



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Control de la resistencia a la insulina asociada al consumo de  
orujo de uva con diferentes perfiles de compuestos fenólicos”**

**TESIS**

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

Presenta:

**Q.F.B. Fernando Buergo Martínez**

Dirigido por:

**Dra. Rosalía Reynoso Camacho**

Co-director:

**Dra. Jara Pérez Jiménez**

Santiago de Querétaro, Querétaro, 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de  
Información



Control de la resistencia a la insulina asociada al  
consumo de orujo de uva con diferentes perfiles de  
compuestos fenólicos

**por**

Fernando Buergo Martínez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** FQMAC-233925-0323-223



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

**“Control de la resistencia a la insulina asociada al consumo de orujo de uva con diferentes perfiles de compuestos fenólicos”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:  
**Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Presenta:**

Q.F.B. Fernando Buergo Martínez

**Dirigido por:**

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

**Co-dirigido por:**

Dra. Jara Pérez Jiménez

**SINODALES**

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Presidente

\_\_\_\_\_

Firma

Dra. Jara Pérez Jiménez

Secretario

\_\_\_\_\_

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca

Piña

Vocal

\_\_\_\_\_

Firma

Dra. Iza F. Pérez Ramírez

Suplente

\_\_\_\_\_

Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez

Suplente

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Director de la Facultad de Química

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca P.  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro. 28 de febrero de 2023

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico necesario para este proyecto de investigación.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Programa de Posgrado de Alimentos por la oportunidad de poder realizar mis estudios, en conjunto con la preparación y los conocimientos brindados durante este proyecto de investigación.

A la Dra. Rosalía, por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A mis sinodales, en especial a la Dra. Minerva.

A la Dra. Yuridia Martínez Meza; ya que, sin ella, este proyecto nunca hubiera existido.

Al Dr. Iván Luzardo; muchísimas gracias Iván, en verdad, gracias.

A mis compañeros de laboratorio Alex, Anita, Alejandra, Karen, Eréndira, Yaz, Mariana, Dulce, Bere, Lupita y Hugo; los cuales, fueron un pilar para la realización de este proyecto.

A mi familia y amigos, que soportaron tanto tiempo de quejas, estrés, desahogo, entre otras situaciones.

A Fer Dorantes y Xime Ávalos; que además de escucharme, me dieron muchos consejos para siempre seguir adelante.



***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.*

*Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.*

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and curves, representing the name Fernando Buergo Martínez.

Fernando Buergo Martínez

## RESUMEN

El orujo de uva es un subproducto con un alto contenido en compuestos fenólicos extraíbles (EPC) y compuestos fenólicos no extraíbles (NEPC). Se ha reportado que el orujo previene la resistencia a insulina y, dicho efecto, se ha asociado principalmente al consumo de EPC; mientras que los NEPC no han sido considerados para tales asociaciones. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del consumo de orujo de uva roja con diferentes contenidos de compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles sobre la resistencia a la insulina en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica e identificar los posibles compuestos fenólicos totales asociados a este beneficio. Se utilizaron orujos de uva de diferentes variedades con concentraciones contrastadas de estos compuestos en una relación de EPC:NEPC de 1.0 para Garnacha, 1,4 para Malbec, y 5.7 para Syrah. El orujo de Malbec presentó la mayor concentración de antocianinas como malvidina hexósido y catequinas, las cuales son EPC y el orujo de Garnacha de procianidinas diméricas y triméricas, mientras que Syrah presentó la mayor concentración de peonidina dihexósido y malvidina dihexósido. Para la evaluación *in vivo* se usaron ratas Wistar, las cuales se alimentaron durante 16 semanas con una dieta hipercalórica suplementada con orujo (1 g/kg/día). El consumo de orujo redujo el índice HOMA-IR 1.67-1.75 veces y mejoró la tolerancia a la glucosa, y contenido de glucógeno hepático sin diferencias significativas entre los grupos tratados. Los ácidos grasos libres séricos disminuyeron en un 24-33% para todos los grupos tratados con los orujos y el contenido de triglicérido fue un 47% menor en los animales tratados con Malbec, Garnacha un 31% y Syrah un 16%, comparado con los valores del grupo DAGF. El análisis de PCA mostró que todos los orujos mejoraron los niveles de glucosa sérico, insulina y resistencia a insulina, pero el orujo de la variedad Malbec ejerció ligeramente menor capacidad de regulación (HOMA-IR, 9.1) y el orujo Syrah (HOMA-IR, 6.2) fue ligeramente mejor; este efecto se asoció a su alto contenido de NEPC. Sin embargo, esta última variedad tuvo el menor efecto para disminuir los triglicéridos en suero, siendo el orujo de la variedad Malbec el que produjo el mayor efecto hipotrigliceridémico. En general, el orujo de uva ejerce beneficios en el control de la resistencia a la insulina; sin embargo, la proporción de sus EPC y NEPC solamente podría ser importante a considerar para la regulación de triglicéridos en suero.

