>	438.98	(Drosou <i>et al.</i> , 2015)
			<b>Flavonoides</b>	82.14	
			Proantocianidinas	43.47	
			Antocianinas	34.18	
			Flavonoles	4.48	

La elección del solvente y la proporción de agua utilizada influyen significativamente en la eficiencia del proceso de extracción. En particular, las investigaciones indican que una mezcla de solventes con un 50 % a 70 % de etanol puede mejorar sustancialmente la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos totales (Drosou *et al.*, 2015; Rodríguez-Lanzi *et al.*, 2016).

La acidez del medio de extracción juega un papel crucial en la eficiencia del proceso de extracción de los polifenoles, ya que afecta directamente la estabilidad y la solubilidad de los flavonoides (Ruberto *et al.*, 2007; Rodríguez-Lanzi *et al.*, 2018). El aumento de la acidez favorece la extracción de ácidos fenólicos y fenoles totales junto con una mayor capacidad antioxidante de los extractos a bajas concentraciones, pero un incremento de la concentración del ácido en el solvente de extracción también tiene el potencial de inducir la hidrólisis de flavonoides glucosilados (Putnik *et al.*, 2016). Este proceso puede modificar sustancialmente la estructura química de los flavonoides y, por consiguiente, alterar su bioactividad (Hollman, 2004). Por otro lado, las condiciones alcalinas presentan sus propios desafíos en la extracción de flavonoides, ya que en un medio básico, ciertos flavonoides son susceptibles a la oxidación (Biesaga, 2011). Dada la complejidad de estos fenómenos es crucial seleccionar cuidadosamente un rango de pH apropiado para la extracción de flavonoides específicos. La elección del pH debe basarse en un equilibrio entre maximizar la solubilidad de los compuestos de interés y minimizar las reacciones no deseadas como la hidrólisis o la oxidación.

### **2.1. Estabilidad de los extractos de compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos extraídos del subproducto de la vinificación tienen diferentes beneficios a la salud y deben permanecer estables para ejercer dicha actividad. La temperatura es un factor clave que puede afectar la estabilidad de estos compuestos (Esparza *et al.*, 2020). Su estabilidad está estrechamente relacionada con sus estructuras químicas específicas.

La presencia de grupos funcionales capaces de formar enlaces de hidrógeno, como el grupo carboxilo en los ácidos fenólicos, incrementa significativamente la

estabilidad térmica de estas moléculas (Kumar y Goel, 2019). Esta interacción intermolecular refuerza la estructura, dificultando la ruptura de enlaces y la degradación térmica. Estudios recientes han corroborado la alta estabilidad térmica del ácido gálico, incluso bajo condiciones de almacenamiento prolongado (Esparza *et al.*, 2020). En contraste, los flavonoides, particularmente las antocianinas, presentan una menor estabilidad térmica debido a la presencia de múltiples grupos hidroxilo que los hacen susceptibles a reacciones de oxidación, hidrólisis y polimerización a altas temperaturas (Sui *et al.*, 2014; Dangles *et al.*, 2018; Lončarić *et al.*, 2018; Esparza *et al.*, 2020; Albuquerque *et al.*, 2021).

Estudios realizados con extractos de orujo de uva han demostrado que la degradación de sus compuestos fenólicos sigue una cinética de degradación de primer orden (Sólyom *et al.*, 2014; Serea *et al.*, 2022), lo que indica que estos compuestos presentan una estabilidad térmica disminuida cuando se someten a temperaturas elevadas, por lo que el uso de solventes acidificados puede promover la obtención de mezclas complejas de compuestos fenólicos que contengan estructuras térmicamente estables. Un estudio sobre la estabilidad de un extracto de piel de uva, obtenido por sonicación con etanol al 96 % y 1 mL de HCl 0.1 N durante 55 min a 50 °C, reveló que tanto la temperatura, como el tiempo del calentamiento, afectan significativamente el contenido de compuestos bioactivos entre 80 y 140 °C. Después de 10 minutos de calentamiento, se observó una pérdida del 6 % de antocianinas a 80 °C, mientras que a 140 °C la pérdida fue del 28 %. Consecuentemente, la actividad antioxidante del extracto disminuyó en un 1 y 18%, respectivamente, atribuible a la reducción en la concentración de malvidina 3-O-glucósido (Serea *et al.*, 2022).

Por otro lado, Sólyom y colaboradores (2014) extrajeron EPPs de orujo de uva mediante maceración con etanol:agua acidificada a pH 1 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a una temperatura de 40 °C durante 24 h. Dicho extracto se sometió a condiciones de 80, 100 y 150 °C por 240 min, no se observaron cambios en el contenido de compuestos fenólicos totales a 80 y 100 °C y la capacidad antioxidante permaneció intacta a 80 °C. Resultados no esperados fueron los obtenidos a 100 y 150 °C, donde se registró un aumento de la capacidad antioxidante después

de 60 min de calentamiento, inversamente proporcional a la degradación de las antocianinas. Esto sugiere que la capacidad antioxidante de los extractos no depende exclusivamente del contenido de antocianinas.

Resultados similares fueron reportados por Davidov-Pardo *et al.* (2011), quienes utilizaron un extracto comercial de semillas de orujo de uva disuelto en soluciones hidroalcohólicas (4 % v/v). Este extracto se sometió a 60, 90 y 120 °C hasta por 1 hora, no se observaron efectos sobre su capacidad antioxidante. Sin embargo, al final del tratamiento se identificó un aumento en la concentración de procianidinas y ácido gálico y un decremento en el contenido de catequina y epicatequina, lo que sugiere que la capacidad antioxidante de este extracto no depende de la concentración de catequina y epicatequina.

## **2.2. Estudios de orujo de uva y resistencia a insulina**

En los últimos años se han realizado diferentes estudios que demuestran el efecto benéfico del orujo de uva sobre la RI.

### **2.2.1. Estudios con orujo de uva**

Ratones alimentados durante 9 semanas con una dieta alta en grasa (el 60 % del total de calorías proviene de ácidos grasos, el 18.4 % de proteínas y el 21.3 % de carbohidratos) y suplementada con piel de orujo de uva a una concentración de 50 mg/día presentaron una mejora del 77 % en los niveles de insulina sérica con valores de 0.4 ng/mL comparado con 1.75 ng/mL del grupo obeso y 0.25 ng/mL del grupo sano (Rosenzweig *et al.*, 2017).

A su vez, ratas Wistar alimentadas durante 6 semanas con una dieta alta en grasa y fructosa (20 % de grasa y 20 % de fructosa) y suplementadas con orujo (1000 mg/kg peso corporal/día) presentaron una disminución parcial de un 21 % de la RI, cuantificada con una HOMA:IR de 4.3 comparado con 5.5 en el grupo obeso y una disminución del 30 % de la insulina sérica (1.23 ng/mL y 1.75 ng/mL, respectivamente). Los valores reportados en el grupo sano en la insulina sérica y HOMA:IR fueron 1.11 ng/mL y 3.6 respectivamente, lo que indica que la RI en

el grupo tratado fue aún mayor en un 19% respecto al grupo sano (Rodríguez-Lanzi *et al.*, 2016).

Dichos resultados son similares a los obtenidos por Perdicaro *et al.* (2017), quienes evaluaron el consumo de orujo a 1000 mg/kg peso corporal/día en ratas Wistar alimentadas durante 6 semanas con una dieta alta en grasa y fructosa (20 % de grasa bovina y 20 % de fructosa). La insulina sérica en las ratas tratadas disminuyó en un 26 % ( $1.25 \pm 0.10$  ng/mL) con respecto al grupo obeso ( $1.70 \pm 0.04$  ng/mL). Mientras que, la RI fue 22 % menor en el grupo tratado comparado con el grupo obeso (HOMA:IR de  $4.2 \pm 0.8$  vs  $5.4 \pm 0.6$  mg/dL \* $\mu$ U/mL). El grupo sano presentó valores de insulina sérica y HOMA:IR de 1.10 y 3.5 mg/dL \* $\mu$ U/mL respectivamente, siendo la RI hasta un 20% más alta en el grupo tratado comparado con el grupo sano.

En un estudio clínico realizado con pacientes con al menos dos criterios de síndrome metabólico y tratados con 8 g/día de orujo suspendido en agua durante 6 semanas presentaron una disminución significativa del índice HOMA:IR hasta valores normales (1.4 mg/dL\* $\mu$ U/mL) con respecto al grupo control (2.1), lo que representa una disminución del índice HOMA:IR del 44 % (Martínez-Maqueda *et al.*, 2018).

Estudios realizados en nuestro grupo de trabajo con ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa (20 % manteca de cerdo, 20 % fructosa) y suplementadas con 1 g de orujo/kg de diferentes variedades de uva (Malbec, Garnacha y Syrah) durante 15 semanas presentaron una disminución significativa de la RI para todos los grupos tratados (HOMA:IR, 6.2-9.1), siendo estos valores similares al grupo sano (HOMA:IR 3.9); mientras que, el grupo con obesidad presentó un valor de HOMA:IR de 24.3. Las variedades administradas presentaban una relación de compuestos EPPs: NEPPs de 1:2 para Malbec, 1:1 para Garnacha y 1:10 para Syrah (Martínez-Meza, 2023). Por lo tanto, no fue posible identificar la participación de cada una de estas fracciones en el beneficio de la RI.

En estos estudios se ha demostrado que el orujo de uva tiene un efecto preventivo en el desarrollo de la RI en modelos animales y como tratamiento en

humanos, presentando efectos significativos en la disminución del índice HOMA:IR en un 21-100 % (Rodríguez-Lanzi *et al.*, 2016; Rosenzweig *et al.*, 2017). Sin embargo, con el objetivo de identificar los compuestos responsables del beneficio de la RI se han realizado estudios con extractos de orujo.

### **2.2.2. Estudios con extractos de orujo de uva**

La fracción de compuestos fenólicos extraíbles ha sido la más estudiada respecto a sus beneficios asociados a la resistencia a insulina. Por ejemplo, ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa (20 % de grasa y 20 % de fructosa) y suplementada con 300 mg/kg de extracto de uva durante 6 semanas presentaron una mejora del 40% en la insulina sérica (1.05 ng/mL) con respecto al grupo con obesidad (1.75 ng/mL) y una disminución significativa del 40 % de la RI (HOMA:IR 3.3 vs 5.5) (Rodríguez-Lanzi *et al.*, 2016). Un estudio posterior realizado por los mismos autores reportó una disminución de la RI en un 70 % utilizando un extracto de orujo administrado a una concentración de 300 mg/kg por 6 semanas a ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (Rodríguez-Lanzi *et al.*, 2020). Estos resultados mostraron un efecto significativo en la reducción de la RI en un 40-70 % con dosis de 300 mg/kg de EPPs.

Específicamente, un extracto de proantocianidinas de las semillas de uva fue administrado a ratas Wistar macho a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal por 11 semanas. Los animales fueron alimentados con una “dieta de cafetería” (14 % de proteínas, 35% de grasas y 51% de carbohidratos); la IR disminuyó en un 13 % comparado con el grupo con obesidad (58.14 vs 66.93) (Pascual-Serrano *et al.*, 2017). Sin embargo, una mayor concentración administrada de proantocianidinas extraídas de las semillas de uva en ratas alimentadas con una “dieta de cafetería” (14 % de proteínas, 35% de grasas y 51% de carbohidratos) por 12 semanas (100 y 200 mg/kg) no mostró efectos significativos en el índice HOMA-IR (Pascual-Serrano *et al.*, 2018).

Por otro lado, ratas Wistar macho alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa (45 % de fructosa, 20 % de y 22,5 % de caseína) fueron suplementadas durante 15 días con un extracto de proantocianidinas de semilla de uva (100

mg/kg peso corporal al día), lo que resultó en una disminución del 56% del índice HOMA-IR en comparación con el grupo con obesidad (Yogalakshmi *et al.*, 2014). En otro estudio, Montagut *et al.* (2010) utilizaron ratas Wistar hembra con obesidad inducida por una “dieta de cafetería” que incluía tocino, dulces, galletas con paté, queso, magdalenas, zanahorias y leche azucarada (No reportan en que proporciones se mezcló cada alimento) y estas fueron tratadas con un extracto de proantocianidinas de semilla de uva a dosis de 25 y 50 mg/kg peso corporal al día durante 10 y 30 días. Al final del período de 30 días se observó una disminución del 54 % y 40 % de RI, respectivamente, en comparación con el grupo obeso.

Estos estudios demuestran que las proantocianidinas extraíbles tienen un efecto sobre la RI en períodos cortos, siendo mayor el efecto obtenido con una administración completa del extracto EPP. Sin embargo, la fracción de NEPPs no ha sido estudiada, y sus componentes, al ser metabolizados por la microbiota, podrían generar productos que disminuyan la RI. Por lo tanto, se requieren estudios que determinen la participación de NEPPs del orujo de uva en el control de la RI y comparen dichos efectos con los EPPs. Con estos resultados se podría utilizar esta composición para seleccionar los orujos con mayor potencial para el control de esta patología.

### III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, el interés por dietas con alto contenido de compuestos fenólicos ha aumentado de manera significativa debido a sus beneficios para el control de la DM2, la cual es precedida por la RI. Los compuestos fenólicos derivados de algunos subproductos agroindustriales, como el orujo de uva son una alternativa en el control y prevención de dicha enfermedad. Su relevancia radica en el alto contenido y diversidad de estos compuestos bioactivos.

El orujo de uva es un subproducto de la industria vinícola, el cual se genera en grandes cantidades y es una fuente de contaminación ambiental. Sin embargo, este subproducto es rico en compuesto fenólicos extraíbles y no extraíbles, que en conjunto, han sido asociados a un efecto benéfico en la RI. Estos beneficios han sido estudiados en la fracción extraíble, que contiene ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y proantocianidinas. Sin embargo, el orujo presenta altas concentraciones de compuestos fenólicos no extraíbles. Se ha sugerido que esta fracción también tiene un potencial para el tratamiento de la RI, pero sus beneficios no han sido demostrados.

Se ha reportado que la abundancia de los compuestos fenólicos, tanto extraíbles como no extraíbles, pueden cambiar en los orujos de uva dependiendo del cultivo, la etapa de madurez del fruto, su cosecha, así como las condiciones del proceso de elaboración del vino. Dicha variación en su composición es una de las principales limitaciones en el uso del orujo con fines terapéuticos.

En nuestro grupo de trabajo al estudiar orujos de diferentes variedades de uva (Syrah, Tempranillo y Garnacha) se ha demostrado que una proporción de EPPs y NEPPs de 1:1 (52:55 mg/g de orujo variedad Garnacha) produce un beneficio en la RI similar a una proporción de EPPs y NEPPs de 1:10 (16:111 mg/g de orujo variedad Syrah). Por lo tanto, no se ha podido esclarecer la participación de los compuestos no extraíbles o ligados en el control de la RI y es fundamental comparar su respuesta con la generada por la fracción extraíble. Una vez determinada la importancia de los compuestos fenólicos ligados se pretende emplear esta información para seleccionar los orujos generados por estas empresas vitivinícolas con mayor potencial para el tratamiento de la RI.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de diferentes solventes y ácidos en la extracción de los compuestos fenólicos extraíbles de los no extraíbles del orujo de uva, determinar su estabilidad térmica y perfil fitoquímico, y analizar su impacto sobre la resistencia a la insulina y control de peso corporal en un modelo de obesidad inducida por dieta hipercalórica.

### **4.2. Objetivo Específico**

- Determinar el efecto de solventes y ácidos sobre la eficiencia de separación de los compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles del orujo de uva.
- Determinar la estabilidad térmica de las antocianinas y proantocianidinas así como el perfil fitoquímico de los extractos del orujo de uva con mayor eficiencia de extracción.
- Evaluar el efecto del tratamiento de los compuestos fenólicos libres y ligados del orujo de uva sobre la resistencia a insulina y control de peso corporal en un modelo de obesidad inducida por dieta hipercalórica.

## **V. METODOLOGÍA**

### **5.1. Materiales**

#### **5.1.1. Animales**

Se trabajó con ratas Wistar macho de seis semanas de edad (48 animales), con peso de 160-180 g, procedentes del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, Campus Juriquilla). Las ratas se alojaron dentro de un espacio confinado para animales de experimentación en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), dentro de jaulas individuales de 258 cm<sup>2</sup> de acero inoxidable, las cuales permitieron la entrada de aire y luz. De igual manera, los animales se mantuvieron bajo condiciones ambientales estándar, ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h, condiciones de humedad del 55 ± 15 % y temperatura de 23 ± 2 °C durante una semana de adaptación. Durante esta semana las ratas se alimentaron con dieta estándar

comercial (Rodent Lab Chow 5001, PMI, USA) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las Regulaciones Federales para la Experimentación y Cuidado de Animales (SAGARPA, 1999) y al Comité de Bioética de la Facultad de Química (UAQ) (Anexo 1).

### **5.1.2. Material vegetal**

Se utilizó orujo de uva de la variedad Syrah del viñedo "Azteca", localizado en Ezequiel Montes, Qro., y recolectado en 2022. Las muestras se secaron en un deshidratador de aire forzado a  $45 \pm 2$  °C y una velocidad de aire de 1.0 m/s por 5 h. Posteriormente, el orujo fue molido y tamizado, empleando un tamiz del número 40.

### **5.1.3. Análisis microbiológico de orujo de uva**

Se realizó una dilución 1:10 de orujo de uva con diluyente estéril (agua peptonada) a temperatura ambiente y se homogenizó por 2 min. Se dejó sedimentar y se mezcló 1 mL de la suspensión con 9 mL de agua peptonada en un tubo de ensayo. Se realizaron 4 diluciones por tratamiento y se consideraron los límites permisibles para ensaladas verdes (crudas o de frutas) de acuerdo con la NOM-093-SSA1-1994.

#### **5.1.3.1. Determinación de bacterias mesófilas aerobias**

La determinación se realizó como se indica en la NOM-110-SSA1-1994. Se colocó 1 mL de la dilución en una placa de Petri en un volumen de 15 a 20 mL de agar triptona y se mezcló. Las cajas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 3, 4 y 5 días. Los resultados se reportaron en unidades formadoras de colonias (UFC/g de extracto liofilizado).

#### **5.1.3.2. Determinación de coliformes totales y fecales**

La determinación se realizó según lo indicado en la NOM-210-SSA1-2014; se realizaron diluciones 1:10 en tubos con caldo lauril triptosa (al menos 3 diluciones consecutivas por cada dilución); se homogeneizaron durante 15 a 20 min. Los tubos se incubaron a  $35 \pm 0.5$  °C durante 24 h y se observó la formación de gas; si no existía gas, se dejaron incubar otras 24 h. Los cálculos de la concentración

de coliformes se basaron en la norma. Los resultados se reportaron en unidades formadoras de colonias (UFC/g).

### **5.1.3.3. Determinación de hongos y levaduras**

La determinación se realizó según lo indicado en la NOM-110-SSA1-1994. Se colocó 1 mL de la dilución primaria en una placa de Petri en un volumen de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado y se mezcló cuidadosamente en movimientos de derecha a izquierda. Las cajas se incubaron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  durante 24 h, las colonias se contaron después de 3, 4 y 5 días de incubación. A los 5 días se seleccionaron aquellas que contenían entre 10 y 150 colonias. Los resultados se reportaron en unidades formadoras de colonias (UFC/g).

## **5.2. Selección de las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos**

### **5.2.1. Preparación de extractos**

En la primera etapa se establecieron las condiciones para obtener una mayor extracción de EPPs, con la finalidad de que el precipitado (NEPPs) quedara con un menor contenido de estos compuestos extraíbles.

Para obtener los EPPs se utilizaron doce mezclas con un diseño multifactorial mixto para la primera extracción, empleando diferentes proporciones de solvente:agua acidificada. El orujo de uva (0.5 g) se mezcló con 20 mL de solvente:agua acidificada en diferentes relaciones: 2:8, 5:5 y 8:2, v:v, pH 2. El pH se ajustó con diferentes ácidos: cítrico o HCl (Cuadro 5). Se agitó vigorosamente la mezcla durante 1 h y posteriormente se centrifugó a  $2500 \times g$  durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y al residuo se le añadió 20 mL de una solución acetona/agua (70:30, v/v) repitiendo las condiciones de agitación y centrifugación. Los dos sobrenadantes se combinaron (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Los sobrenadantes corresponden a la fracción de compuestos fenólicos extraíbles (EPPs). Al residuo recuperado se le denominó la fracción de compuestos fenólicos no extraíbles (NEPPs).

**Cuadro 5.** Mezclas de solventes utilizados en la primera etapa de extracción de EPPs de orujo de uva

Acrónimo	Primera extracción			Segunda extracción
	Solvente	Agua acidificada	Solvente:agua	Relación acetona:agua
MA <sub>HCl</sub> /CeA 2:8/7:3	Metanol	HCl	2:8	7:3
MA <sub>HCl</sub> /CeA 5:5/7:3	Metanol	HCl	5:5	7:3
MA <sub>HCl</sub> /CeA 8:2/7:3	Metanol	HCl	8:2	7:3
MA <sub>Ac</sub> /CeA 2:8/7:3	Metanol	Cítrico	2:8	7:3
MA <sub>Ac</sub> /CeA 5:5/7:3	Metanol	Cítrico	5:5	7:3
MA <sub>Ac</sub> /CeA 8:2/7:3	Metanol	Cítrico	8:2	7:3
EA <sub>HCl</sub> /CeA 2:8/7:3	Etanol	HCl	2:8	7:3
EA <sub>HCl</sub> /CeA 5:5/7:3	Etanol	HCl	5:5	7:3
EA <sub>HCl</sub> /CeA 8:2/7:3	Etanol	HCl	8:2	7:3
EA <sub>Ac</sub> /CeA 2:8/7:3	Etanol	Cítrico	2:8	7:3
EA <sub>Ac</sub> /CeA 5:5/7:3	Etanol	Cítrico	5:5	7:3
EA <sub>Ac</sub> /CeA 8:2/7:3	Etanol	Cítrico	8:2	7:3

En las fracciones obtenidas de los extractos polifenólicos (EPPs) se cuantificaron los compuestos fenólicos totales (CFT), las antocianinas y las proantocianidinas. Basándose en estos resultados, se seleccionó el solvente y el ácido más adecuados para la primera etapa de extracción.

Una vez elegidas las condiciones de la primera extracción en función de los mayores rendimientos para los diferentes componentes de los EPPs, se evaluaron dos proporciones de acetona en la segunda etapa (50:50 y 70:30 v/v) (Cuadro 6), esto con el objetivo de evaluar si se podría disminuir el contenido de acetona, sin disminuir el rendimiento de extracción de los EPPs. Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), las antocianinas y las proantocianidinas extraíbles (EPA), además de algunos compuestos fenólicos específicos mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC).

**Cuadro 6.** Mezclas de solventes utilizados en la primera y segunda etapa de extracción de EPPs de orujo de uva

Acrónimo	Primera extracción			Segunda extracción
	Solvente	Agua acidificada	Solvente:agua	Relación acetona:agua
MA <sub>HCl</sub> /CeA 5:5/5:5	Metanol	HCl	5:5	5:5
MA <sub>HCl</sub> /CeA 5:5/7:3	Metanol	HCl	5:5	7:3
EA <sub>HCl</sub> /CeA 8:2/5:5	Etanol	HCl	8:2	5:5
EA <sub>HCl</sub> /CeA 8:2/7:3	Etanol	HCl	8:2	7:3
EA <sub>c</sub> /CeA 5:5/5:5	Etanol	Cítrico	5:5	5:5
EA <sub>c</sub> /CeA 5:5/7:3	Etanol	Cítrico	5:5	7:3

Una vez determinada la condición óptima, esta condición se utilizó para realizar las extracciones necesarias en el residuo hasta que el contenido de compuestos fenólicos totales fuera el mínimo y posteriormente ambas fracciones fueron liofilizadas. Los EPPs y NEPPs liofilizados se caracterizaron en cuanto a compuestos fenólicos totales, flavonoides, antocianinas y proantocianidinas en la fracción EPPs y compuestos fenólicos extraíbles totales, no extraíbles totales, polifenoles hidrolizables y proantocianidinas no extraíbles en la fracción NEPP. Finalmente, se caracterizó su contenido de polifenoles mediante HPLC-PDA y se realizó el análisis microbiológico de bacterias mesófilas totales, coliformes y hongos y levaduras.

### 5.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales extraíbles

La determinación de compuestos fenólicos totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Se colocaron 45 µL de agua destilada en una placa y se añadieron 5 µL del extracto de compuestos fenólicos, el cual se diluyó en una proporción 1:9 (v), seguido de 25 µL del reactivo Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reposar por 5 min en la oscuridad y se le añadió 125 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%). La placa se agitó a temperatura ambiente por 30 min y la absorbancia se a 765 nm en un espectrofotómetro.

La cuantificación se realizó con una curva de calibración utilizando un estándar de ácido gálico (0 a 0.8 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de muestra (Singleton *et al.*, 1999).

### 5.2.2.1. Cuantificación de antocianinas monoméricas extraíbles

La determinación de antocianinas monoméricas se realizó por el método de pH diferencial. Se mezclaron 175 µL de una solución amortiguadora de cloruro de potasio (KCl 0.025 N a pH 1.0) y en un pozo diferente se adicionaron 175 µL de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.4 M a pH 4.5). A cada pozo se le adicionaron 50 µL del extracto de compuestos fenólicos y se leyeron las absorbancias de ambos pozos a 510 nm y 700 nm.

El contenido de antocianinas monoméricas se calculó a partir de la diferencia entre las absorbancias con ambas longitudes de onda y ambos pHs (Giusti & Wrolstad, 2003). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de malvidina 3-O-glucósido/g de muestra a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Absorbancia total} = (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH 1.0}} - (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH 4.5}}$$

$$\text{Antocianinas totales} = \text{Absorbancia total} \cdot 1000 \cdot \text{PM} \cdot \text{FD} / \epsilon \cdot d$$

Donde:

Abs: Absorbancia

PM: Peso molecular de malvidina 3-O-glucósido (463.3 g mol<sup>-1</sup>)

FD: Factor de dilución (4.5)

ε: coeficiente de extinción molar de la malvidina 3-O-glucósido (28000 L mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

d: longitud de recorrido óptico (0.7 cm).

### 5.2.2.2. Cuantificación de flavonoides

El contenido total de flavonoides de los extractos se cuantificó utilizando el método colorimétrico descrito por Heimer *et al.* (2006). Se adicionaron 40 µL de los extractos con 7.5 µL de una solución de nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub> al 5 %). Posteriormente se mezclaron con 15 µL de una solución recién preparada de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub> al 10 %) y 50 µL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH 1 M). El volumen final de la mezcla se ajustó a 250 µL con agua

desionizada. La mezcla permaneció en reposo por 30 min a temperatura ambiente y se leyó a una absorbancia de 510 nm.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando una curva de calibración utilizando como estándar una solución de (+)-catequina (0.002-0.009 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina (EC)/g de muestra (Heimler *et al.*, 2006)

### **5.2.2.3. Cuantificación de proantocianidinas extraíbles**

Se utilizaron 5 mL del extracto y este se aforó a 10 mL con una solución de butanol/HCl (97.5:2.5 v/v) con 7 g de cloruro de hierro (III) ( $\text{FeCl}_3$ ) y se colocó en un baño de agua a 100 °C por 1 h. Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del extracto hidrolizado y se colocó en un pozo de una placa. Se leyeron las absorbancias a 450 y 555 nm en un espectrofotómetro (Multiscan GO, ThermoScientific) (Pérez-Jiménez *et al.*, 2009). Se utilizó la curva reportada por Zeng *et al.* (2012) y los resultados se expresaron como mg de proantocianidinas (PA)/g de muestra.

### **5.2.3. Compuestos fenólicos no extraíbles**

#### **5.2.3.1. Extracción y cuantificación de proantocianidinas no extraíbles (NEPA)**

Se utilizaron 0.2 g del residuo del apartado 6.2.1, de la condición seleccionada y se añadieron 4 mL de una solución de butanol/HCl (97.5:2.5 v/v) con 7 g de cloruro de hierro (III) ( $\text{FeCl}_3$ ) y se sometieron a hidrólisis a 100 °C por 1 h. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3000  $g$  por 10 min a 5 °C y se recuperó el sobrenadante. El residuo se lavó con 2 mL de la solución butanol/HCl/ $\text{FeCl}_3$  con agitación por 30 s y se centrifugó a 3000  $\times g$  por 10 min. Este sobrenadante se mezcló con el primero y se lavó el residuo 2 veces consecutivas. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron y se aforaron a 10 mL con la solución de butanol/HCl/ $\text{FeCl}_3$ . En una placa se añadió 190  $\mu\text{L}$  de la solución butanol/HCl/ $\text{FeCl}_3$  y 10  $\mu\text{L}$  del extracto hidrolizado. Se leyeron las absorbancias a 450 y 555 nm (Pérez-Ramírez *et al.*, 2009). Se utilizó la curva reportada por Zurita *et al.* (2012) y los resultados se expresaron como mg de proantocianidinas (PA)/g de muestra.

### **5.2.3.2. Extracción y cuantificación de polifenoles hidrolizables**

Se mezclaron 0.1 g del residuo del apartado 6.2.1.1 con 2 mL de metanol (grado reactivo) y ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, en una relación 90:10) y se incubaron los tubos por 20 h a 85 °C con agitación constante. Se enfriaron los tubos y se sometieron a centrifugación por 10 min a 4500 g. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un matraz aforado de 50 mL. El residuo se lavó 2 veces con 10 mL de agua destilada, repitiendo la centrifugación y el sobrenadante resultante se mezcló con los anteriores. El volumen final se ajustó a 50 mL con agua destilada y pH de 5.5 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido. La cantidad de polifenoles hidrolizables se midió con el método Folin-Ciocalteu descrito en el apartado 6.2.1.2 (Singleton *et al.*, 1999).

### **5.2.4. Identificación de compuestos fenólicos extraíbles por HPLC-DAD**

Los EPPs obtenidos al modificar ambas etapas de extracción (Cuadro 6) se identificaron al concentrar 1 mL de las muestras a vacío (Speedvac, Thermo Fisher Scientific) durante 12 h a 0.12 bar y 45 °C. A continuación, se resuspendieron en 200 µL de metanol de grado HPLC y se filtraron (0.45 µm, Whatman PVDF, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (Acquity Arc, Waters Corp, USA). Se utilizó una columna C18 Bridge BEH Shield RP18 (130 Å, 3.5 µm, 4.6 mm x 100 mm) (Waters Corp) a 30 °C. La fase móvil consistió en agua con 0.1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (B) a un flujo de 0.5 mL/min. Las condiciones de gradiente fueron las siguientes: 15% B a los 2.5 min, 21% B a los 10 min, 90% B a los 12 min, 95% B a los 13 min, y finalmente 0% B a los 15 min durante 2 min (Kammerer *et al.*, 2004).

La cuantificación de compuestos se realizó mediante curvas de calibración (0.5 – 2 µg/mL) con ácido gálico (ácido hidroxicinámico); ácido elágico (ácido hidroxibenzoico); quercetina (flavonol); catequina, epicatequina y galato de epicatequina (flavanoles); naringina (flavona) y cloruro de cianidina (antocianina). También se cuantificaron metabolitos como el ácido 3,4-hidroxifenilpropiónico, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético, el ácido 4-

hidroxibenzoico, el ácido 3,4-dihidroxibenzoico y el ácido 3-hidroxibenzoico mediante curvas de calibración (0.5 – 2 µg/mL) con los estándares correspondientes. Los estándares se obtuvieron de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). El detector de arreglo de diodos se configuró a 260 nm, 280 nm, 320 nm y 535 nm para la detección de ácidos fenólicos, flavanoles, flavanonas y antocianinas, respectivamente. Los resultados se analizaron utilizando el software Empower (Waters Corp, USA) y se expresaron en µg/g de la muestra.

#### **5.2.5. Identificación de compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles por UPLC de los extractos administrados en el modelo animal**

Para identificar el perfil de los compuestos fenólicos presentes en ambas fracciones de EPPs y NEPPs administradas en el modelo animal y atribuir los efectos observados a su composición se concentró 1 mL de cada fracción al vacío (RVT450-230 Speedvac, Thermo Fisher Scientific) durante 12 h a 0.12 bar y 45 °C. A continuación, se resuspendió en 200 µL de metanol de grado HPLC y se filtró (0.45 µm, Whatman PVDF). La separación cromatográfica se llevó a cabo según lo descrito por Martínez-Meza *et al.* (2021), mediante un equipo de cromatografía de líquidos de ultra alto desempeño acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo con una fuente de ionización de electroaspersión (UPLC-ESI QToF MS por sus siglas en inglés) (Vion Waters Co., USA). Se utilizó una columna BEH Acquity C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm de tamaño de gránulo) a 35 °C. La fase móvil consistió en agua con 0.1 % de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con 0.1 % de ácido fórmico (B) a un flujo de 0.5 mL/min. Las condiciones de los gradientes fueron las siguientes: 15 % B a los 2.5 min, 21 % B a los 10 min, 90 % B a los 12 min y 95 % B a los 13 min, seguido de una re-equilibración del sistema (0 % B a los 15 min durante 2 min).

Las condiciones del espectrómetro de masas incluye: adquisición de datos en modo de ionización negativo y positivo (ESI- y ESI+), rango de masas de 100 a 1800 Da, voltaje del capilar de 2 KV (ESI-) y 3.5 KV (ESI+), voltaje de cono de 40 eV, energía de colisión baja: 6 V y energía de colisión alta: 15 – 45 V; la temperatura de la fuente fue de 120 °C, el gas de desolvatación fue nitrógeno a 450 °C a 800L/h; el flujo de gas de cono fue de 50 L/h. Se realizó la corrección

de masas con leucina encefalina (50 pg/mL) a 10  $\mu$ L/min (Pérez-Ramírez et al., 2018).

La identificación de compuestos se llevó a cabo mediante un análisis de su masa exacta (error de masa: <5 ppm), el patrón de fragmentación y la distribución isotópica con el software UNIFI (Waters Co., USA). La cuantificación de los polifenoles se realizó mediante la construcción de curvas de calibración con ácido elágico, caféico y ferúlico (ácidos hidroxibenzoicos); ácido gálico y *p*-cumárico (ácidos hidroxibenzoicos); (+)-catequina y (-)-epicatequina (flavanoles); naringenina (flavon), quercetina y kaempferol (flavonoles) y cloruro de cianidina (antocianina). Los estándares se obtuvieron de Sigma Aldrich (Steimheim, Alemania).

### **5.3. Estabilidad de compuestos fenólicos extraíbles**

#### **5.3.1. Medición de color e índice de pardeamiento**

La estabilidad térmica de los extractos, que se muestran en el Cuadro 5, se evaluó utilizando soluciones amortiguadoras a pH 3, que contenían una solución de KCl a 0.025 M. La solución se ajustó con HCl concentrado o NaOH al 10 %. Para las pruebas de estabilidad, se colocaron alícuotas de 1 mL de cada muestra en microtubos ámbar y se almacenaron a 60, 80 y 100 °C en un baño seco (BSH100, Benchmark Scientific). A 60 °C se recolectaron las muestras correspondientes a los 180, 360, 540 y 720 min. A 80 °C se recolectaron muestras a los 30, 60, 90 y 120 min y a 100 °C a los 15, 30, 45 y 60 min.

Para cada muestra se determinó el índice de pardeamiento con la relación de  $\lambda_{\max} = 520$  nm (los pigmentos rojos) y  $\lambda_{\max} = 430$  nm (los pigmentos marrones) en un espectrofotómetro para microplaca (Thermo Scientific). También se evaluó el color de los extractos, este se calculó a partir de los datos de absorbancia espectral (380-780 nm, con intervalos de 5 nm) utilizando las ecuaciones estándar CIELAB. Los datos se analizaron utilizando el software Color by Spectra para determinar los parámetros L, a y b del CIELAB (Sigurdson *et al.*, 2018). Además, se calculó el grado de cambio de color utilizando el sistema CIELAB al tiempo inicial 0 min y tiempos finales de 720, 120 y 60 min para la estabilidad a 60, 80 y 100 °C, respectivamente, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2}$$

Donde  $L_0^*$ ,  $a_0^*$  y  $b_0^*$  representan los valores de CIELAB en el momento inicial, y  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  representan los valores de CIELAB en el tiempo final para cada temperatura.

### 5.3.2. Cinética de degradación de antocianinas y proantocianidinas

La cinética de degradación de antocianinas y proantocianidinas se determinó a 60, 80 y 100 °C. Se propusieron modelos de cinética de orden cero (ecuación 1), primer orden (ecuación 2) y segundo orden (ecuación 3). Se utilizaron los datos del modelo con mejor correlación ( $R^2$ ).

$$C = C_0 - kt \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\frac{1}{c} = \frac{1}{c_0} - kt \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde  $C_0$  y  $C$  corresponden a las concentraciones iniciales y finales de antocianinas y proantocianidinas, respectivamente,  $t$  es el tiempo transcurrido en minutos y  $k$  es la constante de velocidad de degradación ( $\text{min}^{-1}$ ).

El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) se calculó de acuerdo con Muche *et al.* (2018) utilizando la siguiente ecuación:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{-\ln [0.5]}{k}$$

La energía de activación se calculó utilizando la ecuación de Arrhenius, para ello se realizó una regresión lineal a partir del logaritmo natural de las constantes de velocidad de degradación ( $k$ ) versus la inversa de las temperaturas (Reyes *et al.*, 2007).

### **5.3.3. Evaluación *in vivo* de tratamiento de la resistencia a insulina de los compuestos fenólicos no extraíbles del orujo de uva**

#### **5.3.3.1. Preparación de los extractos**

A partir de la cuantificación de compuestos fenólicos extraíbles y los análisis de estabilidad se seleccionó la mezcla de solventes EA<sub>HCl</sub>/ CeA 8:2/5:5 v/v (etanol:ácido cítrico/ acetona:agua) para ser probada como fracción EPPs en el modelo animal y el residuo se utilizó como la fracción de NEPPs.

Los extractos utilizados para la evaluación *in vivo* se concentraron mediante un evaporador rotatorio (HB4 Basic, IKA Werke) a 62 °C y 50 rpm para evaporar el etanol y la acetona, por al menos 60 min (Feresin *et al.*, 2017) dicha temperatura se seleccionó con base a las pruebas de estabilidad de los compuestos fenólicos (Sección 5.3). Las muestras se transfirieron a tubos cónicos de 50 mL. Posteriormente las muestras se congelaron a -76 °C al menos 24 h; después se liofilizaron (7400040, Freezone Triad) a -65 °C para secar las muestras durante 96 h.

#### **5.3.3.2. Cuantificación de solventes residuales en los extractos liofilizados de EPPs y NEPPs**

Para la cuantificación de solventes residuales en los extractos sometidos a rotoevaporación y liofilización se realizó mediante determinación colorimétrica del etanol y acetona.

Se realizó una curva de calibración con etanol (2.5 a 25 uL/mL) en frascos de 10 mL y se le añadió a cada frasco 3 mL de ácido *p*-aminobenzoico ( $\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$ ) y 1 mL de NaOH al 30% y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min, (Rahim y Geeso, 1992; límite de detección 4.76%). Las mediciones se realizaron a 436 nm. Posteriormente, el procedimiento se realizó con 40 mg de las muestras liofilizadas resuspendidas en 10 mL de agua destilada

Para la determinación de acetona residual se realizó una curva de calibración con acetona (100 uL/mL a 800 uL/mL) en frascos de 10 mL y se le añadió a cada frasco 1 ml de vanilina ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ) al 2 %, preparada en etanol al 25 %. Posteriormente se añadió 1 ml de NaOH (1 M); los frascos se cerraron y sometieron a 40 °C en baño María por 10 min. Al finalizar el tiempo, los frascos

se retiraron y se enfriaron por un periodo de 10 minutos; posteriormente los puntos de la curva se transfirieron a una microplaca y se midieron a 430 nm (Amlathe y Gupta, 1990, rango de determinación 0.5 a 5 mg/L). El procedimiento se realizó con 40 mg de las muestras liofilizadas resuspendidas en 10 mL de agua destilada.

### **5.3.3.3. Estudio *in vivo* para la evaluación de los compuestos fenólicos no extraíbles sobre resistencia a la insulina**

Después del tiempo de aclimatación descrito en la sección 5.1.1, las ratas se dividieron en 4 grupos (n = 12): (i) grupo control sano, alimentado con una dieta estándar (DE); (ii) grupo control con obesidad, alimentado con una dieta alta en grasa y fructosa (DAGF); (iii) dieta DAGF con EPPs (al 2.6%); (iv) dieta DAGF con NEPPs (al 1.4%). El grupo DE se alimentó con una dieta estándar (Rodent Lab Chow 5001, PMI, USA) y los demás grupos fueron alimentados con dieta DAGF (con 60 % de dieta estándar, 20 % grasa, 20 % fructosa) sin suplementar. Después de 14 semanas, 2 de los grupos alimentados con dieta DAGF se suplementaron con 2.6% de EPPs y 1.4% de NEPPs. La concentración de los extractos liofilizados se ajustó semanalmente en función del peso corporal y se continuó el estudio hasta la semana 22.

Debido a que no hay estudios en los que se haya estudiado la fracción NEPPs la dosis para ambas fracciones se seleccionó a partir de estudios de los compuestos fenólicos extraíbles. Como tratamiento a partir de 25 mg de extracto de proantocianidinas se ha observado un efecto en el tratamiento de la RI (Montagut *et al.*, 2010 y Pascual-Serrano *et al.*, 2017); por lo que, tratando de igualar la concentración de CFT administrada en 25 mg de extracto de estos estudios fue necesario administrar en nuestro modelo animal la fracción de EPPs al 1.4 % y NEPPs al 2.6 % de la dieta. Además, no fue posible manejar dosis mayores debido al bajo rendimiento (20%) en la obtención de extractos de EPPs liofilizados a nivel laboratorio.

Las composiciones nutrimentales de las dietas se muestran en el Cuadro 7, las cuales se calcularon a partir de la composición nutrimental cuantificada por Valdez-Rodríguez (2023). En cuanto al porcentaje adicionado de las fracciones

liofilizadas, este se calculó a partir de la concentración de compuestos fenólicos totales cuantificados en cada fracción (sección 6.3.1) con el fin de garantizar la adición de 100 mg de CFT/kg de peso corporal de cada fracción liofilizada. La preparación de dietas se realizó bajo los lineamientos que marcan las buenas prácticas de manufactura establecidas en la NOM-251-SSA1-2009. Se utilizaron guantes de nitrilo estériles, cofia y cubrebocas para evitar la contaminación del alimento.

**Cuadro 7.** Contenido nutrimental de la dieta estándar y alta en grasa y fructosa para el estudio *in vivo*

Nutrientes (%)	DE	DAGF	DAGF + EPPs	DAGF + NEPPs
Proteína	23.95	14.34	13.72	14.00
Carbohidratos	48.72	29.23	27.95	28.74
Fructosa	-	20.00	20.00	20.00
Lípidos	5.04	23.00	22.87	22.93
Vitaminas y minerales	8.00	5.10	5.10	5.10
Fracción liofilizada	-	-	2.60	1.40

En la semana 11 y 14 se extrajo 200 uL de sangre por punción en cola para determinar la RI en el modelo animal cuantificando glucosa e insulina (n = 5 por grupo). A la semana 14 se determinó la RI y si inició el tratamiento en los grupos correspondientes durante un periodo 8 semanas. La duración del experimento fue de 22 semanas y cada semana se registró el consumo de alimento y la ganancia de peso corporal. Con estos datos se realizaron los cálculos correspondientes a la tasa de ganancia de peso corporal (TGPC) e ingesta calórica (IE). Para determinar el índice de Lee se midió la longitud nasoanal colocando los animales anestesiados boca abajo sobre una hoja milimétrica midiendo la distancia correspondiente al largo desde el ano de la rata hasta la punta de la nariz (Novelli *et al.*, 2007).

$$TGPC = \frac{dM}{M dt}$$

Donde:

Dm= Ganancia de peso durante el inicio y el final del tratamiento

M= Peso de la rata el inicio del tratamiento

$$IE = \frac{\text{medida de consumo de alimento (g)}}{\text{energía metabolizable de dieta (kj)}}$$

$$\text{Índice de LEE} = \frac{\text{Peso corporal (g)} * \left(\frac{1}{3}\right)}{\text{longitud nasoanal (cm)}} \times 1000$$

#### 5.3.3.4. Eutanasia

Para la eutanasia se consideró lo señalado por la NOM-062-ZOO-1999. Para lo anterior, los animales se sometieron previamente a un ayuno durante 12 h, se anestesiaron con pentobarbital (200 mg/kg de peso corporal) y se decapitaron con guillotina de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999. Para la recolección de orina, los animales se colocaron en jaulas metabólicas tres días previos a la eutanasia con alimento y agua *ad libitum*. Posterior a la eutanasia, la sangre se recolectó en tubos vacutainer y se centrifugó a  $1000 \times g$  durante 10 min a  $5^\circ\text{C}$  para la separación del suero. El contenido colónico y los tejidos hepático, adiposo y muscular se recolectaron para futuros análisis. Los tejidos se lavaron con solución salina (0.9 % NaCl) previo al almacenamiento. Los tejidos y fluidos se congelaron mediante nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

Las jeringas utilizadas se colocaron en un bote rojo de polipropileno especial para objetos punzocortantes con una leyenda que indicaba “residuos punzocortantes biológico-infecciosos” por un periodo máximo de 15 días hasta su recolección por la empresa Servicios Especializados en Residuos S.A. de C.V., la cual garantizó el tratamiento sobre los residuos según lo estipulado en la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002. El material quirúrgico utilizado se remojó en cloro por 12 h; se lavó y se esterilizó para su posterior almacenamiento. Los restos de las ratas no requeridos para el estudio se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  en una bolsa grande color amarillo, sin rebasar el 80 % de su capacidad; dicha bolsa se rotuló con la leyenda “desechos patológicos” y se almacenó hasta su recolección por la empresa EcoServi, Industrial.