**Palabras clave:** Resistencia a la insulina, triglicéridos, orujo de uva, compuestos fenólicos.

## ABSTRACT

Grape pomace is a by-product containing extractable phenolic compounds (EPCs) and non-extractable phenolic compounds (NEPCs). Grape pomace has been reported to prevent insulin resistance, and this effect has been mainly associated with the consumption of EPCs, whereas NEPCs have not been considered for such associations. Therefore, this work aimed to evaluate the effect of red grape pomace consumption with different contents of extractable and non-extractable phenolic compounds on insulin resistance in rats fed a hypercaloric diet and to identify the possible total phenolic compounds associated with this benefit. Grape pomace from different grape varieties with contrasting concentrations of these compounds at an EPC: NEPC ratio of 1.0 for Garnacha, 1.4 for Malbec, and 5.7 for Syrah were used. Malbec pomace presented the highest concentration of anthocyanins, such as malvidin hexoside and catechins, which are EPCs, and Garnacha pomace of dimeric and trimeric procyanidins, while Syrah presented the highest concentration of peonidin dihexoside and malvidin dihexoside. Wistar rats fed for 16 weeks with a hypercaloric diet supplemented with pomace (1 g/kg/day) were used for the in vivo evaluation. The consumption of pomace reduced the HOMA-IR index by 1.67-1.75 times and improved glucose tolerance and hepatic glycogen content without significant differences between the treated groups. Serum-free fatty acids decreased by 24-33% for all pomace-treated groups, and triglyceride content was 47% lower in Malbec, Grenache 31%, and Syrah 16% lower compared to DAGF group values. PCA analysis showed that all pomace improved serum glucose, insulin, and insulin resistance levels. Malbec pomace exerted slightly less regulatory capacity (HOMA-IR, 9.1), and Syrah pomace (HOMA-IR, 6.2) was slightly better; this effect was associated with its high NEPC content. However, the latter variety had the slightest effect in lowering serum triglycerides, with Malbec pomace producing the most significant hypotriglyceridemic effect. Overall, grape pomace exerts benefits in the control of insulin resistance; however, the ratio of its EPC and NEPC alone could be important to consider for regulating serum triglycerides.

**Keywords:** Insulin resistance, triglycerides, grape pomace, phenolic compounds.



## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Insulina.....	3
2.1.1. Cascada de señalización de la insulina .....	4
2.1.2. Resistencia a la insulina.....	5
2.2.1. Clasificación de compuestos fenólicos .....	6
2.3. Orujo de uva.....	9
2.3.1. Generalidades .....	9
2.3.2. Composición fitoquímica del orujo de uva .....	9
2.3.3. Orujo de uva y resistencia a la insulina .....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo general.....	19
4.2. Objetivos específicos .....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
5.1. Materiales.....	20
5.1.1. Animales .....	20
5.1.2. Material vegetal .....	20
5.2. Métodos .....	20
5.2.1. Extracción de polifenoles extraíbles.....	20
5.2.1.1. Cuantificación de compuestos fenólicos totales extraíbles .....	21
5.2.1.2. Cuantificación de antocianinas monoméricas extraíbles .....	21