### 5.3.3.5. Evaluación de la resistencia a insulina

Se cuantificó la concentración de triglicéridos con kit enzimático (GOD-POD, Spinreact, España; rango de identificación 0 a 1200 mg/dL) y glucosa en suero empleando un kit enzimático (GOD-POD, Spinreact, España; límite de identificación 0.04 a 500 mg/dL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, se midieron los niveles de insulina mediante un kit de ELISA (EZRMI-13K, Merck Millipore, USA; rango de identificación 0.1 a 10 ng/ML) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se calculó el índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assesment for Insulin Resistance) mediante la siguiente fórmula (Sotelo-González *et al.*, 2023):

$$HOMA:IR \left( \frac{mg}{dL} * \frac{\mu M}{mL} \right) = \frac{\left( Glucosa \frac{mg}{dL} * insulina \frac{\mu M}{mL} \right) en ayuno}{2430}$$

### 5.3.4. Análisis estadístico

Los resultados de la selección de condiciones de extracción y la evaluación *in vivo* del tratamiento de la RI se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar. Se realizó el análisis de varianza de los resultados (ANOVA) y se les aplicó una prueba Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los datos. Para las variables que siguieron una distribución normal y con baja variabilidad en sus datos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un nivel de confianza del 95 %, mientras que las variables que no siguieron una distribución normal se analizaron por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey-Kramer, mientras que la comparación de medias contra el tratamiento convencional para determinación de compuestos fenólicos y estabilidad de los extractos se realizó mediante el método de Dunnett. Para las variables no paramétricas del estudio *in vivo* se aplicó la prueba de prueba de Siegel-Tukey. Estos análisis se realizaron utilizando el software de análisis de datos rstudio 3.4.3 (Posit, USA).

Finalmente, para la asociación de la composición fitoquímica con los solventes de extracción, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando

el software estadístico Rstudio 3.4.3. Los datos fueron normalizados en el preprocesamiento.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Selección de las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos

Con el fin de obtener una mezcla de extracción con menor contenido de solventes tóxicos que el método convencional ( $MA_{HCl}/CeA$  5:5/7:3), se evaluó la mezcla etanol:agua (EA) como solvente de extracción bajo diferentes concentraciones (2:8, 5:5 y 8:2 v/v) y el ácido cítrico o HCl para acidificar los solventes a un pH 2.

La extracción de compuestos fenólicos totales, antocianinas y proantocianidinas del orujo de uva Syrah utilizando diferentes proporciones de disolvente:agua indica que los diferentes tratamientos mostraron concentraciones similares al método convencional ( $MA_{HCl}/CeA$  5:5/7:3) para compuestos fenólicos totales (CFT). Los extractos obtenidos con las mezclas de solventes  $EA_C/CeA$  2:8/7:3 y 5:5/7:3 mostraron las concentraciones más altas CFT, con incrementos de 21 y 24 %, respectivamente, en comparación con el control ( $p < 0.05$ ). En el caso de las antocianinas, se observó que el aumentar el contenido de solvente para  $MA_C/CeA$ ,  $EA_{HCl}/CeA$  y  $MA_C/CeA$  (2:8/7:3, 5:5/7:3 y 8:2/7:3) disminuyó la extracción de antocianinas en un 8, 11 y 17 %, respectivamente (Cuadro 8). Estos resultados concuerdan con los reportados por Le *et al.* (2022), quienes encontraron que el contenido de antocianinas en la extracción de frutos de *Carissa carandas* utilizando etanol:agua como solvente aumentó de 0 a 50 % v/v, pero disminuyó cuando la concentración de solvente se elevó a 75 y 100 %.

La naturaleza polar de las antocianinas requiere la inclusión de agua en la mezcla de solventes para mejorar el rendimiento de la extracción. Además, la adición de soluciones ácidas ayuda a estabilizar el catión flavilio, que es más estable en condiciones altamente ácidas. Le *et al.* (2022) recomiendan utilizar ácidos suaves, como el ácido cítrico, ya que los ácidos fuertes concentrados pueden desestabilizar la molécula de antocianina. Esto es consistente con

nuestros hallazgos, ya que los solventes acidificados con ácido cítrico resultaron en una mayor concentración de antocianinas.

Por otro lado, las concentraciones de proantocianidinas en las extracciones con metanol y etanol en proporciones de 2:8 y 5:5 fueron similares. Sin embargo, las extracciones con metanol y etanol en una proporción de 8:2 produjeron los niveles más altos de proantocianidinas, hasta un 42 % en comparación con el control ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 8). Mitchell *et al.* (2017) reportaron un aumento en la extracción de monómeros, dímeros y tetrámeros de proantocianidinas a medida que la concentración de metanol aumentaba de 5:5 a 8:2 v/v. Esto se atribuye al hecho de que a medida que las proantocianidinas polimerizan, su hidrofobicidad también aumenta (Mitchell *et al.*, 2017). Por lo tanto, es necesario potenciar la hidrofobicidad para facilitar su extracción.

En la Cuadro 8 se observa que las concentraciones de antocianinas y proantocianidinas fueron similares entre las mezclas con metanol y etanol, mientras que el etanol aumentó la extracción de TPC. Por lo tanto, en la siguiente etapa de este estudio solo se utilizó etanol para evaluar la extracción de estos compuestos debido a su menor toxicidad en comparación con el metanol. Además, se modificó la proporción de acetona y agua para encontrar la relación con menor contenido de solvente y mayor eficiencia en la extracción. Se seleccionaron las siguientes condiciones de extracción: EA<sub>HCl</sub>/CeA 8:2 y EA<sub>C</sub>/CeA 8:2 por su mayor contenido en proantocianidinas. Se eligió la condición EA<sub>C</sub>/CeA 5:5 por su alto contenido de TPC y antocianinas, así como su bajo contenido de etanol.

Los resultados presentados en el Cuadro 9 indican que las proporciones de acetona:agua 5:5 y 7:3 producen extracciones similares de TPC y antocianinas. Sin embargo, el contenido de EPA aumentó en un 27 % con la mezcla EA<sub>HCl</sub>/CeA 8:2/7:3 en comparación con la mezcla EA<sub>HCl</sub>/CeA 8:2/5:5. Zeng *et al.* (2020) sugirieron que una proporción de acetona:agua de 7:3 es un método óptimo para la extracción de EPA. De manera similar, Mitchell *et al.* (2017) encontraron que la proporción de 7:3 de acetona:agua optimizó las extracciones de procianidinas porque el 70% de acetona disminuyó la polaridad de la mezcla.

**Cuadro 8.** Cuantificación de compuestos fenólicos totales, antocianinas y proantocianidinas de diferentes tipos de extracciones de orujo de uva

Acrónimo	Primera extracción			Segunda extracción	CFT	Antocianinas	EPA
	Solvente	Agua acidificada	Solvente:agua	Relación acetona:agua			
MA <sub>HCl</sub> /CeA 2:8/7:3	Metanol	HCl	2:8	7:3	25.79 ± 1.78c	0.60 ± 0.07def	7.17 ± 0.15f
MA <sub>HCl</sub> /CeA 5:5/7:3	Metanol	HCl	5:5	7:3	26.07 ± 0.98c	0.70 ± 0.02bcd	8.12 ± 0.54def
MA <sub>HCl</sub> /CeA 8:2/7:3	Metanol	HCl	8:2	7:3	27.20 ± 1.52abc	0.66 ± 0.02cde*	10.03 ± 0.46bc*
MA <sub>C</sub> /CeA 2:8/7:3	Metanol	Cítrico	2:8	7:3	27.46 ± 2.07abc	0.83 ± 0.06a*	8.51 ± 0.69de
MA <sub>C</sub> /CeA 5:5/7:3	Metanol	Cítrico	5:5	7:3	28.87 ± 2.71abc	0.80 ± 0.04ab*	8.93 ± 0.26cd
MA <sub>C</sub> /CeA 8:2/7:3	Metanol	Cítrico	8:2	7:3	28.26 ± 1.08abc	0.76 ± 0.04abc*	11.27 ± 0.10a*
EA <sub>HCl</sub> /CeA 2:8/7:3	Etanol	HCl	2:8	7:3	30.10 ± 2.50abc	0.60 ± 0.03def	7.48 ± 0.34ef
EA <sub>HCl</sub> /CeA 5:5/7:3	Etanol	HCl	5:5	7:3	28.97 ± 1.93abc	0.56 ± 0.06ef	8.51 ± 0.26de
EA <sub>HCl</sub> /CeA 8:2/7:3	Etanol	HCl	8:2	7:3	26.21 ± 1.08c	0.53 ± 0.01f	10.82 ± 0.45ab*
EA <sub>C</sub> /CeA 2:8/7:3	Etanol	Cítrico	2:8	7:3	31.61 ± 0.47ab*	0.88 ± 0.06a*	7.57 ± 0.39ef
EA <sub>C</sub> /CeA 5:5/7:3	Etanol	Cítrico	5:5	7:3	32.45 ± 2.34a*	0.83 ± 0.06a*	8.57 ± 0.58de
EA <sub>C</sub> /CeA 8:2/7:3	Etanol	Cítrico	8:2	7:3	26.10 ± 1.08bc	0.69 ± 0.03bcd*	11.57 ± 0.63a*

Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tipos de extracciones por la prueba de Tukey-Kramer. CFT: Compuestos fenólicos totales: equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de muestra; Antocianinas: mg equivalentes a la malvidina 3-O-glucósido/g muestra; EPA: mg de proantocianidinas (PA)/g de muestra. \*Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación con la extracción control (MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3 v/v) por la prueba de Dunnet. MA<sub>HCl</sub>, metanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; EA<sub>HCl</sub>, etanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; MA<sub>C</sub>, metanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; EA<sub>C</sub>, etanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; CeA, acetona:agua.

**Cuadro 9.** Cuantificación de compuestos fenólicos totales, antocianinas y proantocianidinas de diferentes extracciones de orujo de uva Syrah utilizando diferentes proporciones de solventes en ambas etapas de extracción

Acrónimo	Primera extracción			Segunda extracción	CFT	Antocianinas	EPA
	Solvente	Agua acidificada	Solvente:agua	Relación acetona:agua			
MA <sub>HCl</sub> /CeA 5:5/5:5	Metanol	HCl	5:5	5:5	29.93 ± 1.53b	0.52 ± 0.02c	7.32 ± 0.19b
MA <sub>HCl</sub> /CeA 5:5/7:3	Metanol	HCl	5:5	7:3	28.21 ± 2.99b	0.59 ± 0.02c	8.67 ± 0.62b
EA <sub>HCl</sub> /CeA 8:2/5:5	Etanol	HCl	8:2	5:5	35.42 ± 3.76a*	0.60 ± 0.09bc	8.47 ± 1.18b
EA <sub>HCl</sub> /CeA 8:2/7:3	Etanol	HCl	8:2	7:3	32.36 ± 1.31ab	0.68 ± 0.00bc	10.82 ± 0.45a*
EA <sub>c</sub> /CeA 5:5/5:5	Etanol	Cítrico	5:5	5:5	35.70 ± 3.27a*	0.97 ± 0.09a*	7.92 ± 0.59b
EA <sub>c</sub> /CeA 5:5/7:3	Etanol	Cítrico	5:5	7:3	31.72 ± 1.95ab	0.81 ± 0.00ab*	8.57 ± 0.58b

Los datos se muestran como media ± desviación estándar de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tipos de extracciones por la prueba de Tukey-Kramer. CFT: Compuestos fenólicos totales: equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de muestra; Antocianinas: mg equivalentes a la malvidina 3-O-glucósido/g muestra; EPA: mg de proantocianidinas (PA)/g de muestra. \*Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación con la extracción control (MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3 v/v) por la prueba de Dunnet. MA<sub>HCl</sub>, metanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; EA<sub>HCl</sub>, etanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; MA<sub>c</sub>, metanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; EA<sub>c</sub>, etanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; CeA, acetona:agua.

### 6.1.1. Identificación de compuestos extraíbles por HPLC-PDA en los extractos de orujo de uva

En las seis condiciones de extracción se identificaron y cuantificaron mediante cromatografía líquida trece compuestos fenólicos, incluidos ácidos fenólicos, flavonoides, metabolitos de polifenoles y antocianinas (Cuadro 10).

Los extractos derivados de las mezclas EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5 y EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/7:3 mostraron una mayor extracción de ácido elágico (4.09 y 2.61 veces comparado al método convencional) y de flavan 3-oles, específicamente de galato de epicatequina (7.22 y 9.73 veces comparado al método convencional). La suplementación de estos compuestos ha demostrado una reducción sobre resistencia a la insulina en estudios *in vivo* e *in vitro* (Legeay *et al.*, 2015; da Costa *et al.*, 2017; Polce *et al.*, 2018).

Por otro lado, los extractos obtenidos a partir de las mezclas EA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/5:5 y EA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3 presentaron un alto contenido de ácido 4-hidroxifenilbenzoico los cuales no fueron detectados en los demás extractos estudiados, destacando la mezcla EA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3 por una mayor extracción de metabolitos derivados de polifenoles (2.55 veces comparado al método convencional). Se detectó un mayor contenido de quercetina (2.45 y 1.55 veces comparado al método convencional) y epicatequina (1.86 y 2.38 veces comparado al método convencional).

Una alta extracción de ácidos hidroxibenzoicos y sus derivados es importante ya que se ha identificado que estos tienen actividad antidiabética en un estudio *in vitro* con células HepG2 expuestas a derivados de ácido hidroxibenzoico (50 µM) durante 24 h en medio RPMI 1640 y tratadas con insulina (100 nM) durante 15 min. En este estudio se encontró que los derivados de ácido hidroxibenzoico, en especial el ácido gálico, mejoran la RI hepática inducida por ácidos grasos libres al regular positivamente las proteínas p-IRS, p-PI3K, p-AKT y p-FOXO1 en la cascada de señalización de la insulina (Lee *et al.*, 2021).

**Cuadro 10.** Compuestos fenólicos cuantificados por HPLC/DAD en extractos de orujo de uva

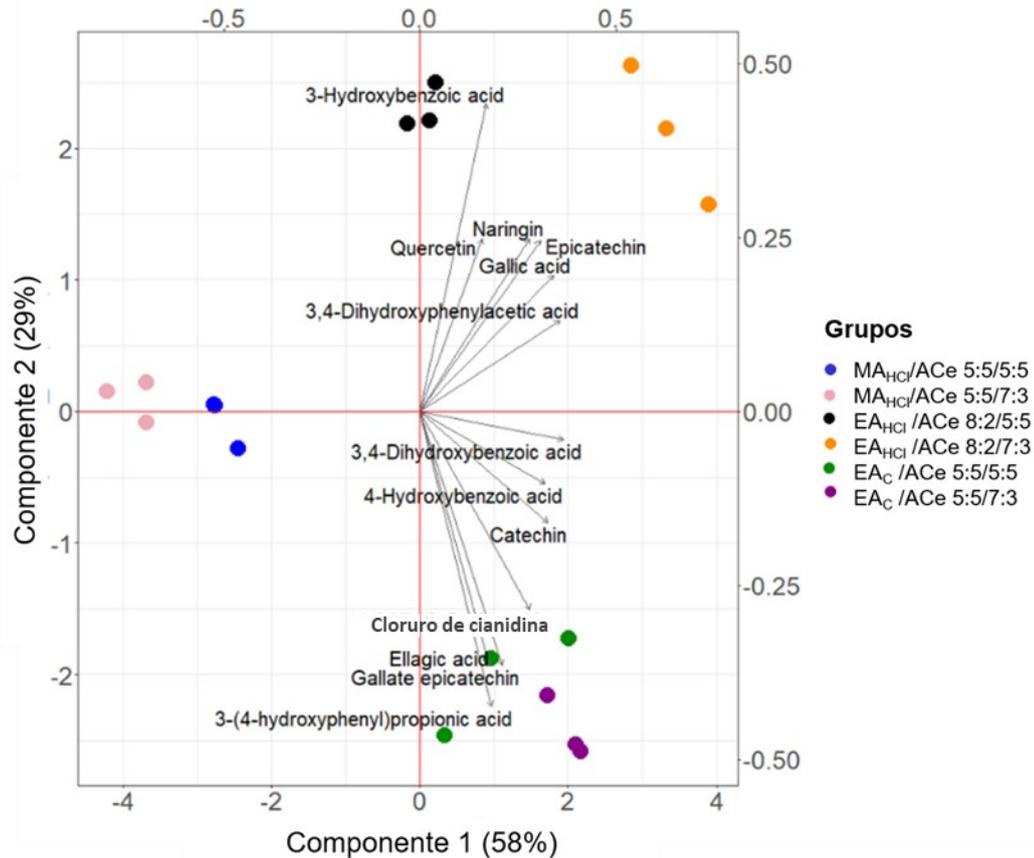
Compuestos ( $\mu\text{g/g}$ peso seco)	RT (min)	MA <sub>HCl</sub> /CeA 5:5/5:5	MA <sub>HCl</sub> /CeA 5:5/7:3	EA <sub>HCl</sub> /CeA 8:2/5:5	EA <sub>HCl</sub> /CeA 8:2/7:3	EAc/CeA 5:5/5:5	EAc/CeA 5:5/7:3
<i>Ácido hidroxicinámico</i>							
Ácido gálico	5.71	12.00 $\pm$ 0.04 d	9.32 $\pm$ 1.17 e*	18.82 $\pm$ 0.02b*	25.92 $\pm$ 0.08 a*	16.89 $\pm$ 0.88 c*	17.46 $\pm$ 0.05 bc*
<i>Ácido hidroxibenzoico</i>							
Ácido elágico	13.71	53.38 $\pm$ 0.25 d	82.59 $\pm$ 1.12 cd	76.43 $\pm$ 0.58 cd	121.44 $\pm$ 4.45 c*	338.23 $\pm$ 29.85 a*	215.61 $\pm$ 17.81 b*
<i>Flavonoles</i>							
Quercetina	14.74	9.67 $\pm$ 0.06 c	8.49 $\pm$ 0.03 c	20.82 $\pm$ 0.03 a*	13.15 $\pm$ 0.12 b*	12.69 $\pm$ 1.74 b*	12.27 $\pm$ 0.01 b*
<i>Flavanoles</i>							
Catequina	8.14	41.87 $\pm$ 0.11 bc	33.07 $\pm$ 1.37 c	40.28 $\pm$ 0.19 c	62.21 $\pm$ 11.84 ab*	57.43 $\pm$ 7.76 a*	60.92 $\pm$ 0.14 a*
Galato de epicatequina	13.77	22.30 $\pm$ 0.04 d	17.55 $\pm$ 1.05 d	84.92 $\pm$ 0.88 c*	72.52 $\pm$ 2.93 c*	205.61 $\pm$ 8.45 b*	373.15 $\pm$ 11.53 a*
Epicatequina	8.9	23.19 $\pm$ 0.04 c	20.49 $\pm$ 0.22 c	38.10 $\pm$ 1.17 a*	48.83 $\pm$ 0.28 ab*	26.78 $\pm$ 10.70 b	35.38 $\pm$ 0.1 bc*
<i>Flavanona</i>							
Naringina	14.53	9.72 $\pm$ 0.10 c	8.61 $\pm$ 0.18 c	16.66 $\pm$ 3.57 b*	28.55 $\pm$ 0.38 a*	17.75 $\pm$ 0.22 b*	11.19 $\pm$ 0.20 c
<i>Antocianinas</i>							
Cloruro de cianidina	13.69	384 $\pm$ 2.83 e	323.35 $\pm$ 0.98 e	1139.21 $\pm$ 18.62 d*	1739.95 $\pm$ 34.80 c*	2335.11 $\pm$ 160.73 b*	3145.19 $\pm$ 45.33 a*
<i>Metabolitos microbianos de polifenoles</i>							
Ácido 3,4-hidroxifenilpropiónico	6.99	14.07 $\pm$ 0.01 b	5.65 $\pm$ 0.16 d*	9.85 $\pm$ 0.20 c*	11.00 $\pm$ 0.02 c*	27.67 $\pm$ 1.85 a*	28.84 $\pm$ 0.00 a*
Ácido 3,4 dihidroxifenilacético	9.54	11.51 $\pm$ 0.03 c	9.22 $\pm$ 1.02 c	21.07 $\pm$ 0.14 b*	29.81 $\pm$ 0.14 a*	19.54 $\pm$ 3.43 b*	22.08 $\pm$ 0.11 b*
Ácido 4-hidroxibenzoico	8.23	79.25 $\pm$ 0.0 cd	61.47 $\pm$ 2.77 d	76.22 $\pm$ 0.19 cd	120.36 $\pm$ 23.93 a*	92.48 $\pm$ 2.52 bc	117.76 $\pm$ 0.28 ab*
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	6.75	94.90 $\pm$ 0.37 d	68.85 $\pm$ 6.19 e	125.84 0.89 c	201.26 $\pm$ 0.37 a	163.51 $\pm$ 13.64 b	176.19 $\pm$ 0.14 b
Ácido 3-hidroxibenzoico	8.25	ND	ND	7.99 $\pm$ 0.12 a	8.25 $\pm$ 2.57 a	ND	ND

Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tipos de extracciones por la prueba de Tukey-Kramer. \*Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación con la extracción control (MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3 v/v) por la prueba de Dunnet. MA<sub>HCl</sub>, metanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; EA<sub>HCl</sub>, etanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; MA<sub>C</sub>, metanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; EA<sub>C</sub>, etanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; CeA, acetona:agua.

Un alto contenido de (-)-epicatequina en el orujo se ha asociado con su efecto en la disminución de obesidad en un 70% y la sensibilidad a la insulina en un 58 % con respecto al grupo con obesidad inducida por una dieta alta en grasa y fructosa (el 60% del total de calorías proviene de ácidos grasos, el 18.4% de proteínas y el 21.3% de carbohidratos) (Rosenzweig *et al.*, 2017; Cremonini *et al.*, 2019). Adicionalmente, el consumo de la quercetina puede reducir la glucosa basal, la insulina y HOMA-IR inducidos por una dieta rica en grasas y sacarosa (Arias *et al.*, 2014), así como la reducción de triglicéridos y colesterol en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (Vessal *et al.*, 2003).

Con los resultados obtenidos del análisis por HPLC, los datos fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA), el cual puede ser utilizado para la clasificación y/o agrupación de ciertas matrices vegetales en función de sus perfiles fitoquímicos (Farajpour *et al.*, 2024). Si los primeros componentes explican una cantidad significativa de varianza, esto indica que el análisis de componentes principales ha resumido los datos de manera eficaz, en este caso se observa que los dos primeros componentes explicaron el 87 % de la varianza. El PC1 explicó el 58 % de la variación total y los compuestos que contribuyen principalmente a su definición en base a su valor absoluto de masa y carga son el ácido 3,4-dihidroxibenzoico, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético, el ácido gálico, la catequina, el ácido 4-hidroxibenzoico y la epicatequina (valor positivo) dichos compuestos refieren a las muestras de etanol (Figura 3).

De acuerdo con este componente, las extracciones etanólicas se caracterizaron principalmente por compuestos específicos y son discriminantes de las extracciones metanólicas. Por lo tanto, de las muestras metanólicas al estar sin componentes, no son bien representadas con el modelo de componentes principales.



**Figura 3.** Análisis de componentes principales (biplot) de extractos de orujo de uva con base a los principales fitoquímicos cuantificados (Los datos fueron normalizados en el preprocesamiento). MA<sub>HCl</sub>, metanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; EA<sub>HCl</sub>, etanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; MA<sub>C</sub>, metanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; EA<sub>C</sub>, etanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; CeA, acetona:agua.

El PC2 explicó el 28 % de la varianza y se define por el ácido 3-hidroxibenzoico (con un valor positivo), que parece estar asociado a extracciones etanólicas acidificadas con ácido clorhídrico. Por otro lado, el ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, la epicatequina y el ácido elágico también contribuyen a la PC2 (con valores negativos), lo que indica que las extracciones EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5 y EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/7:3 están asociadas con estos compuestos. Hosseini *et al.*, (2016) reportaron el efecto de diferentes ácidos (acético, cítrico y clorhídrico) en la extracción de compuestos fenólicos de diferentes matrices orgánicas (col lombarda, agracejo y cáscara de berenjena). La extracción de etanol:agua acidificada con ácido cítrico fue la mezcla de solventes más efectivo para extraer

compuestos fenólicos totales y antocianinas. Por lo tanto, nuestros resultados no solo demuestran la influencia del disolvente sobre la extracción de los compuestos fenólicos, también el efecto de diferentes ácidos.

Además, las dos mezclas de extracciones  $EA_C/CeA$  5:5/5:5 y  $EA_C/CeA$  5:5/7:3 en el PCA (Figura 3. Análisis de componentes principales (biplot) de extractos de orujo de uva con base a los principales fitoquímicos cuantificados (Los datos fueron normalizados en el preprocesamiento). ) se discriminan hacia cloruro de cianidina (PC2, valor negativo), una antocianina importante en el orujo de uva (Perdicaro *et al.*, 2017), a diferencia de los extractos  $EA_{HCl}/CeA$  8:2/5:5,  $EA_{HCl}/CeA$  8:2/5:5 y el extracto control. Estudios *in vivo* han reportado que los extractos ricos en antocianinas mejoran la resistencia a la insulina y aumentan la sensibilidad de la misma, además previenen el incremento de peso corporal y la acumulación de lípidos (Azofeifa *et al.*, 2016; Barbalho *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2014). Se sabe que las antocianinas son altamente solubles en agua y esto probablemente está relacionado con la distribución heterogénea de sus cargas en el agua (Iosub *et al.*, 2014). Sin embargo, también son fácilmente solubles en disolventes como el metanol y el etanol, pero son casi insolubles en disolventes no polares (Qi *et al.*, 2023). Estos resultados nos indican una mayor afinidad de los compuestos fenólicos del orujo de uva por el etanol acidificado que el metanol acidificado; además, se observa un efecto claro en la extracción de compuestos fenólicos derivado del tipo de ácido utilizado; por lo que, acidificar el etanol con un ácido débil, esto permite una mayor extracción de flavan 3-oles y antocianinas.

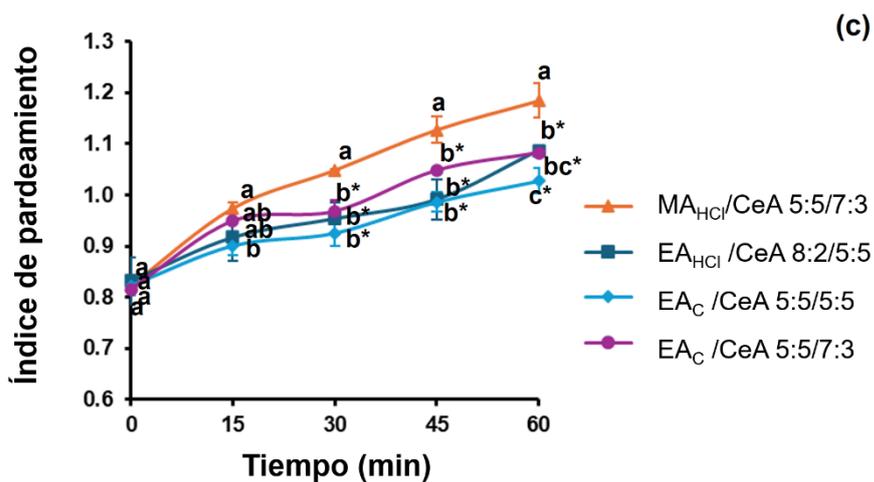
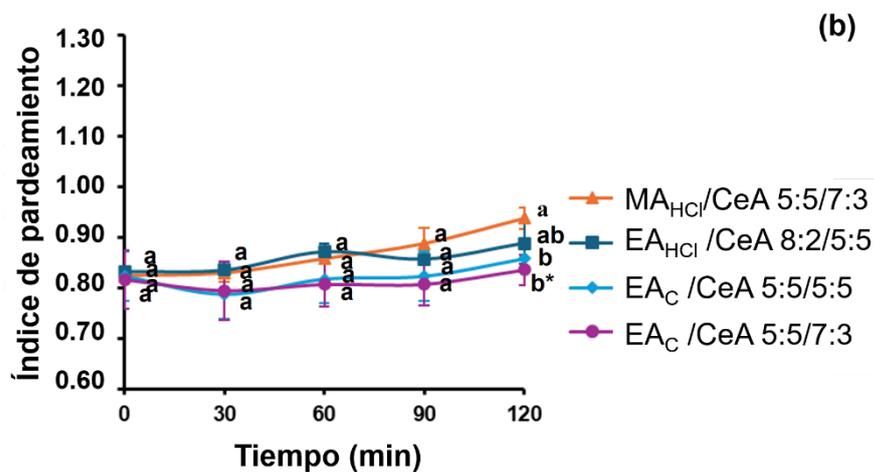
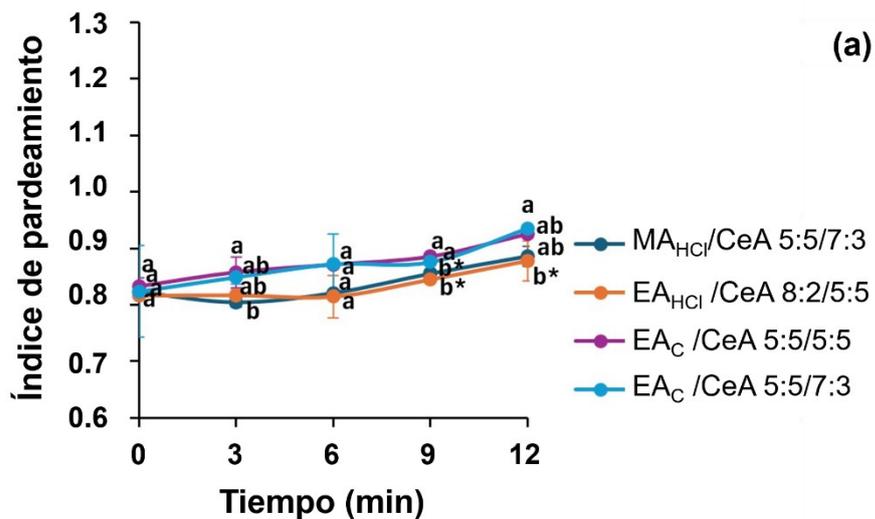
## **6.2. Evaluación del índice de pardeamiento y estabilidad de antocianinas y proantocianidinas**

Los extractos de orujo de uva contienen antocianinas, que son las responsables de aportar color. Sin embargo, estos compuestos tienen una baja estabilidad, que está determinada por su estructura molecular, la humedad relativa, la luz, el pH, la temperatura, ciertas enzimas y el oxígeno (Sharma *et al.*, 2016). La degradación de las antocianinas produce un pardeamiento y esto disminuye sus

capacidades antioxidantes y otras propiedades biológicas (Castellanos-Gallo *et al.*, 2022). A su vez, las proantocianidinas al someterse al calentamiento también son degradadas, lo cual depende de su estructura, observando una disminución de las proantocianidinas poliméricas y aumentando la concentración de sus monómeros (Khanal *et al.*, 2010; Tomaz *et al.*, 2018).

Del análisis de los extractos presentados en los Cuadro 9 y Cuadro **10**, los cuales fueron analizados por espectrofotometría y HPLC-PDA, respectivamente, se seleccionaron 3 extractos, además del método convencional ( $MA_{HCl}/CeA$  5:5/7:3 v/v) con el fin de evaluar la estabilidad térmica de las antocianinas y las proantocianidinas a 60, 80 y 100 °C.

Para evaluar la estabilidad de los extractos de orujo de uva se prepararon extractos con un contenido de antocianinas de 7 mg/L y las muestras se expusieron a diferentes temperaturas y tiempos. Los porcentajes de estabilidad del índice de pardeamiento y de las antocianinas se calcularon en función del tiempo inicial y final de cada temperatura. Los porcentajes de índice de pardeamiento fueron menores a 60 y 80 °C para las mezclas  $EA_C/CeA$  5:5/7:3 (7 y 2 %, respectivamente) y  $EA_C/CeA$  5:5/5:5 (7 y 4 %, respectivamente), en comparación con el control, las cuales mostraron un porcentaje de pardeamiento de 13 y 14 %, respectivamente (Figura 4a y Figura 4b). A 100 °C, todos los extractos mostraron un incremento del índice de pardeamiento, que osciló entre el 25 % y el 31%, comparado con el control que exhibió un incremento del 43 %, siendo el extracto obtenido con la mezcla  $EA_C/CeA$  5:5/5:5 el que mostró el menor aumento de pardeamiento (Figura 4c).



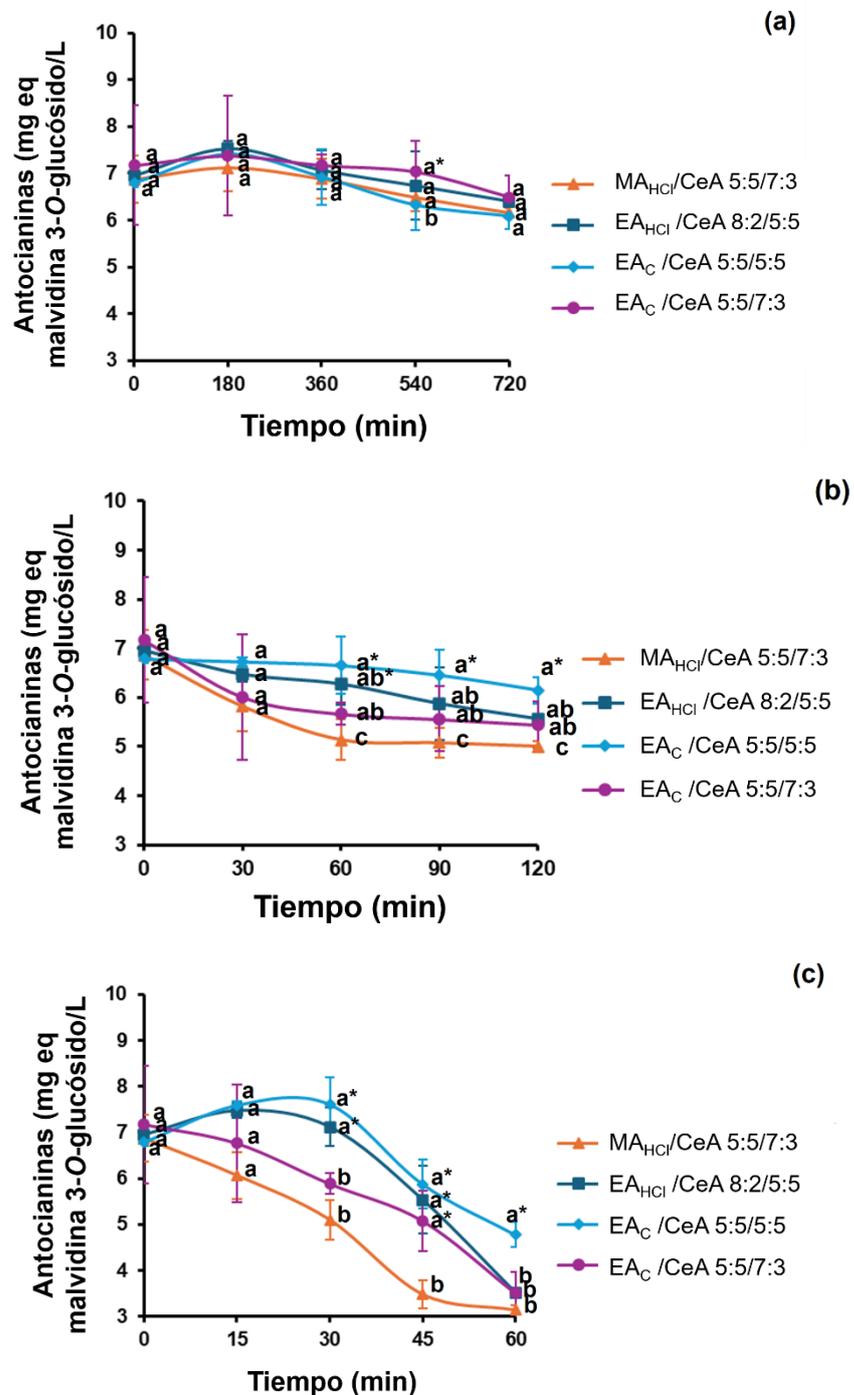
**Figura 4.** Índice de pardeamiento de los extractos de orujo de uva almacenados a 60 °C (a), 80 °C (b) y 100 °C (c). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tipos de extracciones por la prueba de Tukey. \*Indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación con la extracción control (MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3 v/v) por la prueba de Dunnet. MA<sub>HCl</sub>, metanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; EA<sub>HCl</sub>, etanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; MA<sub>C</sub>, metanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; EA<sub>C</sub>, etanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; CeA, acetona:agua.

Se ha reportado que, en extractos de EPPs de semilla de uva, el pardeamiento de las muestras está directamente relacionado con la intensidad de los tratamientos térmicos, debido principalmente a la polimerización gradual de compuestos fenólicos individuales y a la oxidación de estos fitoquímicos, lo que lleva a la formación de macromoléculas que confieren coloración marrón (Khanal *et al.*, 2010). El orujo de uva se secó a 55 °C, seguido de un proceso de extracción de los EPP y, posteriormente, se sometió a pruebas de estabilidad a temperaturas de 60 a 100 °C. Por lo tanto, el proceso de oxidación producido por la enzima polifenol oxidasa (PPO) no debería ocurrir, ya que la enzima se inactiva a 65 °C durante 12 min en el orujo de uva (Rapeanu *et al.*, 2006). En nuestro estudio, la oxidación química podría ser uno de los mecanismos más relevantes para el pardeamiento. Se ha reportado en vinos que la autooxidación del ácido gálico genera ácido elágico (Monagas *et al.*, 2005). Por lo tanto, la estabilidad térmica de los extractos de semilla de uva está influenciada por su perfil de compuestos. Se ha reportado que aquellos con un grupo galato en su estructura fueron más sensibles al calor (Davidov-Pardo *et al.*, 2011).

En cuanto a la estabilidad de las antocianinas, todos los extractos mostraron un comportamiento similar a 60 °C (Figura 5a). Sin embargo, a medida que la temperatura aumentó a 80 y 100 °C, el extracto EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5 mostraró una mayor estabilidad con una disminución en el contenido de antocianinas de 10 y 43 %, respectivamente y el método de extracción control exhibió reducciones de 37 y 118 %, respectivamente (Figura 5b y Figura 5c).

Las antocianinas son las responsables del color rojo de los vinos. Estos compuestos tienen azúcares unidos a las antocianidinas en la posición 3-hidroxilo. Cuando las antocianinas se someten a una degradación térmica se hidrolizan, lo que lleva a la pérdida de sus azúcares. Las agliconas resultantes son menos estables que sus formas glicosiladas y la pérdida de azúcares acelera el proceso de degradación, produciendo finalmente chalconas (Castellanos-Gallo *et al.*, 2022). Posteriormente, se produce una escisión, que da lugar a productos como el ácido gálico y el ácido protocatecuico. Sin embargo, en el jugo de uva almacenado a 50 °C, la reducción de antocianinas no se correlacionó con

un aumento en los niveles de estos productos de escisión o la formación de componentes poliméricos incoloros. Se propuso que las antocianinas disminuyeron a través de otros mecanismos como la formación de precipitados insolubles (Dorris *et al.*, 2018).



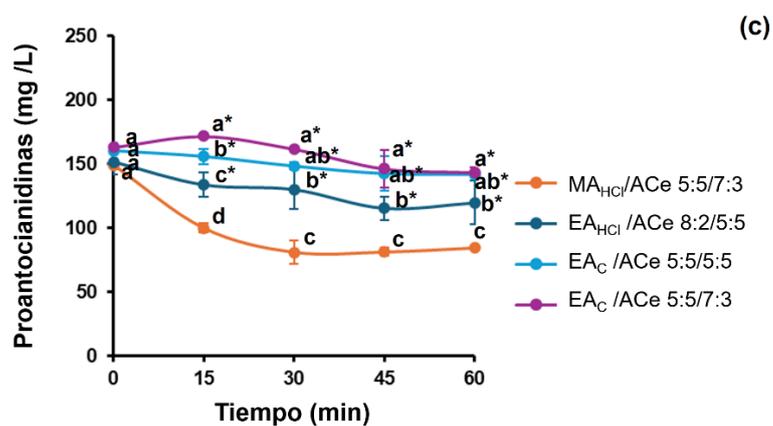
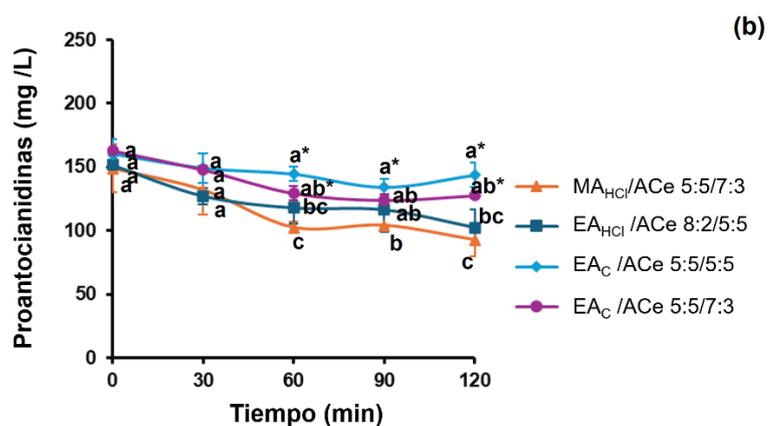
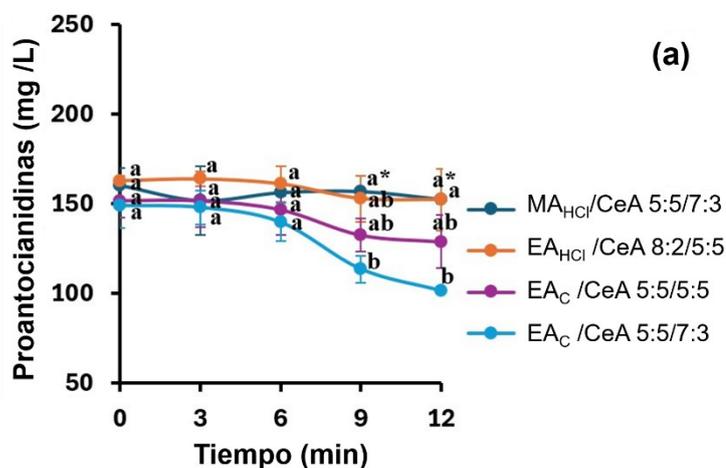
**Figura 5.** Contenido de antocianinas de los extractos de orujo de uva almacenados a 60 °C (a), 80 °C (b) y 100 °C (c). Diferentes letras indican diferencias

significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tipos de extracciones por la prueba de Tukey. \*Indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación con la extracción control ( $MA_{HCl}/ACe$  5:5/7:3 v/v) por la prueba de Dunnet.  $MA_{HCl}$ , metanol:agua acidificada con HCl 0.1 M;  $EA_{HCl}$ , etanol:agua acidificada con HCl 0.1 M;  $MA_C$ , metanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M;  $EA_C$ , etanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; CeA, acetona:agua.