5.2.1.3.	Cuantificación de flavonoides totales extraíbles.....	22
5.2.1.4.	Cuantificación de proantocianidinas extraíbles .....	23
5.2.2.	Compuestos fenólicos no extraíbles .....	23
5.2.2.1.	Extracción y cuantificación de proantocianidinas no extraíbles (NEPA)	23
5.2.2.2.	Extracción y cuantificación de polifenoles hidrolizables.....	23
5.2.2.3.	Identificación de compuestos fenólicos extraíbles .....	24
5.2.3.	Análisis microbiológico de orujo de uva.....	25
5.2.3.1.	Determinación de bacterias mesófilas aerobias.....	25
5.2.3.2.	Determinación de coliformes totales.....	25
5.2.3.3.	Determinación de hongos y levaduras .....	25
5.2.4.	Evaluación de los orujos de uva sobre el control de la resistencia a insulina <i>in vivo</i> .....	26
5.2.4.1.	Matanza .....	26
5.2.4.2.1	Curva de tolerancia oral a la glucosa .....	27
5.2.4.2.2.	Evaluación de la resistencia a la insulina.....	27
5.2.4.2.3.	Cuantificación de glucógeno hepático.....	27
5.2.4.3.1.	Triglicéridos en suero .....	28
5.2.4.3.2.	Cuantificación de ácidos grasos libres en suero.....	28
5.2.4.3.3.	Peroxidación lipídica.....	29
5.3.	Análisis estadístico .....	30
6.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	31
6.2.	Composición fitoquímica de los orujos de tres variedades de uva .....	31
6.4.	Composición microbiológica de las tres variedades de orujo de uva .....	39
6.5.	Evaluación del efecto del consumo de tres variedades de orujo de uva en animales alimentados con dietas hipercalóricas .....	40

6.4.1. Metabolismo de carbohidratos.....	40
6.5.4.3. Concentración de glucosa, insulina e índice HOMA-IR .....	40
6.5.4.4. Curva de tolerancia oral a la glucosa .....	42
6.5.4.5. Contenido de glucógeno hepático .....	43
6.5.5. Evaluación del metabolismo lipídico y niveles de oxidación hepática	45
7. CONCLUSIONES.....	52
8. BIBLIOGRAFÍA.....	54

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación y estructura de compuestos fenólicos .....	8
Cuadro 2. Comparación de algunos compuestos fenólicos de orujo de uva variedad Cabernet Mito cultivada en distintos años .....	11
Cuadro 3. Contenido de polifenoles extraíbles en muestras de orujo de uva .....	12
Cuadro 4. Contenido de polifenoles no extraíbles en muestras de orujo de uva ...	13
Cuadro 5. Análisis microbiológico de los orujos de las tres variedades.....	40
Cuadro 6. Cuantificación de glucosa, insulina y HOMA de animales tratados con orujo de uva de diferentes variedades y alimentados con una dieta hipercalórica	41
Cuadro 7. Concentración de triglicéridos, ácidos grasos libres en suero, y niveles de oxidación hepática en animales alimentados con una dieta hipercalórica y adicionada con orujos de uva de diferentes variedades.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cascada de señalización de la insulina.....	5
Figura 2. Concentración de compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles en tres variedades de orujo de uva.....	33
Figura 3. Contenido de flavanoles (a) y flavonoles (b) en orujo de tres variedades de uva.....	35
Figura 4. Contenido de proantocianidinas (a) y antocianinas (b) en orujo de tres variedades de uva.....	37
Figura 5. Mapa de calor o heatmap del perfil fitoquímico de los orujos de las variedades Malbec, Garnacha y Syrah.....	39
Figura 6. Curva de tolerancia a la glucosa de animales alimentados con una dieta hipercalórica y suplementada con orujos de diferentes variedades de uva.....	43
Figura 7. Contenido de glucógeno hepático de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica suplementada con orujo de diferentes variedades de uva.....	44
Figura 8. Análisis de componentes principales (PCA) del efecto de una dieta estándar, alta en grasa y fructuosa y adicionada con orujo de diferentes variedades de uva sobre la dinámica fisiológica del metabolismo de ratas asociado con la resistencia a insulina.....	49
Figura 9. Análisis de componentes principales (PCA) del efecto de una dieta alta en grasa y fructuosa adicionada con orujos de diferentes variedades de uva sobre la dinámica fisiológica del metabolismo de ratas asociado con la resistencia a insulina (a). Análisis de componentes principales del contenido de polifenoles extraíbles y no extraíbles de orujos de diferentes variedades de uva (b).....	51