En cuanto a las proantocianidinas extraíbles (EPA), los extractos obtenidos con la mezclas  $EA_C/CeA$  5:5/5:5 y  $EA_C/CeA$  5:5/7:3 mostraron la mayor estabilidad a 60, 80 y 100 °C, con una pérdida en el contenido de EPA del 5, 11 y 12 % y 7, 22 y 13 %, respectivamente. En contraste, el método control presentó disminuciones más altas de 47, 60 y 76 %, respectivamente (Figura 6a, Figura 6b y Figura 6c).

El tipo de proantocianidinas presentes en el orujo de uva puede diferenciar estos compuestos en cuanto a su termoestabilidad. Por otro lado, el tipo de disolventes puede tener más solubilidad y afinidad con cada tipo de proantocianidinas. El metanol y el etanol son disolventes eficaces para la extracción de proantocianidinas de bajo peso molecular, en tanto que las proantocianidinas de alto peso molecular tienen más afinidad por la acetona y el agua (Liang *et al.*, 2024). Interesantemente, en nuestro estudio la mezcla  $EA_C/CeA$  5:5/7:3 presentó menor pérdida de proantocianidinas en comparación con el extracto obtenido con la mezcla  $MA_{HCl}/CeA$  5:5/7:3 con alta pérdida de estos compuestos; mientras que, ambos extractos tienen el mismo contenido de acetona. Estos resultados sugieren que probablemente se extrajeron diferentes proantocianidinas u otros compuestos que influyeron en su estabilidad, debido a una mayor afinidad con el metanol o etanol, así como por los ácidos utilizados.

Se calculó la cinética de degradación para las antocianinas y el EPA. En el caso de las antocianinas, el extracto obtenido con la mezcla  $EA_C/CeA$  5:5/5:5 mostró los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) más altos para 80 °C (433.2 min) y 100 °C (20.1 min), seguido de los extractos obtenidos con las mezclas  $EA_C/CeA$  5:5/7:3 (11.5 y 12.0 min respectivamente) y  $EA_{HCl}/CeA$  8:2/7:3 (61.3 y 11.7 min respectivamente). El extracto obtenido con la mezcla  $MA_{HCl}/CeA$  5:5/7:3 fue el más inestable (10.4 y 10.1 min, respectivamente) (Cuadro 11).



**Figura 6.** Contenido de proantocianidinas de extractos de orujo de uva almacenados a 60 °C (a), 80 °C (b) y 100 °C (c). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tipos de extracciones por la prueba de Tukey. \*Indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación con la extracción control (MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3 v/v) por la prueba de Dunnet. MA<sub>HCl</sub>, metanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; EA<sub>HCl</sub>, etanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; MA<sub>C</sub>, metanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; EA<sub>C</sub>, etanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; CeA, acetona:agua.

**Cuadro 11.** Cinética de degradación de antocianinas de orujo de uva

Sample	T (°C)	kt (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Ecuación	t <sub>1/2</sub> (min)	Ea (KJ/mol)	R <sup>2</sup>
<b>MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3</b>	100	0.0686	0.974	C = -0.0686t + 7.018	10.1	7.18	0.865
	80	0.0668	0.972	C = -0.0668t + 6.94	10.4		
	60	0.0003	0.741	C = 0.0003t + 0.1401	2310.5		
<b>EA<sub>HCl</sub>/CeA 8:2/5:5</b>	100	0.0593	0.814	C = -0.0593t + 7.7725	11.7	6.66	0.995
	80	0.0113	0.982	C = -0.0113t + 6.866	61.3		
	60	0.0003	0.539	C = 0.0003t + 0.1364	2310.5		
<b>EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5</b>	100	0.0345	0.862	C = -0.0345t + 7.2039	20.1	5.65	0.906
	80	0.0016	0.883	C = -0.0016t + 1.9278	433.2		
	60	0.0003	0.703	C = 0.0003t + 0.1419	2310.5		
<b>EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/7:3</b>	100	0.0578	0.936	C = -0.0578t + 7.3811	12.0	6.97	0.856
	80	0.0601	0.953	C = -0.0601t + 7.4831	11.5		
	60	0.0003	0.717	C = 0.0003t + 0.1349	2310.5		

T: temperatura °C; kt: Constante de degradación (min<sup>-1</sup>); R<sup>2</sup>: Pearson coeficiente; T<sub>1/2</sub>: Vida media (mín.); Energía de activación Ea (KJ/mol); MA<sub>HCl</sub>, metanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; EA<sub>HCl</sub>, etanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; MA<sub>C</sub>, metanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; EA<sub>C</sub>, etanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; CeA, acetona:agua.

Adicionalmente, las EPA mostraron mayor estabilidad que las antocianinas, pero con un comportamiento similar para los diferentes extractos (Cuadro 12), ya que a las temperaturas de 80 y 100 °C, el extracto obtenido con la mezcla EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5 presentó  $t_{1/2}$  de 315.1 min y 288.8; para el extracto obtenido con la mezcla MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3 fueron de 87.7 y 71.5 min, respectivamente.

La alta estabilidad en EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5 a 60 °C y 80 °C puede atribuirse a la presencia de ácido cítrico, ya que se ha visto que el ácido cítrico puede promover la diacilación (adición de dos grupos acilo) de las antocianinas que mejora su estabilidad al protegerla de la hidratación (Shaheer *et al.*, 2014), lo que evita la degradación de las mismas a chalconas. Sin embargo, a 100 °C, este extracto tuvo el  $t_{1/2}$  más alto, pero mostró un aumento en  $\Delta E$ , lo que indica tres formas de desestabilización de las antocianinas. Por lo tanto, la estabilidad de las antocianinas puede alterarse de tres maneras: por polimerización, escisión y derivatización. La escisión de las antocianinas conduce a compuestos incoloros, la polimerización causa pardeamiento y las reacciones de derivatización dan como resultado la producción de varias moléculas coloreadas (Enaru *et al.*, 2021). Esto sugiere que el extracto presenta predominantemente una desestabilización del color.

En el Cuadro 13 se presentan los valores de cambio de color ( $\Delta E$ ) para los extractos etanólicos y metanólicos. Los colores en los extractos obtenidos con la mezcla MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3 tuvieron valores más bajos de  $a^*$  (datos no mostrados) que en las otras extracciones de etanol para todas las temperaturas. Estos efectos podrían estar relacionados principalmente con la polimerización de antocianinas con taninos (EPAs), en la fracción de catequina formando compuestos incoloros (Monagas *et al.*, 2005). Un efecto diferente se mostró con los extractos de etanol, que presentaron un color marrón. Se ha reportado que el procesamiento térmico provoca la degradación de las antocianinas monoméricas, así como la formación de polímeros, lo que da como resultado el color marrón, que está relacionado con la degradación del color rojo (Monagas *et al.*, 2005).

**Cuadro 12.** Cinética de degradación de extractos de proantocianidinas del orujo de uva

Muestra	T (°C)	kt (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Ecuación	t <sub>1/2</sub> (min)	Ea (KJ/mol)	R <sup>2</sup>
<b>MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3</b>	100	0.0097	0.872	C = -0.0097t + 4.905	71.50	3.64	0.905
	80	0.0079	0.905	C = -0.0079t + 4.976	87.70		
	60	0.0006	0.865	C = -0.0006t + 5.0699	1155.2		
<b>EA<sub>HCl</sub>/CeA 8:2/5:5</b>	100	0.0058	0.739	C = -0.0058t + 5.1381	119.50	5.31	0.901
	80	0.0044	0.819	C = -0.0044t + 5.0579	157.50		
	60	0.0001	0.825	C = -0.0001t + 5.1073	6931.5		
<b>EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5</b>	100	0.0024	0.953	C = -0.0024t + 5.0747	288.80	4.86	0.825
	80	0.0022	0.645	C = -0.0022t + 5.0494	315.10		
	60	0.00006	0.868	C = -6E-05t + 5.0767	11552.5		
<b>EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/7:3</b>	100	0.0041	0.849	C = -0.0041t + 4.9875	169.10	3.53	0.781
	80	0.0058	0.919	C = -0.0058t + 4.979	119.50		
	60	0.0003	0.889	C = -0.0003t + 5.0466	2310.5		

T: temperatura °C; kt: Constante de degradación (min<sup>-1</sup>); R<sup>2</sup>: Pearson coeficiente; T<sub>1/2</sub>: Vida media (mín.); Energía de activación Ea (KJ/mol); MA<sub>HCl</sub>, metanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; EA<sub>HCl</sub>, etanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; MA<sub>C</sub>, metanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; EA<sub>C</sub>, etanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; CeA, acetona:agua.

**Cuadro 13.** Cambios de color ( $\Delta E$ ) de los extractos de orujo de uva al finalizar los estudios de estabilidad

Muestra	60 °C		80 °C		100 °C	
	$\Delta E$	Color	$\Delta E$	Color	$\Delta E$	Color
<b>MA<sub>HCl</sub>/CeA 5:5/7:3</b>	13.34 ± 1.73a		20.80 ± 0.20a		18.16 ± 1.84a	
<b>EA<sub>HCl</sub>/CeA 8:2/5:5</b>	11.25 ± 1.60a		14.37 ± 3.15b*		14.21 ± 1.03b*	
<b>EA<sub>C</sub>/CeAc5:5/5:5</b>	10.35 ± 0.81a		8.24 ± 0.85c*		15.09 ± 0.64b	
<b>EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/7:3</b>	11.06 ± 0.38a		12.27 ± 1.92bc*		12.73 ± 0.51b*	

Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tipos de extracciones por la prueba de Tukey. \*Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a la extracción control (EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/7:3) por la prueba de Dunnet. MA<sub>HCl</sub>, metanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; EA<sub>HCl</sub>, etanol:agua acidificada con HCl 0.1 M; MA<sub>C</sub>, metanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; EA<sub>C</sub>, etanol:agua acidificada con ácido cítrico 1 M; CeA, acetona:agua.

En cuanto a los cambios de color, el extracto obtenido con la mezcla EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5 a 60 °C tuvo un  $\Delta E$  más bajo en un 40 %, en comparación con el extracto de metanol. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa. A 80 °C, todos los extractos etanólicos mostraron una disminución en los valores de  $\Delta E$  de 28 % a 46 % ( $p < 0.05$ ) se observó un efecto similar a 100 °C con una disminución del 22 a 30 % en comparación con el extracto control ( $p < 0.05$ ). Además, a 60 y 80 °C, el extracto obtenido con la mezcla EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5 presentó el valor más bajo de  $\Delta E$ , pero a 100 °C, el extracto EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5 tuvo un aumento significativo de  $\Delta E$ , lo que resultó en un valor alto en comparación con el extracto obtenido con la mezcla EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/7:3. Esto puede explicarse por el hecho de que la muestra EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5 presentó el mayor contenido de ácido gálico detectado por HPLC (un 57% más) en comparación con el extracto obtenido con la mezcla EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/7:3. Los ácidos fenólicos se han asociado con una mejora en la estabilidad y el color de las antocianinas a temperaturas inferiores a 90 °C (Schwarz *et al.*, 2005). Estos hallazgos pueden indicar que la estabilidad del extracto EA<sub>C</sub>/CeA 5:5/5:5, en términos de antocianinas, la degradación de EPA y el índice de pardeamiento se deben a la presencia de ácido elálgico. Esto

concuerta con Gómez-Plaza *et al.* (2006), quienes afirmaron que la estabilidad del color depende de factores como los copigmentos de antocianinas y la presencia de otros polifenoles.

Debido a que todas las extracciones con etanol demostraron un mayor rendimiento de extracción de compuestos fenólicos totales, así como una mayor estabilidad de color y tiempo de vida media comparado con el método convencional, se eligió utilizar la extracción con la mezcla EA<sub>HCl</sub>/CeA 8:2/5:5 debido al menor costo en reactivos utilizados para acidificar la solución de extracción.

La temperatura de rotaevaporación a 60°C fue seleccionada con base en estos resultados para garantizar una menor pérdida de EPPs.

### **6.3. Evaluación *in vivo* de tratamiento de la resistencia a insulina de los compuestos fenólicos no extraíbles del orujo de uva**

#### **6.3.1. Perfil fitoquímico de los extractos EPP y NEPP**

Se utilizó la condición seleccionada de extracción de EPPs (EA<sub>HCl</sub>/CeA 8:2/5:5) para extraer la mayor cantidad de compuestos fenólicos libres, posterior a la eliminación del agua y solventes de ambas fracciones se realizó el perfil de polifenoles de ambos extractos.

Se cuantificó un mayor contenido de compuestos fenólicos en la fracción NEPP que la EPP (141.33 y 77.53 mg/g, respectivamente) y se determinó un contenido similar de flavonoides y proantocianidinas en la fracción EPP. Mientras que, en la fracción NEPP destaca una alta extracción de dichos compuestos de los cuales se recuperó un 95 con 70 % de proantocianidina no extraíbles. Adicionalmente este extracto presenta 5 % de EPPs (Cuadro 14). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Buergo-Martínez (2023) quien encontró una mayor cantidad de proantocianidinas no extraíbles (74%) comparado con los polifenoles hidrolizables (26%) en la variedad Syrah se

encontraron valores de polifenoles hidrolizables de  $24.90 \pm 0.98$  mg/g y de proantocianidinas no extraíbles de  $86.11 \pm 3.92$  mg/g.

**Cuadro 14.** Compuestos fenólicos de la fracción EPPs y NEPPs del orujo de uva

<b>Compuestos fenólicos extraíbles (EPPs)</b>	
Flavonoides	$24.04 \pm 5.12$
Antocianinas	$0.43 \pm 0.17$
Proantocianidinas	$31.83 \pm 5.03$
Compuestos fenólicos totales <sup>1</sup>	$77.53 \pm 4.18$
<b>Compuestos fenólicos no extraíbles (NEPPs)</b>	
Polifenoles hidrolizables	$34.54 \pm 0.77$
Proantocianidinas	$99.56 \pm 14.79$
Compuestos fenólicos extraíbles	$7.23 \pm 1.74$
Compuestos fenólicos totales <sup>2</sup>	141.33

Los resultados se expresan en mg/g de extracto liofilizado de orujo de uva y son el promedio  $\pm$  DE, n = 3. <sup>1</sup>Compuestos fenólicos cuantificados. <sup>2</sup>Sumatoria de los compuestos fenólicos.

En la cuantificación de los compuestos fenólicos mediante el UPLC se detectaron ácidos fenólicos ( $398.81 \pm 1.65$   $\mu$ g/g), flavonoides ( $193.85 \pm 8.18$   $\mu$ g/g) y metabolitos derivados de la fermentación microbiana ( $107.94 \pm 0.92$   $\mu$ g/g) en el extracto liofilizado de EPP (Cuadro 16). En la fracción EPP se identificaron 14 antocianinas, 26 flavonoides, 9 ácidos hidroxibenzoicos y 3 ácidos hidroxicinámicos. La antocianina predominante fue el hexósido de malvidina, seguido del hexósido de peonidina, el hexósido de cumaroil-malvidina y el hexósido de petunidina. Esto concuerda con lo reportado por Perdicaro *et al.* (2017), quienes encontraron que las antocianinas predominantes en el orujo de uva son la malvidina-3-O-glucósido, seguida de la petunidina-3-O-glucósido y la malvidina-3-O-p-cumaroilglucósido. Entre los flavonoides identificados en nuestro estudio, el más abundante fue la (-)-epicatequina, seguido de la quercetina, el glucurónido de quercetina, el ramnósido de miricetina, la (+)-catequina, la (iso)-ramnetina y el hexósido de miricetina. Rodríguez-Lanzi *et al.* (2016) informaron que los compuestos más abundantes en un extracto hidroalcohólico de orujo de uva liofilizado son los flavan-3-oles (+)-catequina y (-)-epicatequina, así como el flavonol quercetina. En cuanto a las

proantocianidinas, la más prevalente fue la procianidina dímero B2 isómero I, seguida de la procianidina dímero B1 isómero II, lo que concuerda con los hallazgos de Perdicaro *et al.* (2017). Estos compuestos se han asociado principalmente con mejoras en el desarrollo de la obesidad y la IR (Cremonini *et al.*, 2016).

Por último, el hexósido de ácido dihidroxibenzoico y el hexósido de ácido cumárico fueron los principales ácidos hidroxibenzoicos y el ácido dicafeoilquínico y el ácido elágico fueron los principales ácidos hidroxicinámicos identificados (Cuadro 15).

En los NEPPs extraídos por hidrólisis ácida sólo se detectó 1 ácido hidroxibenzoico, el isómero III del ácido dihidroxibenzoico y en los NEPPs extraídos por hidrólisis básicos se detectó 1 flavanol, 12 ácidos hidroxibenzoicos y 4 ácidos hidroxicinámicos, siendo los isómeros I y II del ácido hidroxibenzoico los más abundantes. Hasta ahora, la fracción NEPP del orujo de uva no se había caracterizado. Cabe destacar que el único flavonoide detectado fue la epicatequina en la hidrólisis básica de los polifenoles, con ausencia de antocianinas (Cuadro 16), debido a que estos compuestos no están unidos a la fibra alimentaria. En este contexto, la hidrólisis ácida del residuo obtenido de la extracción orgánico-acuosa facilita la detección de polifenoles que están unidos a la pared celular a través de sus enlaces glicosídicos. Por el contrario, la hidrólisis básica permite la identificación de polifenoles que están unidos a lípidos o ácidos grasos de la pared celular a través de enlaces éter y éster (Rocchetti *et al.*, 2022).

### **6.3.1. Cuantificación de solventes residuales en los extractos liofilizados de EPPs y NEPPs**

A los extractos obtenidos de las fracciones EPP y NEPP se les cuantificaron el etanol y acetona residuales previo a su administración en el modelo animal. Debido a la falta de una normativa mexicana que regule los solventes residuales en extractos secos se tomó como límite el LD<sub>50</sub> en ratas de cada solvente. Los valores obtenidos estuvieron por debajo del LD<sub>50</sub> de cada solvente (Cuadro 16).

**Cuadro 15.** Compuestos fenólicos identificados por UPLC-MS en las fracciones EPPs y NEPPs del orujo de uva ( $\mu\text{g/g}$  de peso seco)

Identificación putativa	Tiempo de retención (min)	Masa esperada (Da)	Masa observada (Da)	m/z observada	Error de masa (ppm)	Aducto	Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )		
							EPP	NEPPs hidrólisis ácida	NEPPs hidrólisis básica
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>									
Hexósido de ácido cafeico	2.29	342.10	342.10	341.09	-0.14	[M-H]-	nd	nd	nd
Éster etílico de ácido cafeico	2.70	208.07	208.07	207.07	1.44	[M-H]-	12.37	nd	nd
Ácido siríngico	2.89	198.05	198.05	197.05	2.26	[M-H]-	nd	nd	4.04
Ácido dicafeoilquínico	3.77	516.13	516.13	515.12	-2.03	[M-H]-	139.87	nd	nd
Ácido caféico*	3.88	180.04	180.04	179.04	3.24	[M-H]-	nd	nd	6.24
Ácido elágico*	4.02	302.01	302.01	301.00	-2.20	[M-H]-	107.08	nd	nd
Ácido ferúlico*	4.18	194.06	194.06	193.05	2.48	[M-H]-	nd	nd	4.40
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>									
Ácido gálico*	0.93	170.02	170.02	169.01	-4.86	[M-H]-	27.54	nd	nd
Isómero I del ácido dihidroxibenzoico	1.10	154.03	154.03	153.02	-1.76	[M-H]-	21.06	nd	63.82
Hexosido de ácido gálico	1.22	332.07	332.07	331.07	-6.22	[M-H]-	51.10	nd	4.06
Ácido treihidroxibenzoico	1.23	170.02	170.02	169.01	-3.79	[M-H]-	65.33	nd	nd
Hexosido de ácido dihidroxibenzoico	1.33	316.08	316.08	315.07	-5.39	[M-H]-	181.96	nd	19.92
Isómero I del ácido hidroxibenzoico	1.42	138.03	138.03	137.02	3.99	[M-H]-	nd	nd	1654.88
Isómero II del ácido dihidroxibenzoico	1.49	154.03	154.03	153.02	2.93	[M-H]-	nd	nd	54.31

Hexosido de ácido digálico	1.93	484.09	484.08	483.08	-1.30 [M-H]-	8.93	nd	nd
Isómero II del ácido dihidroxibenzoico (4')	2.12	138.03	138.03	137.02	4.23 [M-H]-	nd	nd	3491.89
Ácido cumárico/ Ácido málico	2.13	280.06	280.06	279.05	0.56 [M-H]-	nd	nd	64.56
Isómero III del ácido dihidroxibenzoico	2.25	154.03	154.03	153.02	2.93 [M-H]-	nd	11.39	nd
Ácido cumárico/ ácido tartárico	2.32	296.05	296.05	295.05	-0.58 [M-H]-	nd	nd	69.19
Ácido digálico	2.40	322.03	322.03	321.02	-1.58 [M-H]-	nd	nd	8.34
Hexósido de ácido cumárico	2.82	326.10	326.10	325.09	-2.83 [M-H]-	108.12	nd	nd
Isómero IV* del ácido dihidroxibenzoico (3,4')	3.32	154.03	154.03	153.02	5.62 [M-H]-	nd	nd	12.95
Ácido <i>p</i> -cumárico *	3.53	164.05	164.05	163.04	2.94 [M-H]-	nd	nd	300.42
Éster etílico del ácido gálico	3.60	198.05	198.05	197.05	-0.73 [M-H]-	57.47	nd	12.09
Galato de metilo	5.36	184.04	184.04	183.03	1.16 [M-H]-	9.04	nd	nd
<i>Antocianinas</i>								
Hexósido de delphinidina	2.09	465.10	465.10	465.10	1.70 [M]+	27.99	nd	nd
Hexósido de cianidina	2.46	449.11	449.11	449.11	3.82 [M]+	4.19	nd	nd
Hexosido de petuinidina	2.79	479.12	479.12	479.12	-0.19 [M]+	125.09	nd	nd
Hexósido de peonidina	3.17	463.12	463.12	463.12	-0.30 [M]+	183.40	nd	nd
Hexósido de malvidina	3.25	493.13	493.13	493.13	-1.15 [M]+	1218.74	nd	nd
Acetil-hexósido de delphinidina	3.36	507.11	507.12	507.12	6.46 [M]+	2.19	nd	nd
Acetil-hexósido de cianidina	4.04	491.12	491.12	491.12	8.45 [M]+	nd	nd	nd
Acetil-hexósido de petunidina	4.20	521.13	521.13	521.13	4.20 [M]+	2.72	nd	nd
Acetil-hexósido de malvidina	5.10	535.15	535.15	535.15	0.76 [M]+	42.76	nd	nd

Cumaroil-hexósido de delphinidina	5.80	611.14	611.15	611.14	8.55 [M]+	0.67	nd	nd
Cafeoil-hexósido de peonidina	6.75	625.16	625.16	625.16	3.86 [M]+	nd	nd	nd
Cafeoil-hexósido de malvidina	6.80	655.17	655.17	655.17	6.22 [M]+	2.69	nd	nd
Cumaroil-hexósido de cianidina	7.06	595.15	595.15	595.15	7.79 [M]+	1.28	nd	nd
Cumaroil-hexósido de petunidina	7.32	625.16	625.16	625.16	5.29 [M]+	13.45	nd	nd
Cumaroil-hexósido de peonidina	8.80	609.16	609.16	609.16	3.11 [M]+	27.93	nd	nd
Cumaroil-hexósido de malvidina	8.85	639.17	639.17	639.17	2.19 [M]+	164.06	nd	nd
<i>Flavanoles</i>								
Isómero I del dímero B2 de procianidina	2.00	578.14	578.14	577.13	-4.20 [M-H]-	148.50	nd	nd
Hexósido de (Epi)-catequina (+)-Catequina*	2.19	452.13	452.13	451.12	-6.04 [M-H]-	10.59	nd	nd
	2.24	290.08	290.08	289.07	-5.52 [M-H]-	213.31	nd	nd
Isómero I del trímero C1 de procianidina	2.31	866.21	866.20	865.20	-1.51 [M-H]-	77.72	nd	nd
Isómero II del dímero B2 de procianidina	2.59	578.14	578.14	577.13	-3.54 [M-H]-	321.10	nd	nd
(-)-Epicatequina*	2.90	290.08	290.08	289.07	-3.95 [M-H]-	896.18	nd	1.46
Isómero I del dímero B1 de procianidina	2.99	730.15	730.15	729.15	0.08 [M-H]-	34.00	nd	nd
Isómero II del trímero C1 de procianidina	3.13	866.21	866.21	865.20	-0.40 [M-H]-	94.80	nd	nd

Isómero II del dímero B1 de procianidina	3.34	730.15	730.15	729.15	0.17 [M-H]-	157.14	nd	nd
Galato de (Epi)-catequina	4.07	882.16	882.17	881.16	6.04 [M-H]-	11.48	nd	nd
Dímero B3 de prodelfinidina	4.36	442.09	442.09	441.08	-2.26 [M-H]-	66.93	nd	nd
<i>Flavonas</i>								
Naringina*	5.42	610.13	610.13	609.13	1.89 [M-H]-	10.65	nd	nd
Isómero I del dímero B2 de procianidina	5.22	580.18	580.18	579.17	-0.73 [M-H]-	3.34	nd	nd
Eriodictiol	5.89	288.06	288.06	287.06	0.53 [M-H]-	7.44	nd	nd
Hexósido de naringenina	6.24	434.12	434.12	433.11	-0.67 [M-H]-	22.11	nd	nd
Naringenina	11.19	272.07	272.07	271.06	-1.45 [M-H]-	13.62	nd	nd
<i>Flavonoles</i>								
Hexósido de (iso)-ramnetina	2.51	478.11	478.11	477.10	-4.55 [M-H]-	56.61	nd	nd
Hexósido de miricetina	3.53	480.09	480.09	479.08	-2.49 [M-H]-	150.29	nd	nd
Glucurónido de quercetina	4.50	478.07	478.07	477.07	-1.85 [M-H]-	340.05	nd	nd
Ramnósido de miricetina	4.59	464.10	464.09	463.09	-2.61 [M-H]-	237.20	nd	nd
Hexósido de quercetina	4.64	464.10	464.10	463.09	-0.94 [M-H]-	nd	nd	nd
Hexósido de kaempferol	5.86	448.10	448.10	447.09	-1.02 [M-H]-	8.02	nd	nd
Miricetina	6.30	318.04	318.04	317.03	-0.97 [M-H]-	62.35	nd	nd
Quercetina*	9.84	302.04	302.04	301.03	-1.84 [M-H]-	680.02	nd	nd
Kaempferol*	11.21	286.05	286.05	285.04	-2.55 [M-H]-	54.98	nd	nd
(Iso)-ramnetina	11.29	316.06	316.06	315.05	-2.80 [M-H]-	190.31	nd	nd

\*Identificación confirmada con estándares comerciales. EPP: compuestos fenólicos extraíextrables. NEPP: compuestos fenólicos no extraíbles.

En este estudio el etanol no se detectó en las muestras liofilizadas de EPPs y NEPPs; sin embargo, la acetona se identificó para el extracto de EPPs, esto podría deberse a que los polifenoles extraíbles pudieron actuar como interferentes en la técnica. Sin embargo, los animales fueron monitoreados durante todo el periodo de administración para detectar si se presentaban molestias en el grupo experimental.

**Cuadro 16.** Análisis de solventes residuales de las fracciones EPP y NEPP del orujo de uva de la variedad Syrah

<b>Extractos</b>	<b>Acetona</b>	<b>Etanol</b>
Límites permitidos (g/kg de peso corporal)	5.80	7.06
EPP	2.60	ND
NEPP	ND	ND

EPP: compuestos fenólicos extraíbles. NEPP: compuestos fenólicos no extraíbles. ND: No detectado.

### 6.3.1. Análisis microbiológico

A los extractos obtenidos de las fracciones EPP y NEPP se les realizó un análisis microbiológico previo a su administración en el modelo animal. Debido a la falta de una normativa mexicana que regule la calidad microbiana de los residuos agroindustriales se tomó como base la norma NOM-247-SSA1-2008, aplicable a las harinas integrales destinadas al consumo humano. Los valores obtenidos estuvieron dentro de los límites permitidos por dicha norma (Cuadro 17). Con esto se garantiza la inocuidad de dichos extractos.

**Cuadro 17.** Análisis microbiológico de las fracciones EPP y NEPP del orujo de uva de la variedad Syrah

<b>Extractos</b>	<b>Cuenta microbiana (UFC/g)</b>	<b>Coliformes (UFC/g)</b>	<b>Hongos y levaduras (UFC/g)</b>
Límites permitidos	500,000	100	200
EPP	0	0	0
NEPP	100	0	0

EPP: compuestos fenólicos extraíbles. NEPP: compuestos fenólicos no extraíbles.

### 6.3.2. Estudio *in vivo* para la evaluación de los compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles sobre resistencia a la insulina

#### 6.3.2.1. Determinación de concentración de glucosa, insulina e índice HOMA en el modelo animal

Los extractos de EPPs y NEPPs fueron evaluados en un modelo animal de obesidad inducida por dieta hipercalórica durante 22 semanas. En la semana 14 el grupo de DAGF tuvo mayores niveles de glucosa, la insulina y el índice HOMA en un 37, 23 y 66 %, respectivamente (Cuadro 18), comparado contra el grupo de dieta estándar (DE). Con estos resultados se confirmó que los animales presentaban una resistencia a la insulina.

**Cuadro 18.** Concentración de glucosa, insulina e índice HOMA-IR al inicio del tratamiento de resistencia a la insulina en animales con dieta DAGF suplementados con EPPs y NEPPs de orujo de uva

Parámetros	DE	DAGF	DAGF + EPPs	DAGF + NEPPs
<i>Semana 14</i>				
Glucosa (mg/dL)	109.1 ± 4.5b	150.0 ± 13.0a	141.2 ± 9.2ab	130.9 ± 3.7ab
Insulina (ng/dL)	2.7 ± 0.4b	6.1 ± 1.0a	4.7 ± 0.5ab	5.2 ± 1.1ab
Índice HOMA-IR	2.9 ± 0.6b	7.7 ± 1.2a	6.3 ± 0.8ab	6.3 ± 1.4ab

Resultados expresados en media ± desviación estándar, n = 8. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). HOMA-IR: Índice de resistencia a insulina. EPP: compuestos fenólicos extraíbles. NEPPs: compuestos fenólicos no extraíbles.

Posteriormente los animales continuaron con la alimentación de una dieta alta en grasa y fructosa (DAGF) y los animales de los grupos EPPs y NEPPs se suplementaron con los respectivos extractos de orujo de uva durante 8 semanas adicionales; previo a la semana 8 de tratamiento, que se realizó un último muestreo a la semana 7 con n = 5 para cada grupo determinar diferencias significativas entre el grupo con dieta DAGF y los grupos suplementados con extractos. Los grupos se diferenciaron con respecto a la ganancia de peso

corporal en un 10% al grupo DAGF, por lo que se finalizó el estudio a la semana 8. Al finalizar dicho periodo el grupo DAGF tuvo mayores niveles de glucosa, insulina e índice HOMA-IR en un 13, 100 y 150 %, respectivamente, comparado con el grupo sano (Cuadro 19). Mientras que, los grupos tratados presentaron valores similares de estos parámetros con el grupo DAGF, a pesar de consumir 100 mg de CFT/ kg de peso corporal, lo que equivale al consumo de 1 g de CFT en humanos. Sin embargo, es importante resaltar la disminución del índice HOMA-IR en un 10 % en el grupo tratado con NEPPs.

Los resultados de los animales suplementados con EPPs son similares a los reportados por otros autores. Ratas Wistar macho alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa (20% de fructosa y 20% de grasa) durante 9 semanas y suplementadas con un 2 % de orujo de uva durante 7 semanas; sin embargo, los animales no mostraron cambios en los valores HOMA-IR comparado con los animales con obesidad (Valdez-Rodríguez, 2023).

**Cuadro 19.** Concentración de glucosa, insulina e índice HOMA-IR en ratas suplementadas con EPPs y NEPPs de orujo de uva a las 22 semanas del estudio

	DE	DAGF	DAGF + EPPs	DAGF + NEPPs
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	181.7 ± 8.5a	206.0 ± 15.9a	195.9 ± 7.4a	218.9 ± 7.5a
<b>Insulina (ng/dL)</b>	5.6 ± 0.8a	11.4 ± 2.5a	9.1 ± 1.4a	11.1 ± 1.6a
<b>HOMA-IR</b>	7.9 ± 1.3a	20.28 ± 2.83a	22.0 ± 2.0a	18.5 ± 1.7a

Resultados expresados en media ± desviación estándar, n = 8. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). HOMA-IR: Índice de resistencia a insulina. EPP: compuestos fenólicos extraíbles. NEPP: compuestos fenólicos no extraíbles.

En estudios clínicos, la administración de 660 mg/día de CFT (Equivalente a 58 mg de CFT/kg de peso corporal en ratas) a mujeres con sobrepeso no mostró efectos sobre la RI después de 6 horas del tratamiento (Choleva *et al.*, 2022). Por otro lado, otro estudio realizado con ratas Wistar hembra alimentadas con

una “dieta de cafetería” que incluía tocino, dulces, galletas con paté, queso, magdalenas, zanahorias y leche azucarada (No reportan en que proporciones se mezcló cada alimento) durante 13 semanas y tratadas con extractos de proantocianidinas de semillas de uva (21.42 y 42.84 mg CFT/día) durante 4 semanas, demostró una disminución del 45 y 60 % en HOMA-IR, respectivamente (Montagut *et al.*, 2010).

La variabilidad en los resultados de estos estudios puede atribuirse a diversos factores, tales como diferencias en el diseño experimental, la composición de los extractos utilizados, la dosis y duración del tratamiento, así como el sexo de los sujetos de estudio y la composición de la dieta. Estos aspectos pueden influir en la respuesta a los compuestos bioactivos presentes en los extractos de orujo de uva.

Al comparar el perfil de compuestos fenólicos de la fracción EPPs con respecto a un estudio en el que se observó una disminución del índice HOMA con extracto de orujo de uva, se observan diferencias en la concentración de polifenoles mayoritarios. Pascual-Serrano y colaboradores (2017) administraron una dosis de 25 mg/kg peso corporal/día de extracto de proantocianidinas de semillas de uva, lo que disminuyó la RI en un 15 %, con respecto a la del grupo con una “dieta de cafetería” (35 % grasa y 51 % carbohidratos). Al comparar su perfil de polifenoles con el nuestro, sus compuestos mayoritarios muestran una concentración mil unidades mayores que los nuestros, específicamente para el ácido gálico, la catequina, la epicatequina, el galato de epicatequina y proantocianidinas B1 y B2 (Cuadro 15). Por lo que, nuestro extracto no alcanzó la concentración de ácido gálico y flavanoles a la que se ha visto un efecto.

Hasta la fecha, todos los estudios realizados con extractos de orujo de uva han evaluado la fracción de EPPs, dejando inexplorada la participación de la fracción NEPPs. Nuestro estudio, aunque no demostró una disminución significativa de la RI con la dosis y el tiempo empleados, se observa una tendencia de la fracción NEPP a reducir el índice HOMA-IR. Esto sugiere que los metabolitos derivados de la fermentación en colon de los NEPPs podrían desempeñar un papel

importante en el tratamiento de la RI, es posible que concentraciones más elevadas pudieran potenciar este efecto.

#### **6.3.2.2. Peso corporal y parámetros de obesidad en el modelo animal**

De acuerdo con el peso corporal de los animales al final del tratamiento el grupo DAGF mostró un mayor peso corporal y tasa de ganancia de peso, hasta en un 22 and 300 % respecto al grupo sano. Mientras que, el tratamiento con EPPs disminuyó el peso corporal en un 10 %, así como la tasa de ganancia de peso en un 70 %. Para el grupo NEPP los parámetros de obesidad permanecieron similares a las del grupo DAGF. Para la circunferencia abdominal y torácica e índice de Lee no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos (Cuadro 20).

El uso de orujo de uva ha demostrado tener efectos sobre la disminución del peso corporal. Estudios en los que se administraron extractos de semillas y piel de uva (400 mg de CFT/kg día, 14 semanas) de manera preventiva a ratones macho C57BL/6J alimentados con una dieta DAGF (45% de energía proveniente de grasas), los animales mostraron una disminución de peso corporal del 24.5%, atenuando la acumulación de lípidos en tejido adiposo (Yang *et al.*, 2023). Estos extractos presentaron altas concentraciones de flavan-3-oles (138.71 µg/mg), específicamente epicatequina (49.31 µg/mg) y catequina (46.80 µg/mg).

En otro estudio con ratas Wistar macho a las que se les administraron extractos ricos en proantocianidinas de semillas de uva (423 y 846 mg/kg de CFT) durante 8 días se obtuvo una reducción de peso corporal del 10 % y 9 %, respectivamente. Esto se atribuyó a que los extractos disminuyeron la absorción de los carbohidratos (0.25 y 0.32 %, respectivamente) y proteínas (% de proteínas absorbidas/ proteínas ingeridas: 0.5:10.42 y 1:11.67, respectivamente) (Serrano *et al.*, 2017).

Se ha sugerido que las proantocianidinas y varios flavonoides aumentan la beta oxidación de lípidos en comparación con la oxidación de carbohidratos principalmente en músculo. Casanova *et al.* (2014) utilizaron ratas adultas (40 semanas) a las que se les administró dos concentraciones de extracto de

proantocianidinas de orujo de uva durante 8 días (0.5 y 1 g), obteniendo que la concentración de 0.5 tuvo mayores efectos benéficos al aumentar el gasto energético debido a la oxidación lipídica del tejido adiposo subcutáneo. En otro estudio hámsters alimentados con una dieta estándar alta en grasas (DAG) durante 30 días y suplementados con un extracto de proantocianidinas de semillas de uva (25 mg/ kg de peso corporal) durante 15 días obtuvieron un aumento en la expresión de genes relacionados con la  $\beta$ -oxidación y el ciclo de glicerolípidos/ácidos grasos libres (GL/FFA) (Crescenti *et al.*, 2015). Pascual-Serrano y colaboradores, 2017 administraron 25 mg/kg peso corporal/día de extracto de proantocianidinas de semillas de uva en un ratas alimentadas con “dieta de cafetería” durante 8 días, obteniendo un aumento en el gasto energético con la dosis de 0.5 g debido a un aumento en la oxidación lipídica en el tejido adiposo subcutáneo.

Los datos obtenidos indican que los compuestos fenólicos extraíbles (EPPs) podrían estar favoreciendo una mayor pérdida de peso debido a una mejor absorción. Por otro lado, los compuestos fenólicos no extraíbles (NEPPs), aunque presentes en mayor proporción de proantocianidinas que losvEPPs ( $99.56 \pm 14.79$  y  $31.83 \pm 5.03$  m/g, respectivamente), podrían tener una biodisponibilidad limitada debido a su unión a la fibra y a la fermentación microbiana, lo que podría explicar una menor influencia en la oxidación lipídica

Estos estudios nos indican que la disminución de peso corporal en el grupo EPPs podría atribuirse a una mayor absorción de estos compuestos libres, además de un posible efecto en la oxidación lipídica que los administrados con compuestos fenólicos ligados (NEPPs) a pesar de su alta proporción de proantocianidinas con respecto al grupo EPPs ( $99.56 \pm 14.79$  y  $31.83 \pm 5.03$  m/g, respectivamente; (Cuadro 14), ya que los NEPPs llegan a colon unidos principalmente a fibra y al metabolizarse por acción microbiana su contenido de compuestos fenólicos biodisponibles pudo ser inferior al grupo EPPs.

Hasta el momento son pocos los estudios que han observado una relación entre la disminución de la RI y el peso corporal al utilizar extractos de orujo de uva. Da Costa y colaboradores (2017) realizaron un estudio de tratamiento crónico de un

extracto de piel de uva en un modelo de obesidad inducido por una dieta alta en grasa (60 % de energía proveniente de lípidos, 26 % de carbohidratos y 14 % de proteínas) al adicionar 200 mg de extracto/kg de peso corporal durante 12 semanas, reportaron una disminución del 56% en el índice HOMA-IR y del 23% en el peso corporal, ya que los polifenoles regularon el perfil lipídico y la secreción de adiponectinas. En contraste, Rodríguez-Lanzi *et al.* (2020), al administrar 300 mg de extracto (equivalentes a 23 mg de CFT/kg de peso corporal) durante 6 semanas, reportaron una disminución del 70 % en el índice HOMA-IR, pero un incremento del 3 % en el peso corporal.

En cuanto al perfil fenólico de los extractos administrados en estos estudios da-Costa *et al.* (2017) reportan en su extracto de antocianinas la presencia de peonidina-3-O-glucósido, petunidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-glucósido y malvidina-3-(6-O-trans-pcumaril)-5-O-diglucósido, sin reportar concentraciones de las mismas. Mientras que en nuestro estudio el hexósido de malvidina fue la antocianina mayoritaria con una concentración de 1218.74 µg/g de muestra (Cuadro 15). Rodríguez-Lanzi *et al.* (2020) reportan la caracterización de su extracto de EPPs de orujo de uva en un estudio anterior (Rodríguez-Lanzi *et al.*, 2016) dicho extracto fue rico en ácidos gálico, caféico y siríngico; mientras que, en el extracto de EPPs de este estudio el ácido gálico fue 90 % menor y los ácidos caféico y siríngico no fueron detectados. En cuanto los flavanoles mayoritarios identificados en este estudio la catequina y la quercetina tuvieron una menor concentración que la reportada por dichos autores en un 95 % y 72 %, respectivamente.

Estos resultados subrayan la complejidad de la relación entre los extractos fenólicos del orujo de uva y sus efectos en la reducción del peso corporal y la RI. La eficacia varía significativamente debido a múltiples factores, incluyendo la dosis administrada, la composición específica de polifenoles, la duración del estudio y la composición de la dieta. Consecuentemente, se hace evidente la necesidad de realizar investigaciones más exhaustivas para identificar la combinación óptima de estos factores en el tratamiento de la obesidad y la resistencia a la insulina.

**Cuadro 20.** Peso corporal y parámetros antropométricos de obesidad al terminar el tratamiento de ratas obesas alimentados con una dieta suplementada con EPPs y NEPPs

<b>Medidas</b>	<b>DE</b>	<b>DAGF</b>	<b>DAGF + EPPs</b>	<b>DAGF + NEPPs</b>
<i>Semana 14</i>				
Peso corporal al inicio del tratamiento (g)	441.2± 18.5 b	514.0 ± 14.5 a	508.2 ± 11.6 b	510.8 ± 5.7 a
<i>Semana 22</i>				
Peso corporal final (g)	469.2 ± 21.6 c	575.3 ± 15.6 a	519.5 ± 10.0 b	571.6 ± 9.3 a
Tasa de ganancia de peso	0.1 b	0.4 a	0.1 b	0.4 ab
Circunferencia abdominal (cm)	18.7 ± 1.6	19.9 ± 1.1	20.5 ± 1.2	19.9 ± 1.2
Circunferencia torácica (cm)	17.0 ± 1.3	18.1 ± 1.4	18.2 ± 1.7	17.7 ± 1.3
Índice de Lee	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0

Resultados expresados en media ± desviación estándar, n = 8. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). EPP: compuestos fenólicos extraíxtrables. NEPP: compuestos fenólicos no extraíbles.

## VII. CONCLUSIONES

- El etanol acidificado con ácido cítrico es una alternativa al metanol acidificado con HCl para extraer los EPP del orujo de uva, mostrando un menor oscurecimiento y una mayor retención de antocianinas y proantocianidinas a altas temperaturas.
- La suplementación con la fracción EPPs (rica en hexósido de malvidina, (-)-epicatequina, quercetina e isómero II B2 de dímero de procianidina) disminuyó el peso corporal. Por el contrario, la fracción NEPPs, caracterizada por un perfil rico en ácidos hidroxibenzoicos y proantocianidinas de alto peso molecular, no mostró efectos similares. Estos resultados sugieren una mayor biodisponibilidad y/o bioactividad de los compuestos presentes en la fracción EPPs.
- La evaluación individual de los NEPPs requiere el desarrollo de metodologías de separación específicas que minimicen la hidrólisis de estos compuestos con el fin de diferenciar su efecto de los EPPs.