## ABREVIATURAS

ac: Acetil

AGE: Productos de glicación avanzada

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EC: Equivalentes de catequina

EM: Equivalentes de malvidina

EPC: Polifenoles extraíbles

ESI: Ionización por electrospray

glc: Glucosa

GLUT2: Transportador de glucosa 2

GLUT4: Transportador de glucosa 4

HPP: Polifenoles hidrolizables

IR: Receptor de insulina

IRS-1: Receptor de insulina 1

IRS-2: Receptor de insulina 2

LPL: Lipoproteín lipasa

MS: Espectrometría de masas

NEPA: Proantocianidinas no extraíbles

NEPC: Polifenoles no extraíbles

PA: Proantocianidinas

pcm: p-cumaroil

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PIP3: Fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato

PKB: Proteína B quinasa

PKC: Proteína C quinasa

QTOF: Tiempo de vuelo cuadrupolo

S1P: Esfingosina 1 fosfato

SPH: Esfingolípidos esfingosina

## 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a la insulina es una condición patológica en la que las células dependientes de insulina, como son los adipocitos y las células musculares, no responden de manera adecuada a los niveles plasmáticos de insulina y, por lo tanto, el transporte de glucosa en estos tejidos se ve disminuida. En el hígado, la insulina tiene la función de inhibir la gluconeogénesis, por lo que una resistencia a la insulina se ve reflejada en un aumento en la producción de glucosa endógena (Singla *et al.*, 2010; Yaribeygi *et al.*, 2019). Esta respuesta alterada a la insulina incrementa el riesgo de diabetes; por lo tanto, los tratamientos que previenen y controlan esta alteración pueden tener un alto impacto en salud, tal es el caso de los compuestos fenólicos.

Una fuente importante de dichos compuestos es el orujo de uva. El orujo de uva es un subproducto de la industria vitivinícola conformado por las semillas, piel y tallos (Yu & Ahmedna, 2013). Este subproducto contiene compuestos fenólicos extraíbles (EPC) y no extraíbles (NEPC). Entre los compuestos extraíbles destacan las antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenos (Kammerer *et al.*, 2004). Por otro lado, respecto a los no extraíbles, se incluyen las proantocianidinas no extraíbles y los polifenoles hidrolizables (Arranz *et al.*, 2010; Brenes *et al.*, 2016; Solari-Godiño *et al.*, 2017). Adicionalmente, el orujo presenta alto contenido de fibra, específicamente lignina, pectinas, celulosa y hemicelulosa (González-Centeno *et al.*, 2010).

Existen varios reportes en los que se ha demostrado que el orujo de uva disminuye la resistencia de insulina. Por ejemplo, el consumo de orujo evaluado en personas con síndrome metabólico mejoró la resistencia a la insulina (Martínez-Maqueda *et al.*, 2018). Ratas y ratones alimentados con una dieta alta en grasa y con orujo de uva presentaron una disminución de la glucosa sanguínea, insulina en ayuno y una mejora de la tolerancia a la glucosa (Rosenzweig *et al.*, 2017; Gerardi *et al.*, 2020). Sin embargo, la mayoría de los estudios han evaluado extractos de orujo, principalmente enriquecidos con antocianinas. Dichos beneficios se relacionaron con un incremento de proteínas de la señalización de



insulina, así como una mejora de sus fosforilaciones (da Costa *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017; Van Hul *et al.*, 2018).

Por otro lado, uno de las principales limitantes del uso del orujo de uva es su composición fitoquímica, la cual presenta variaciones que dependen de la variedad, la región donde fue cultivada, las condiciones ambientales y el proceso de vinificación (Copado Romero, 2020). Por lo tanto, es importante identificar los compuestos fenólicos asociados a los beneficios de la resistencia a la insulina y, de esta manera, utilizar esta composición para seleccionar a los orujos con mayor potencial para el control de esta patología.