### Perspectivas futuras:

- Optimizar el proceso de extracción de las fracciones de polifenoles podría ayudar a disminuir el contenido de solventes e incrementar la concentración de las fracciones.
- Evaluar diferentes concentraciones de las fracciones de polifenoles de orujo de uva sobre el control del peso corporal y comorbilidades e identificar los posibles mecanismos de acción relacionados con estos beneficios.
- Comparar con el orujo completo los efectos producidos con cada una de las fracciones de los polifenoles, para determinar efectos sinérgicos, antagónicos y complementarios, así como la participación de otros componentes del orujo de uva en la regulación de dichos beneficios.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods. A review. *Food Chemistry*, *152*, 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Albuquerque, B. R., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Could fruits be a reliable source of food colorants? Pros and cons of these natural additives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *61*(5), 805-835. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1746904>
- Amlathe, S., & Gupta, V. K. (1990). Spectrophotometric determination of acetone using vanillin. *Analyst*, *115*(10), 1385-1387.
- Antonioli, A., Fontana, A. R., Piccoli, P., & Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry*, *178*, 172-178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.082>
- Arias, N., Macarulla, M. T., Aguirre, L., Martínez-Castaño, M. G., & Portillo, M. P. (2014). Quercetin can reduce insulin resistance without decreasing adipose tissue and skeletal muscle fat accumulation. *Genes & Nutrition*, *9*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12263-013-0361-7>
- Azofeifa, G., Quesada, S., Navarro, L., Hidalgo, O., Portet, K., Pérez, A. M., ... & Michel, A. (2016). Hypoglycaemic, hypolipidaemic and antioxidant effects of blackberry beverage consumption in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of functional foods*, *26*, 330-337.
- Barbalho, S. M., Damasceno, D. C., Spada, A. P. M., Palhares, M., Martuchi, K. A., Oshiiwa, M., ... & Silva, V. S. D. (2011). Evaluation of glycemic and lipid profile of offspring of diabetic Wistar rats treated with *Malpighia emarginata* juice. *Journal of Diabetes Research*, *2011*(1), 173647.
- Beaudoin, M.S., Snook, L. A., Arkell, A. M., Simpson, J. A., Holloway, G. P., & Wright, D. C. (2013). Resveratrol supplementation improves white adipose tissue function in a depot-specific manner in Zucker diabetic fatty rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *305*(5), R542-R551. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00200.2013>

- Bello-Chavolla, O. Y., Rojas-Martinez, R., Aguilar-Salinas, C. A., & Hernández-Avila, M. (2017). Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutrition Reviews*, 75(1), 4-12. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw030>
- Belwal, T., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Habtemariam, S. (2017). Dietary anthocyanins and insulin resistance: When food becomes a medicine. *Nutrients*, 9(10), 1111. <https://doi.org/10.3390/nu9101111>
- Bié, J., Sepodes, B., Fernandes, P. C. B., & Ribeiro, M. H. L. (2023). Polyphenols in health and disease: Gut microbiota, bioaccessibility, and bioavailability. *Compounds*, 3(1), 40-72. <https://doi.org/10.3390/compounds3010005>
- Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18), 2505-2512.
- Bordiga, M., Travaglia, F., & Locatelli, M. (2019). Valorization of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity. A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 933-942. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14118>
- Boussenna, A., Cholet, J., Goncalves-Mendes, N., Joubert-Zakeyh, J., Fraise, D., Vasson, M. P., Texier, O., & Felgines, C. (2016). Polyphenol-rich grape pomace extracts protect against dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(4), 1260-1268. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7214>
- Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., & Arija, I. (2016). Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016>
- Buergo-Martínez, J. L. (2023). Control de la resistencia a la insulina asociada al consumo de orujo de uva con diferentes perfiles de compuestos fenólicos. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Recuperado de Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/7858>.
- Caimari, A., Del Bas, J. M., Crescenti, A., & Arola, L. (2013). Low doses of grape seed procyanidins reduce adiposity and improve the plasma lipid profile in hamsters. *International journal of obesity*, 37(4), 576-583. <https://doi:10.1038/ijo.2012.75>

- Carmina, E., Stanczyk, F. Z., & Lobo, R. A. (2013). Chapter 34: Laboratory Assessment. In *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Seventh Edition*. Elsevier Health Sciences, 822-850. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2758-2.00034-2>
- Castellanos-Gallo, L., Ballinas-Casarrubias, L., Espinoza-Hicks, J. C., Hernández-Ochoa, L. R., Muñoz-Castellanos, L. N., Zermeño-Ortega, M. R., Borrego-Loya, A., & Salas, E. (2022). Grape pomace valorization by extraction of phenolic polymeric pigments. A Review. *Processes*, *10*(3), 469. <https://doi.org/10.3390/pr10030469>
- Cerf, M. E. (2013). Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, *4*, 37. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00037>
- Chandel, N. S. (2021). Carbohydrate metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *13*(1), a040568. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040568>
- Chedea, V. S., Palade, L. M., Marin, D. E., Pelmus, R. S., Habeanu, M., Rotar, M. C., Gras, M. A., Pistol, G. C., & Taranu, I. (2018). Intestinal absorption and antioxidant activity of grape pomace polyphenols. *Nutrients*, *10*(5), 588. <https://doi.org/10.3390/nu10050588>
- Chen, Y., Li, E. M., & Xu, L. Y. (2022). Guide to metabolomics analysis: A bioinformatics workflow. *Metabolites*, *12*(4), 357. <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>
- Cheng, D. M., Pogrebnyak, N., Kuhn, P., Poulev, A., Waterman, C., Rojas-Silva, P., ... & Raskin, I. (2014). Polyphenol-rich Rutgers Scarlet Lettuce improves glucose metabolism and liver lipid accumulation in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Nutrition*, *30*(7-8), S52-S58.
- Choleva, M., Matalliotaki, E., Antoniou, S., Asimomyti, E., Drouka, A., Stefani, M., Yannakoulia, M., & Fragopoulou, E. (2022). Postprandial metabolic and oxidative stress responses to grape pomace extract in healthy normal and overweight/obese women: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study. *Nutrients*, *15*(1), 156. <https://doi.org/10.3390/nu15010156>
- Copado-Romero, J. L. (2020). Identificación de orujos de uva de diferentes vinícolas de la región de Querétaro con potencial para el control de riesgo

- cardiovascular. Tesis para obtener el título de licenciatura en Ingeniero Químico en Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro.
- Cremonini, E., Bettaieb, A., Haj, F. G., Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2016). (-)-Epicatechin improves insulin sensitivity in high fat diet-fed mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *599*, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.03.006>
- Cremonini, E., Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2019). (-)-Epicatechin in the control of glucose homeostasis: Involvement of redox-regulated mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, *130*, 478-488, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.010>
- Crescenti, A., del Bas, J. M., Arola-Arnal, A., Oms-Oliu, G., Arola, L., & Caimari, A. (2015). Grape seed procyanidins administered at physiological doses to rats during pregnancy and lactation promote lipid oxidation and up-regulate AMPK in the muscle of male offspring in adulthood. *The Journal of nutritional biochemistry*, *26*(9), 912-920. <https://doi:10.1016/j.jnutbio.2015.03.003> 33
- Cutrim, C. S., & Cortez, M. A. S. (2018). A review on polyphenols: classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, *71*(3), 564-578. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12515>
- da Costa, G. F., Santos, I. B., de Bem, G. F., Cordeiro, V. S. C., da Costa, C. A., de Carvalho, L. C. R. M., Teixeira-Ognibene, D., Castro-Resende, A., & Soares de Moura, R. (2017). The beneficial effect of anthocyanidin-rich *Vitis vinifera* L. grape skin extract on metabolic changes induced by high-fat diet in mice involves antiinflammatory and antioxidant actions. *Phytotherapy Research*, *31*(10), 1621-1632. <https://doi.org/10.1002/ptr.5898>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, *15*(10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dangles, O., & Fenger, J. A. (2018). The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and nutrition. *Molecules*, *23*(8), 1970. <https://doi.org/10.3390/molecules23081970>

- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., & Marín-Arroyo, M. R. (2011). Stability of polyphenolic extracts from grape seeds after thermal treatments. *European Food Research and Technology*, 232, 211-220. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1377-5>
- D'Eusanio, V., Malferrari, D., Marchetti, A., Roncaglia, F., & Tassi, L. (2023). Waste by-product of grape seed oil production: Chemical characterization for use as a food and feed supplement. *Life*, 13(2), 326. <https://doi.org/10.3390/life13020326>
- de Andrade, R. B., Machado, B. A. S., Barreto, G. de A., Nascimento, R. Q., Corrêa, L. C., Leal, I. L., Tavares, P. P. L. G., Ferreira, E. de S., & Umsza-Guez, M. A. (2021). Syrah grape skin residues has potential as source of antioxidant and anti-microbial bioactive compounds. *Biology*, 10(12), 1262. <https://doi.org/10.3390/biology10121262>
- de la Cerda-Carrasco, A., López-Solís, R., Nuñez-Kalasic, H., Peña-Neira, Á., & Obreque-Slier, E. (2015). Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(7), 1521-1527. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6856>
- Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44(9), 2712-2720. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.026>
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214-219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Ding, Y., Morozova, K., Scampicchio, M., & Ferrentino, G. (2020). Non-extractable polyphenols from food by-products: Current knowledge on recovery, characterization, and potential applications. *Processes*, 8(8), 925. <https://doi.org/10.3390/PR8080925>
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila*

- aromatica. Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Domínguez-Rodríguez, G., Marina, M. L., & Plaza, M. (2017). Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. *Journal of Chromatography A*, 1514: 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.066>
- Dorris, M. R., Voss, D. M., Bollom, M. A., Krawiec-Thayer, M. P., & Bolling, B. W. (2018). Browning index of anthocyanin-rich fruit juice depends on pH and anthocyanin loss more than the gain of soluble polymeric pigments. *Journal of Food Science*, 83(4), 911-921.
- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.063>
- Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Serwah Boateng, N. A., & Ma, H. (2020). Latest developments in polyphenol recovery and purification from plant by-products. A review. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 375-388. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.003>
- Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T. D., Stănilă, A., & Diaconeasa, Z. (2021). Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. *Antioxidants*, 10(12), 1967.
- Esparza, I., Cimminelli, M. J., Moler, J. A., Jiménez-Moreno, N., & Ancín-Azpilicueta, C. (2020). Stability of phenolic compounds in grape stem extracts. *Antioxidants*, 9(8), 720. <https://doi.org/10.3390/antiox9080720>
- Farajpour, M., Ebrahimi, M., Sadat-Hosseini, M., Al-Fekaiki, D. F., & Baghizadeh, A. (2024). Multivariate analysis of the phytochemical composition and antioxidant properties in twenty-five accessions across three *Achillea* species. *Scientific Reports*, 14(1), 11843. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62834-1>
- Feresin, R. G., Pourafshar, S., Huang, J., Zhao, Y., Arjmandi, B. H., & Salazar, G. (2017). Extraction and purification of polyphenols from freeze-dried berry powder for the treatment of vascular smooth muscle cells *in vitro*. *JoVE*

- (*Journal of Visualized Experiments*), (125), 55605.  
<https://doi.org/10.3791/55605>
- Fernández, K., Vega, M., & Aspé, E. (2015). An enzymatic extraction of proanthocyanidins from País grape seeds and skins. *Food chemistry*, 168, 7-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.021>
- Ferri, M., Rondini, G., Calabretta, M. M., Michelini, E., Vallini, V., Fava, F., Roda, A., Minnucci, G., & Tassoni, A. (2017). White grape pomace extracts, obtained by a sequential enzymatic plus ethanol-based extraction, exert antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammatory activities. *New Biotechnology*, 39, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.002>
- Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987-9003. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>
- Ghosh, D., & Parida, P. (2016). Drug discovery and development of type 2 diabetes mellitus: modern-integrative medicinal approach. *Current Drug Discovery Technologies*, 13(2), 60-67. <https://doi.org/10.2174/1570163813666160414105327>
- Gil-Sánchez, I., Cueva, C., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2018). Dynamic gastrointestinal digestion of grape pomace extracts: bioaccessible phenolic metabolites and impact on human gut microbiota. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.05.005>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217–225. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8)
- Gómez-Plaza, E., Miñano, A., & López-Roca, J. M. (2006). Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chemistry*, 97(1), 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.025>

- Gromova, L. v., Fetissova, S. O., & Gruzdkov, A. A. (2021). Mechanisms of glucose absorption in the small intestine in health and metabolic diseases and their role in appetite regulation. *Nutrients*, 13(7), 2474 <https://doi.org/10.3390/nu13072474>
- Haffner, S. M., Gonzalez, C., Miettinen, H., Kennedy, E., & Stern, M. P. (1996). A prospective analysis of the HOMA model: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care*, 19(10), 1138-1141. <https://doi.org/10.2337/diacare.19.10.1138>
- Han, F., Yang, P., Wang, H., Fernandes, I., Mateus, N., & Liu, Y. (2019). Digestion and absorption of red grape and wine anthocyanins through the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 211-224. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.025>
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M. G., Vincieri, F. F., & Romani, A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties. *Food chemistry*, 99(3), 464–469. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.057>
- Hollman, P. C. (2004). Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical biology*, 42, 74-83. <https://doi.org/10.3109/13880200490893492>
- Hosseini, S., Gharachorloo, M., Ghiassi-Tarzi, B., & Ghavami, M. (2016). Evaluation the organic acids ability for extraction of anthocyanins and phenolic compounds from different sources and their degradation kinetics during cold storage. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(4). <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0057>
- Hosseini, A., Razavi, B. M., Banach, M., & Hosseinzadeh, H. (2021). Quercetin and metabolic syndrome: A review. *Phytotherapy Research*, 35(10), 5352-5364. <https://doi.org/10.1002/ptr.7144>
- INEGI. (2023). *Estadística de defunciones registradas de Enero a Junio 2022 (Preliminar)*. <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/DR/DR-Ene-jun2022.pdf>. Fecha de consulta: de 21 de febrero 2023.
- Iosub, I., Kajzar, F., Meghea, A., Mircea, M. L., Geana, I., & Rau, I. (2014). Spectro-electrochemical properties of pelargonidin-3-o-glucoside. *Molecular*

- Crystals and Liquid Crystals*, 603(1), 136-145.  
<https://doi.org/10.1080/15421406.2014.968077>
- Jin, Q., O'Hair, J., Stewart, A. C., O'Keefe, S. F., Neilson, A. P., Kim, Y. T., McGuire, M., Lee, A., Wilder, G., & Huang, H. (2019). Compositional characterization of different industrial white and red grape pomaces in Virginia and the potential valorization of the major components. *Foods*, 8(12), 1-15.  
<https://doi.org/10.3390/foods8120667>
- Kahn, S. E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 46(1), 3-19. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-1009-0>
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4360-4367.
- Kar, P., Laight, D., Rooprai, H. K., Shaw, K. M., & Cummings, M. (2009). Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. *Diabetic Medicine*, 26(5), 526-531. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2009.02727.x>
- Keskin, M., Kurtoglu, S., Kendirci, M., Atabek, M. E., & Yazici, C. (2005). Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics*, 115(4), e500–e503. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1921>
- Khanal, R. C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2010). Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food research international*, 43(5), 1464-1469.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.018>
- Komatsu, M., Takei, M., Ishii, H., & Sato, Y. (2013). Glucose-stimulated insulin secretion. A newer perspective. *Journal of Diabetes Investigation*, 4(6), 511-516. <https://doi.org/10.1111/jdi.12094>

- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology reports*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Kunzek, H., Müller, S., Vetter, S., & Godeck, R. (2002). The significance of physico chemical properties of plant cell wall materials for the development of innovative food products. *European Food Research and Technology*, 214, 361-376. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0487-0>
- Le, X. T., Huynh, M. T., Pham, T. N., Than, V. T., Toan, T. Q., Bach, L. G., & Trung, N. Q. (2019). Optimization of total anthocyanin content, stability and antioxidant evaluation of the anthocyanin extract from Vietnamese *Carissa carandas* L. fruits. *Processes*, 7(7), 468. <https://doi.org/10.3390/pr7070468>
- Lee, H., & Lee, J. (2021). Anti-diabetic effect of hydroxybenzoic acid derivatives in free fatty acid-induced HepG2 cells via miR-1271/IRS1/PI3K/AKT/FOXO1 pathway. *Journal of Food Biochemistry*, 45(12), e13993. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13993>
- Lee, S. H., Park, S. Y., & Choi, C. S. (2022). Insulin resistance: from mechanisms to therapeutic strategies. *Diabetes and Metabolism Journal*, 46(1), 15-37. <https://doi.org/10.4093/DMJ.2021.0280>
- Legeay, S., Rodier, M., Fillon, L., Faure, S., & Clere, N. (2015). Epigallocatechin gallate: a review of its beneficial properties to prevent metabolic syndrome. *Nutrients*, 7(7), 5443-5468.
- Les, F., Cásedas, G., Gómez, C., Moliner, C., Valero, M. S., & López, V. (2021). The role of anthocyanins as antidiabetic agents: from molecular mechanisms to in vivo and human studies. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 77(1), 109-131. <https://doi.org/10.1007/s13105-020-00739-z>
- Li, H., Parry, J., Weeda, S., Ren, S., Castonguay, T. W., & Guo, T. L. (2016). Grape pomace aqueous extract (GPE) prevents high fat diet-induced diabetes and attenuates systemic inflammation. *Food and Nutrition Sciences*, 7(07), 647.
- Li, M., Chi, X., Wang, Y., Setrerrahmane, S., Xie, W., Xu, H. (2022). Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. *Signal*

- transduction and targeted therapy*, 7(1), 216. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01073-0>
- Li, Z., Pan, Q., Cui, X., & Duan, C. (2010). Optimization on anthocyanins extraction from wine grape skins using orthogonal test design. *Food Science and Biotechnology*, 19, 1047-1053. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0147-2>
- Liang, L., Liu, Y., Wu, L., Weng, L., Qiu, H., Zhong, W., & Meng, F. (2024). Advances in extraction protocols, degradation methods, and bioactivities of proanthocyanidins. *Molecules*, 29(10), 2179. <https://doi.org/10.3390/molecules29102179>
- Lizarraga, D., Vinardell, M. P., Noé, V., van Delft, J. H., Alcarraz-Vizán, G., van Breda, S. G., ... & Cascante, M. (2011). A lyophilized red grape pomace containing proanthocyanidin-rich dietary fiber induces genetic and metabolic alterations in colon mucosa of female C57BL/6J mice. *The Journal of nutrition*, 141(9), 1597-1604. <https://doi.org/10.3945/jn.110.133199>
- Lončarić, A., Pablo Lamas, J., Guerra, E., Kopjar, M., & Lores, M. (2018). Thermal stability of catechin and epicatechin upon disaccharides addition. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(5), 1195-1202. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13696>
- Luzardo-Ocampo, I., Dena-Beltrán, J. L., Ruíz-Herrera, X., Ocampo-Ruiz, A. L., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., & Macotela, G. (2023). Obesity-derived alterations in the lactating mammary gland: Focus on prolactin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 111810. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111810>
- Mallery, S. R., Budendorf, D. E., Larsen, M. P., Pei, P., Tong, M., Holpuch, A. S., Larsen, P. E., Stoner, G. D., Fields, H. W., Chan, K. K., Ling, Y., & Liu, Z. (2011). Effects of human oral mucosal tissue, saliva, and oral microflora on intraoral metabolism and bioactivation of black raspberry anthocyanins. *Cancer Prevention Research*, 4(8), 1209-1221. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0040>
- Mancusi, C., Izzo, R., di Gioia, G., Losi, M. A., Barbato, E., & Morisco, C. (2020). Insulin resistance the hinge betweenh and Type 2 diabetes. *High Blood*

- Pressure and Cardiovascular Prevention*, 27(6), 515-526.  
<https://doi.org/10.1007/s40292-020-00408-8>
- Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Esther-Torres Padrón, M., & Juan Santana-Rodríguez, J. (2009). Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. *Molecules*, 14(1), 298-320. <https://doi.org/10.3390/molecules14010298>
- Martínez-Maqueda, D., Zapatera, B., Gallego-Narbón, A., Vaquero, M. P., Saura-Calixto, F., & Pérez-Jiménez, J. (2018). A 6-week supplementation with grape pomace to subjects at cardiometabolic risk ameliorates insulin sensitivity, without affecting other metabolic syndrome markers. *Food & Function*, 9(11), 6010-6019. <https://doi.org/10.1039/c8fo01323c>
- Martínez-Meza, Y., Escobar-Ortiz, A., Buergo-Martínez, F., Pérez-Ramírez, I. F., Pérez-Jiménez, J., Salgado, L. M., & Reynoso-Camacho, R. (2023). Three varieties of grape pomace, with distinctive extractable:non-extractable polyphenol ratios, differentially reduce obesity and its complications in rats fed a high-fat high-fructose diet. *Foods*, 12(7), 1370. <https://doi.org/10.3390/foods12071370>
- Martínez-Meza, Y., Pérez-Jiménez, J., Salgado-Rodríguez, L. M., Castellanos-Jiménez, A. K., & Reynoso-Camacho, R. (2022). *In vivo* evaluation of the cardiometabolic potential of grape pomace: effect of applying instant controlled pressure drop. *Foods*, 11(21), 1-13. <https://doi.org/10.3390/foods11213537>
- Martínez-Meza, Y., Pérez-Jiménez, J., Rocha-Guzmán, N. E., Rodríguez-García, M. E., Alonzo-Macías, M., & Reynoso-Camacho, R. (2021). Modification on the polyphenols and dietary fiber content of grape pomace by instant controlled pressure drop, *Food Chemistry*, 360, 130035. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130035>
- Martínez-Meza, Y., Pérez-Jiménez, J., Castaño-Tostado, E., Pérez-Ramírez, I. F., Alonzo-Macías, M., & Reynoso-Camacho, R. (2022). Instant controlled pressure drop as a strategy to modify extractable and non-extractable phenolic compounds: a study in different grape pomace materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(23), 6911-6921. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c04583>