Por lo tanto, este proyecto tuvo como objetivo evaluar el efecto del consumo de orujo de uva con diferentes contenido de compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles sobre el control de la resistencia a insulina en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica e identificar la asociación de estos compuestos bioactivos con los beneficios a la salud.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Insulina

La insulina es una proteína que actúa como hormona la cual es sintetizada en los islotes de las células  $\beta$  del páncreas, también conocidos como islotes de Langerhans. Este conjunto de células son los encargados de mantener las concentraciones séricas de glucosa ya que ayudan a la captación de este monosacárido en ciertos tejidos, tales como el adiposo y muscular, además de ser una molécula señal para algunos procesos metabólicos en el hígado (Wilcox, 2005; NIDDK, 2018).

La insulina participa en distintas rutas del metabolismo de los carbohidratos, por ejemplo, en la absorción de glucosa en células dependientes de insulina como las células musculares y de tejido graso, al translocar el transportador de glucosa (GLUT4) a las membranas celulares desde las vesículas intracelulares. La insulina también induce la formación de glucógeno, al desfosforilar la sintasa de glucógeno, y disminuye la gluconeogénesis al inhibir la 2,6 bifosfofructoquinasa (Wilcox, 2005).

Esta hormona es importante para el metabolismo, y es secretada en función a la demanda metabólica. Las células beta pancreáticas se encuentran sumamente vascularizadas, por lo que fácilmente pueden percibir el cambio en la concentración plasmática de glucosa (Schmitz *et al.*, 2008). Este efecto se debe a la presencia de pequeños poros llamados fenestras, los cuales favorecen el recambio de nutrientes entre la sangre y los tejidos, así como, la salida de la insulina al torrente sanguíneo (Suckale & Solimena, 2008).

La glucosa es el principal inductor de la liberación de la insulina. El páncreas expresa el transportador de glucosa 2 (GLUT2), el cual no es insulino-dependiente; por lo que una alta concentración de este monosacárido y el subsecuente metabolismo del mismo, genera la señal de exocitosis de la insulina, así como su síntesis *de novo* (Schmitz *et al.*, 2008).

### **2.1.1. Cascada de señalización de la insulina**

La insulina presenta sus efectos fisiológicos al unirse a su receptor que está localizado en la membrana de la célula. El receptor de insulina (IR, por sus siglas en inglés) es una proteína tetramérica tirosina quinasa, formado por dos subunidades extracelulares (subunidad alfa), las cuales se unen a la insulina; y dos subunidades transmembranales (subunidad beta), donde cada una de estas presenta un dominio de tirosina quinasa (Petersen & Shulman, 2018).

Cuando la insulina se une a la subunidad alfa, la subunidad beta presenta un cambio conformacional y se autofosforila en los residuos de tirosina, lo que produce un reclutamiento de varias proteínas, incluyendo al sustrato del receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés), el cual es fosforilado por IR en residuos de tirosina (Yaribeygi *et al.*, 2019).

El IRS-1 activado desencadena la transducción de señales al acoplarse a la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la cual se activa y cataliza la transformación del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). El PIP3 tiene la capacidad de activar varias proteínas del tipo quinasa, principalmente a la proteína quinasa B (PKB), la cual da la señal para que el transportador de glucosa GLUT-4 se transloque a la membrana celular y permitir la entrada de glucosa a la célula (Yaribeygi *et al.*, 2019) (Figura 1).

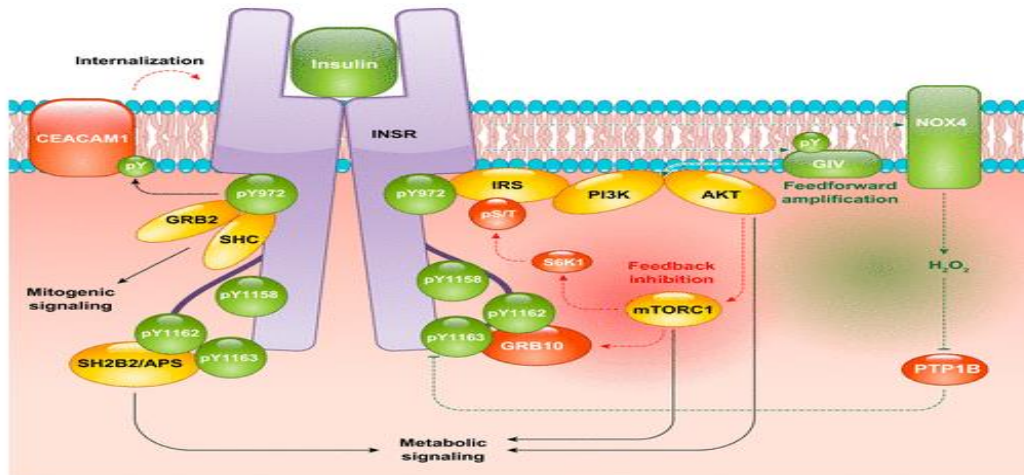


Figura 1. Cascada de señalización de la insulina (Petersen & Shulman, 2018).

### 2.1.2. Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es una condición patológica en la que las células dependientes de insulina, como los adipocitos, las células musculares y el hígado, no responden a los niveles plasmáticos de insulina y, por lo tanto, pueden producir distintos desórdenes metabólicos como la obesidad, dislipidemia, hipertensión, aterosclerosis, hígado graso y diabetes mellitus tipo 2 (Yaribeygi *et al.*, 2019).

El estrés oxidativo ha sido asociado a la resistencia a insulina, este es definido por un exceso de especies oxidativas endógenas, las cuales alteran las vías de señalización y dañan las células. El estrés oxidativo activa fosforilaciones de residuos de serina del receptor de insulina (IR) y de los sustratos del receptor de insulina (IRS), además disminuyen las fosforilaciones de residuos de tirosina, inhibiendo su actividad (Evans *et al.*, 2003). De igual forma, la presencia de ácidos grasos libres promueve la resistencia a la insulina debido a que induce la síntesis de diacilglicerol, se activa PKC y esta fosforila en residuos de serina/treonina a IRS-1, provocando una menor translocación de GLUT4 en tejido muscular y adiposo, así como un aumento en la gluconeogénesis y una disminución en la actividad de la glucógeno sintasa en hígado, lo que disminuye la síntesis de glucógeno (Petersen & Shulman, 2006).

Las mitocondrias contribuyen a la oxidación en la célula debido a los entornos ricos en nutrientes, ya que un mayor suministro de glucosa en las dietas altas en azúcar, las mitocondrias tienen más sustrato disponible para producir ATP y esto incrementa la actividad de la cadena respiratoria y la liberación de electrones, produciendo más especies reactivas del oxígeno (ERO). Las ERO estimulan directamente a proteínas como lo son NF-kB , JNK y p38 MAPK lo que da como resultado alteraciones del receptor de insulina. Se ha demostrado que la resistencia a la insulina se puede prevenir al restringir la sobreactivación mitocondrial (Yaribeygi *et al.*, 2020).

## **2.2. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, se encuentran abundantemente distribuidos en las raíces, hojas semillas y frutos. Estos compuestos presentan al menos un anillo aromático en su estructura, así como un grupo hidroxilo. Estos anillos pueden estar de manera conjugada, como glucósidos, con uno o varios residuos de azúcares unidos a los anillos por medio de un grupo hidroxilo o bien de forma conjugada con otros compuestos. Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en función a su estructura (Manach & Donovan, 2004; Laura *et al.*, 2019).