- Martinez-Saez, N., Fernandez-Gomez, B., Cai, W., Uribarri, J., & del Castillo, M. D. (2019). *In vitro* formation of Maillard reaction products during simulated digestion of meal-resembling systems. *Food Research International*, 118, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.056>
- McCleary, B. V., Sloane, N., Draga, A., & Lazewska, I. (2013). Measurement of Total Dietary Fiber Using AOAC Method 2009.01 (AACC International Approved Method 32-45.01): Evaluation and Updates. *Cereal Chemistry Journal*, 90(4), 396–414. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-10-12-0135-FI>
- Mitchell, A. E., Robertson, D., & Koh, E. (2017). Optimizing the extraction of procyanidins oligomers through decamer. *Nutrition & Food Science International Journal*, 4(2), 61-67. <https://doi.org/10.19080/NFSIJ.2017.04.555636>
- Mohammad, A., Shahnaz, T., & Sorayya, K. (2021). Effect of 8 weeks' supplementation grape seed extract on insulin resistance in iranian adolescents with metabolic syndrome: A randomized controlled trial. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 15(1), 197-203.
- Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(2), 85-118. <https://doi.org/10.1080/10408690490911710>
- Moore, M. C., Cherrington, A. D., Cline, G., Pagliassotti, M. J., Jones, E. M., Neal, D. W., Badet, C., & Shulman, G. I. (1991). Sources of carbon for hepatic glycogen synthesis in the conscious dog. *Journal of Clinical Investigation*, 88(2), 578-587. <https://doi.org/10.1172/JCI115342>
- Montagut, G., Bladé, C., Blay, M., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, M. J., Arola, L., Pinent, M. & Ardévol, A. (2010). Effects of a grapeseed procyanidin extract (GSPE) on insulin resistance. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(10), 961-967. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.08.001>
- Mourtzinis, I., & Goula, A. (2019). Polyphenols in agricultural byproducts and food waste. In *Polyphenols in plants*. Academic Press. 23–44. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00002-5>

- Muche, B. M., Speers, R. A., & Rupasinghe, H. V. (2018). Storage temperature impacts on anthocyanins degradation, color changes and haze development in juice of “Merlot” and “Ruby” grapes (*Vitis vinifera*). *Frontiers in Nutrition*, 5, 100. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00100>
- Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G. S., & Kakuda, Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 176-181. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.006>
- Nerantzis, E., & Tataridis, P. (2006). Integrated enology utilization of winery by-products into high added value products. *e-Journal of Science & Technology*, 1(3), 79-89. [https://www.researchgate.net/publication/237699859\\_Integrated\\_Enology\\_Utilization\\_of\\_winery\\_by-products\\_into\\_high\\_added\\_value\\_products](https://www.researchgate.net/publication/237699859_Integrated_Enology_Utilization_of_winery_by-products_into_high_added_value_products)
- Ninomiya, T. (2014). Diabetes Mellitus and dementia. *Current Diabetes Reports*, 14(5), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11892-014-0487-z>
- Novelli, E. L. B., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Rodrigues, H. G., Mani, F., Fernandes, A. A. H., Cicogna, A. C., & Novelli Filho, J. L. V. B. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*, 41(1), 111-119. <https://doi.org/10.1258/002367707779399518>
- OPS. (2021). *La carga de la diabetes mellitus en la Region of the Americas, 2000-2019*. <https://www.paho.org/es/enlace/carga-diabetes-mellitus#:~:text=En%20el%202019%2C%20la%20diabetes,de%20a%20C%20B1os%20en%20el%202019>. Fecha de consulta: 21 de enero 2023
- Pajuelo, D., Quesada, H., Díaz, S., Fernández-Iglesias, A., Arola-Arnal, A., Bladé, C., ... & Arola, L. (2012). Chronic dietary supplementation of proanthocyanidins corrects the mitochondrial dysfunction of brown adipose tissue caused by diet-induced obesity in Wistar rats. *British Journal of Nutrition*, 107(2), 170-178. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002728>
- Pascual-Serrano, A., Arola-Arnal, A., Suárez-García, S., Bravo, F. I., Suárez, M., Arola, L., & Bladé, C. (2017). Grape seed proanthocyanidin supplementation reduces adipocyte size and increases adipocyte number in obese rats.

- International Journal of Obesity*, 41(8), 1246-1255.  
<https://doi.org/10.1038/ijo.2017.90>
- Pascual-Serrano, A., Bladé, C., Suárez, M., & Arola-Arnal, A. (2018). Grape seed proanthocyanidins improve white adipose tissue expansion during diet-induced obesity development in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2632. <https://doi.org/10.3390/ijms19092632>
- Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, 253, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>
- Peng, J., Li, Q., Li, K., Zhu, L., Lin, X., Lin, X., Shen, Q., Li, G., & Xie, X. (2017). Quercetin improves glucose and lipid metabolism of diabetic rats: Involvement of Akt signaling and SIRT1. *Journal of Diabetes Research*, 1, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2017/3417306>
- Perdicaro, D. J., Rodriguez Lanzi, C., Fontana, A. R., Antonioli, A., Piccoli, P., Miatello, R. M., Diez, E. R., & Vazquez Prieto, M. A. (2017). Grape pomace reduced reperfusion arrhythmias in rats with a high-fat-fructose diet. *Food and Function*, 8(10), 3501-3509. <https://doi.org/10.1039/c7fo01062a>
- Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2014). Non-extractable polyphenols in plant foods: nature, isolation, and analysis. In *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*. Elsevier Inc, United States of America: 203–218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397934-6.00010-3>
- Pérez-Jiménez, J., & Torres, J. L. (2011). Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: The current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12713-12724. <https://doi.org/10.1021/jf203372w>
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., & Saura-Calixto, F. (2009). Proanthocyanidin content in foods is largely underestimated in the literature data: An approach to quantification of the missing proanthocyanidins. *Food Research International*, 42(10), 1381-1388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.002>

- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, *41*(3), 274-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>
- Pérez-Ramírez, I. F., Reynoso-Camacho, R., Saura-Calixto, F., & Pérez-Jiménez, J. (2018). Comprehensive characterization of extractable and nonextractable phenolic compounds by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight of a grape/pomegranate pomace dietary supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(3), 661-673. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05901>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Review*, *98*, 2133-2223. <https://doi.org/10.1152/physrev>
- Pirola, L., Johnston, A. M., & van Obberghen, E. (2004). Modulation of insulin action. *Diabetologia*, *47*(2), 170-184. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1313-3>
- Polce, S. A., Burke, C., França, L. M., Kramer, B., Paes, A. M. D. A., & Carrillo-Sepulveda, M. A. (2018). Ellagic acid alleviates hepatic oxidative stress and insulin resistance in diabetic female rats. *Nutrients*, *10*(5), 531. <https://doi.org/10.3390/nu10050531>
- Pozuelo, M. J., Agis-Torres, A., Hervert-Hernández, D., López-Oliva, M. E., Muñoz-Martínez, E., Rotger, R., & Goñi, I. (2012). Grape antioxidant dietary fiber stimulates *Lactobacillus* growth in rat cecum. *Journal of Food Science*, *77*(2), <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02520.x>
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Radojčin, M., & Dragović-Uzelac, V. (2016). Influence of acidity and extraction time on the recovery of flavonoids from grape skin pomace optimized by response surface methodology. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, *30*(4), 455-464. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2016.914>
- Qi, Q., Cai, D., Yu, X., Shi, J., Bai, W., & Yan, N. (2023). Anthocyanins in subtropical fruits. In *Anthocyanins in subtropical fruits*. CRC Press: 1-31.

- Rahim, S. A., & Geeso, S. G. (1992). Colorimetric determination of ethanol in the presence of methanol and other species in aqueous solution. *Talanta*, 39(11), 1489-1491. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(92\)80130-6](https://doi.org/10.1016/0039-9140(92)80130-6)
- Ramos-Romero, S., Martínez-Maqueda, D., Hereu, M., Amézqueta, S., Torres, J. L., & Pérez-Jiménez, J. (2020). Modifications of gut microbiota after grape pomace supplementation in subjects at cardiometabolic risk: A randomized cross-over controlled clinical trial. *Foods*, 9(9), 1279. <https://doi.org/10.3390/foods9091279>
- Ramdas Nayak, V. K., Satheesh, P., Shenoy, M. T., & Kalra, S. (2022). Triglyceride Glucose (TyG) Index: A surrogate biomarker of insulin resistance. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 72(5), 986–988. <https://doi.org/10.47391/JPMA.22-63>
- Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., & Hendrickx, M. (2006). Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). *Food Chemistry*, 94(2), 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.058>
- Reyes, L. F., & Cisneros-Zevallos, L. (2007). Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple-and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry*, 100(3), 885-894. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.002>
- Reyes-Martín, C. (2020). *El mercado de vino en México*.
- Rocchetti, G., Gregorio, R. P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Oliveira, P. G., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Mosele, J. I., Motilva, M.-J., Tomas, M., Patrone, V., Capanoglu, E., & Lucini, L. (2022). Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 811-842. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12921>
- Rodríguez Lanzi, C., Perdicaro, D. J., Gambarte Tudela, J., Muscia, V., Fontana, A. R., Oteiza, P. I., & Vazquez Prieto, M. A. (2020). Grape pomace extract supplementation activates FNDC5/irisin in muscle and promotes white adipose

- browning in rats fed a high-fat diet. *Food and Function*, 11(2), 1537-1546. <https://doi.org/10.1039/c9fo02463h>
- Rodriguez Lanzi, C., Perdicaro, D. J., Antonioli, A., Fontana, A. R., Miatello, R. M., Bottini, R., & Vazquez Prieto, M. A. (2016). Grape pomace and grape pomace extract improve insulin signaling in high-fat-fructose fed rat-induced metabolic syndrome. *Food & Function*, 7(3), 1544-1553. <https://doi.org/10.1039/c5fo01065a>
- Rodriguez Lanzi, C., Perdicaro, D. J., Landa, M. S., Fontana, A., Antonioli, A., Miatello, R. M., Oteiza, P. I., & Vazquez Prieto, M. A. (2018). Grape pomace extract induced beige cells in white adipose tissue from rats and in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 56, 224-233. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.001>
- Roopchand, D. E., Carmody, R. N., Kuhn, P., Moskal, K., Rojas-Silva, P., Turnbaugh, P. J., & Raskin, I. (2015). Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akermansia muciniphila* and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes*, 64(8), 2847-2858. <https://doi.org/10.2337/db14-1916>
- Rosenzweig, T., Skalka, N., Rozenberg, K., Elyasiyan, U., Pinkus, A., Green, B., Stanevsky, M., & Drori, E. (2017). Red wine and wine pomace reduced the development of insulin resistance and liver steatosis in HFD-fed mice. *Journal of Functional Foods*, 34, 379-389. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.043>
- Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., & Tommasi, N. de. (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, 100(1), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.041>
- SAGARPA. (1999). NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf). Fecha de consulta: 10 de marzo del 2023.
- Saura-Calixto, F., & Pérez-Jiménez, J. (Eds.). (2018). *Non-extractable Polyphenols and Carotenoids: Importance in Human Nutrition and Health: Fifth*

edition. The Royal Society of Chemistry.  
<https://doi.org/10.1039/9781788013208>

Secretaría de Salud. (1994). NOM-093-SSA1-1994. Norma oficial mexicana. Bienes y servicios. Preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Especificaciones sanitarias. Cédula de verificación. DOF.

[https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4721115&fecha=29/07/1994&print=true](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4721115&fecha=29/07/1994&print=true). Fecha de consulta: 10 de mayo del 2023.

Secretaría de Salud. (1994). NOM-110-SSA1-1994. Norma oficial mexicana. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. DOF.

[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4728925&fecha=15/08/1994](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4728925&fecha=15/08/1994).

Fecha de consulta: 10 de marzo del 2023.

Secretaría de Salud. (1994). NOM-111-SSA1-1994. Norma oficial mexicana. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. DOF. <http://www.economia-noms.gob.mx/normas/noms/1995/111-ssa1.pdf>.

Fecha de consulta: 07 de febrero del 2022.

Secretaría de Salud. (2009). NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. DOF.

<https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/3980/salud/salud.htm>

Secretaría de Salud. (2014). NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. DOF.

[https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015#gs.c.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015#gs.c.tab=0)

Seo, K. H., Kim, D. H., Jeong, D., Yokoyama, W., & Kim, H. (2017). Chardonnay grape seed flour supplemented diets alter intestinal microbiota in diet-induced obese mice. *Journal of Food Biochemistry*, 41(5), e12396.

<https://doi.org/10.1111/jfbc.12396>

- Serea, D., Condurache, N. N., Aprodu, I., Constantin, O. E., Bahrim, G. E., Stănciuc, N., ... & Rapeanu, G. (2022). Thermal stability and inhibitory action of red grape skin phytochemicals against enzymes associated with metabolic syndrome. *Antioxidants*, 11(1), 118. <https://doi.org/10.3390/antiox11010118>
- Serrano, J., Casanova-Martí, A., Gual, A., Pérez-Vendrell, A. M., Blay, M. T., Terra, X., Ardévol, A. & Pinent, M. (2017). A specific dose of grape seed-derived proanthocyanidins to inhibit body weight gain limits food intake and increases energy expenditure in rats. *European Journal of Nutrition*, 56, 1629-1636. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1209-x>
- SIAP. (2022). Producción de uva en México 2022. Ciudad de México. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/771603/Produccion\\_Uva\\_en\\_Mexico.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/771603/Produccion_Uva_en_Mexico.pdf)
- Sigurdson, G. T., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2018). Impact of location, type, and number of glycosidic substitutions on the color expression of o-dihydroxylated anthocyanidins. *Food Chemistry*, 268, 416-423. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.079>
- Shaheer, C. A., Hafeeda, P., Kumar, R., Kathiravan, T., Kumar, D., & Nadasabapathi, S. (2014). Effect of thermal and thermosonication on anthocyanin stability in jamun (*Eugenia jambolana*) fruit juice. *International Food Research Journal*, 21(6), 2189. [http://ifrj.upm.edu.my/21%20\(06\)%202014/19%20IFRJ%2021%20\(06\)%202014%20Kumar%20100.pdf](http://ifrj.upm.edu.my/21%20(06)%202014/19%20IFRJ%2021%20(06)%202014%20Kumar%20100.pdf)
- Sharma, R. J., Gupta, R. C., Singh, S., Bansal, A. K., & Singh, I. P. (2016). Stability of anthocyanins-and anthocyanidins-enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* ('jamun'). *Food Chemistry*, 190, 808-817. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.029>
- Shi, L., Zhao, W., Yang, Z., Subbiah, V., & Suleria, H. A. R. (2022). Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(54), 81112-81129. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111050>

- Sigurdson, G. T., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2018). Impact of location, type, and number of glycosidic substitutions on the color expression of o-dihydroxylated anthocyanidins. *Food chemistry*, 268, 416-423. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.079>
- Simental-Mendía, L. E., Rodríguez-Morán, M., & Guerrero-Romero, F. (2008). The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 6(4), 299–304. <https://doi.org/10.1089/met.2008.0034>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology*. Academic press. 299: 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sólyom, K., Solá, R., Cocero, M. J., & Mato, R. B. (2014). Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food Chemistry*, 159, 361-366. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.021>
- Sotelo-González, A. M., Reynoso-Camacho, R., Hernández-Calvillo, A. K., Castañón-Servín, A. P., García-Gutiérrez, D. G., Gómez-Velázquez, H. D. de J., Martínez-Maldonado, M. Á., de los Ríos, E. A., & Pérez-Ramírez, I. F. (2023). Strawberry, blueberry, and strawberry-blueberry blend beverages prevent hepatic steatosis in obese rats by modulating key genes involved in lipid metabolism. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20, 4418. <https://doi.org/10.3390/ijerph20054418>
- SSA. (2022). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública. 202-257. [https://www.insp.mx/resources/images/stories/2022/docs/220804\\_Ensa21\\_digital\\_4ago.pdf](https://www.insp.mx/resources/images/stories/2022/docs/220804_Ensa21_digital_4ago.pdf). Fecha de consulta: 21 de febrero del 2023.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-

- products as health promoters. A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15638-15678. <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>
- Tomaz, I., Šeparović, M., Štambuk, P., Preiner, D., Maletić, E., & Karoglan Kontić, J. (2018). Effect of freezing and different thawing methods on the content of polyphenolic compounds of red grape skins. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(3), e13550.
- Touriño, S., Pérez-Jiménez, J., Mateos-Martín, M. L., Fuguet, E., Vinardell, M. P., Cascante, M., & Torres, J. L. (2011). Metabolites in contact with the rat digestive tract after ingestion of a phenolic-rich dietary fiber matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 5955-5963. <https://doi.org/10.1021/jf200159f>
- Valdez Rodríguez, B. (2024). Suplementos de orujo de uva adicionado con ingredientes de origen vegetal para mejorar sus beneficios en el control de la obesidad y sus complicaciones. Tesis para obtener el título de licenciatura de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro.
- Vazquez-Prieto, M. A., Bettaieb, A., Rodriguez-Lanzi, C., Soto, V. C., Perdicaro, D. J., Galmarini, C. R., Haj, F. G., Miatello, R. M., & Oteiza, P. I. (2015). Catechin and quercetin attenuate adipose inflammation in fructose-fed rats and 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(4), 622-633. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400631>
- Vessal, M., Hemmati, M., & Vasei, M. (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135(3), 357-364. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00140-6)
- Vitaglione, P., & Fogliano, V. (2010). Cereal fibres, antioxidant activity and health. In *Dietary fibre: new frontiers for food and health* (pp. 379-393). Wageningen Academic.

- Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., & Warid, K. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 675-682.
- Xu, L., Li, Y., Dai, Y., & Peng, J. (2018). Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. *Pharmacological Research*, 130, 451-465. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.015>
- Xu, Y., Tang, G., Zhang, C., Wang, N., & Feng, Y. (2021). Gallic acid and diabetes mellitus: Its association with oxidative stress. *Molecules*, 26(23), 7115. <https://doi.org/10.3390/molecules26237115>
- Yang, C., Tian, X., Han, Y., Shi, X., Wang, H., & Li, H. (2023). Extracts of Dunkelfelder grape seeds and peel increase the metabolic rate and reduce Fat deposition in mice maintained on a high-fat diet. *Foods*, 12(17), 3251. <https://doi.org/10.3390/foods12173251>
- Yogalakshmi, B., Bhuvaneshwari, S., Sreeja, S., & Anuradha, C. V. (2014). Grape seed proanthocyanidins and metformin act by different mechanisms to promote insulin signaling in rats fed high calorie diet. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 8, 13-22. <https://doi.org/10.1007/s12079-013-0210-x>
- Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. In *International Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 221-237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>
- Zeng, Y. X., Wang, S., Wei, L., Cui, Y. Y., & Chen, Y. H. (2020). Proanthocyanidins: components, pharmacokinetics and biomedical properties. *The American Journal of Chinese Medicine*, 48(04), 813-869. <https://doi.org/10.1142/S0192415X2050041X>
- Zhu, F., Du, B., Zheng, L., & Li, J. (2015). Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry*, 186, 207-212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.057>

## IX. ANEXOS

### Anexo 1. Resolución comité de bioética.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA



C.U., Querétaro, abril 19, 2023  
No. de oficio. CBQ23/032

**Paloma Castilla Ramírez**  
Estudiante responsable  
Facultad de Química

**Dra. Rosalía Reynoso Camacho**  
Investigadora responsable  
Facultad de Química

**Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez**  
Colaboradora

El protocolo de investigación titulado “**Compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles y su asociación con la mejora en la resistencia a la insulina en un modelo de obesidad**” sometido a evaluación por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Química **involucra el uso de animales de experimentación**. Las características del diseño del protocolo de investigación son resumidas a continuación:

<b>Tipo de estudio</b>	<i>In vivo</i>
<b>Modelo experimental</b>	Ratas macho Wistar de 160-180 g
<b>Tamaño de muestra</b>	48 ratas
<b>Alojamiento</b>	Jaulas de acero inoxidable de 258 cm <sup>2</sup> en bioterio a 55%HR, 25 °C y ciclo luz-oscuridad de 12-12 h en el Posgrado de Alimentos de la Facultad de Química de la UAQ.
<b>Alimentación</b>	Dieta estándar (Rodent Lab Chow 5001)
<b>Inducción de enfermedad</b>	Dieta estándar con 20% grasa y 20% fructosa
<b>Administración de tratamiento</b>	Grupo i: dieta estándar; grupo ii: dieta alta en grasa y fructosa (DAGF); grupo iii: DAGF + 100 mg de extracto de polifenoles extraíbles de orujo de uva; grupo iv: DAGF + 100 mg de extracto de polifenoles no extraíbles de orujo de uva; grupo v: DAGF + 300 mg de extracto de polifenoles extraíbles de orujo de uva; grupo vi: DAGF + 300 mg de extracto de polifenoles no extraíbles de orujo de uva



<b>Monitoreo de animales</b>	Consumo de alimento y ganancia de peso
<b>Método de eutanasia</b>	Decapitación con guillotina
<b>Recolección de muestras biológicas</b>	Sangre
<b>Manejo de RPBI</b>	Se contratará un servicio para la recolección de los RPBI generados durante el estudio
<b>VARIABLES DE MEDICIÓN</b>	Resistencia a la insulina y metabólica en orina

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado “**Compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles y su asociación con la mejora en la resistencia a la insulina en un modelo de obesidad**”, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **pendiente de aprobación** debido a que el protocolo no describe toda la información necesaria para ser dictaminado:

- Especificar si las dietas y los tratamientos serán preparados siguiendo las buenas prácticas de manufactura y los estudios microbiológicos.
- Indicar cómo se verificará la ausencia de los disolventes en los tratamientos.
- Especificar qué monitoreos se realizarán como indicadores de posibles efectos adversos de los tratamientos y qué se realizará en caso de presentarse alguno.
- En la descripción del protocolo con animales, no se describe que se realizará la recolección de orina ni cómo se llevará a cabo.

Cabe mencionar que la Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez, miembro del Comité de Bioética de la Facultad de Química, no participó en la evaluación del protocolo de investigación por presentar conflicto de interés. Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes.

**Iza Fernanda Pérez Ramírez**  
Presidente  
Comité de Bioética de la Facultad de Química  
Universidad Autónoma de Querétaro