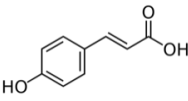
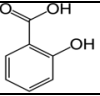
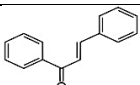
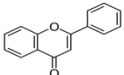
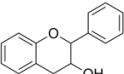
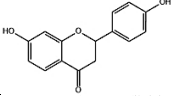
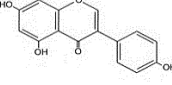
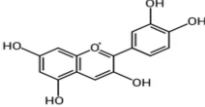
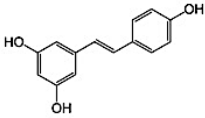
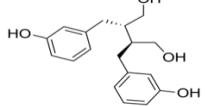
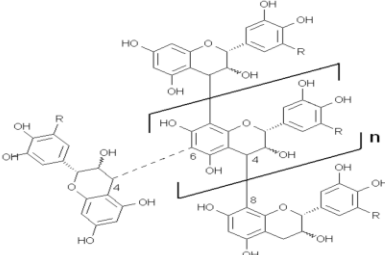
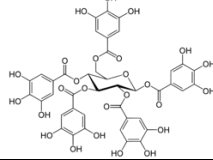
### **2.2.1. Clasificación de compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en compuestos extraíbles y no extraíbles. Los compuestos fenólicos extraíbles (EPPs) son solubilizados en solventes acuosos orgánicos y pueden encontrarse como ácidos fenólicos libres o esterificados, flavonoides y proantocianidinas de bajo o medio peso molecular (dímeros a decámeros de catequina y epicatequina), así como, estilbenos y lignanos. Los compuestos fenólicos extraíbles con mayor presencia en la naturaleza son los ácidos fenólicos y los flavonoides. Estos últimos están formados por dos anillos de tipo benceno (A y B) unidos con un heterociclo de tres carbonos con un oxígeno. Estos flavonoides pueden subdividirse en antocianinas,

flavan-3-oles, flavonas, flavanonas y flavonoles (Cuadro 1) (Cutrim & Cortez, 2018).

Los compuestos polifenólicos no extraíbles (NEPPs), incluyen a las proantocianidinas no extraíbles (NEPAs), estas son polímeros de flavan-3-oles de alto peso molecular, las cuales están libres en la matriz alimentaria. También se encuentran los polifenoles de menor peso molecular, como los ácidos fenólicos unidos a proteína o polisacáridos de la pared celular, y taninos hidrolizables que tiene un centro de glucosa u otro poliol esterificado con ácido gálico, llamados galotaninos o con ácido elágico, llamados elagitaninos. Estos NEPPs permanecen en el residuo de la extracción acuosa-orgánica. Por lo tanto para su extracción, se requiere de una hidrólisis enzimática o química mediante un tratamiento de la matriz con álcalis o ácidos (Arranz *et al.*, 2010; Zurita *et al.*, 2012) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación y estructura de compuestos fenólicos

<b>Compuestos fenólicos extraíbles</b>	
<b>Ácidos fenólicos</b>	
Ácidos hidroxicinámicos	
Ácidos hidroxibenzoicos	
<b>Flavonoides</b>	
Chalconas	
Flavones	
Flavonoles	
Flavanones	
Isoflavonoides	
Antocianinas	
Estilbenos	
Lignanós	
<b>Compuestos fenólicos no extraíbles</b>	
Proantocianidinas no extraíbles	
Taninos hidrolizables	

(Adaptado de Hano, 2020).

## **2.3. Orujo de uva**

### **2.3.1. Generalidades**

El orujo de uva es una matriz en la que abundan compuestos fenólicos. Este subproducto se obtiene de la industria vinícola y se compone básicamente de las semillas, la piel y tallos de la uva; consta aproximadamente del 20-25% del peso total de la uva procesada durante la producción de vino (Yu & Ahmedna, 2013; Gil-Sánchez *et al.*, 2018).

### **2.3.2. Composición fitoquímica del orujo de uva**

El orujo de uva contiene compuestos fenólicos extraíbles representando aproximadamente un contenido de 4.9-5.8 g/100 g en base seca, dentro de los cuales se encuentran ácidos fenólicos simples del tipo hidroxicinámico (ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinapínico), ácidos hidroxibenzoicos (ácido protocatecuico, gálico, siríngico y gentílico). Contiene flavonoides de subclase de flavonoles (kaempferol, quercetina y miricetina), flavanoles como (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y (-)-epigallocatequina 3-O-galato. Además, el orujo también presenta antocianinas (cianidina 3-O-glucósido, malvidina 3-O-glucósido y delphinidina 3-O-glucósido), estilbenos (como resveratrol), polifenoles poliméricos (proantocianidinas, galotaninosy elagitaninos) (Beres *et al.*, 2017). Por otro lado, el orujo de uva también presenta polifenoles no extraíbles (NEPC), siendo estos los que se encuentran en mayor cantidad y, de manera más abundante, las proantocianidinas no extraíbles (NEPA) (Pérez-Jímenez *et al.*, 2009; Martínez-Meza *et al.*, 2021). Este subproducto también presenta alto contenido de fibra, específicamente lignina, pectinas, celulosa y hemicelulosa (González-Centeno *et al.*, 2010).

La composición fitoquímica del orujo de uva varía por el lugar donde se cultiva la uva, la variedad de la uva, clima, madurez y tiempo de fermentación (Yu & Ahmedna, 2013). Cantos *et al.* (2002) analizaron 4 variedades rojas de orujo de uva y encontraron que las antocianinas mayoritarias fueron cianidina 3-O-



glucósido, petudina 3-O-glucósido y malvidina 3-O-glucósido, donde la variedad que presentaba una mayor cantidad de antocianinas fue Flame seedless. En el caso de los flavonoides los compuestos mayoritarios encontrados en las variedades de orujo de uva fueron quercetina 3-O-glucurónido, quercetina 3-O-rutinósido, siendo la variedad Red globe la que presentó la mayor concentración de flavonoides totales. Para el caso de ácidos hidroxicinámicos, el ácido cafeoiltartárico fue el más abundante en la variedad Flame seedless.

En el mismo sentido, en un análisis de la composición fitoquímica de orujos de 4 variedades rojas de uva cultivadas en Brasil, se encontró en un análisis la mayor concentración de antocianinas en la variedad Bordeaux, quercetina y derivados de kaempferol en Merlot, la catequina en Cabernet Sauvignon y epicatequina en la variedad Isabel (Rockenbach *et al.*, 2011).

En los estudios mencionados anteriormente, los autores asociaron la composición de compuestos fenólicos de orujos de uva con la variedad. Sin embargo, también se ha reportado que existen cambios en la composición fitoquímica en orujos de la misma variedad producidos en el mismo viñedo en diferente año. Para Cabernet Mitos, el contenido de malvidina 3-O-glucósido, peonidina 3-O-glucósido, ácido caftárico y *trans*-resveratrol presentaron diferencias de 2.5, 2.5, 2.8 y 11 veces, respectivamente, entre dos años de producción, atribuyendo este efecto a factores climáticos y microclimáticos, estado de madurez de la uva y factores tecnológicos durante la producción de vino (Kammerer *et al.*, 2004) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de algunos compuestos fenólicos de orujo de uva variedad Cabernet Mito cultivada en distintos años

<b>Compuesto (mg/kg materia seca)</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>
Delfinidina 3-O-glucósido	2213 ± 38	5552 ± 48
Cianidina 3-O-glucósido	759 ± 35	1903 ± 11
Petunidina 3-O-glucósido	2643 ± 18	6680 ± 63
Peonidina 3-O-glucósido	4960 ± 16	12450 ± 158
Malvidina 3-O-glucósido	20533 ± 92	50981 ± 1000
Petunidina 3-O-acetilglucósido	545 ± 32	1375 ± 11
Malvidina 3-O-acetilglucósido	3110 ± 106	8688 ± 313
Petunidina 3-p-cumaroilglucósido	974 ± 26	2458 ± 0
Peonidina 3-p-cumaroilglucósido	2451 ± 94	6828 ± 57
Malvidina 3-p-cumaroilglucósido	10591 ± 201	31442 ± 192
Ácido caftárico	624.3 ± 10.1	217.7 ± 77.3
<i>Trans</i> -resveratrol	123.0 ± 5.1	11.1 ± 1.6

(Adaptado de Kammerer *et al.*, 2004).

En el estado de Querétaro, las casas productoras de vino utilizan diferentes variedades de uva y algunas distintos procesos, esto tiene como consecuencia variaciones en la composición fitoquímica de los orujos. En estudios previos realizado con 12 subproductos de uva roja, provenientes de diferentes casas productoras de vino, se encontró que los subproductos que presentan mayor concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides fueron los de las variedades Malbec, Garnacha y Merlot; mientras que, Syrah mostró bajo contenido de este tipo de compuestos (Copado Romero, 2020) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Contenido de polifenoles extraíbles en muestras de orujo de uva

<b>Viñedo</b>	<b>Variedad</b>	<b>Compuestos fenólicos totales (mg EAG/g)</b>	<b>Flavonoides (mg EC/g)</b>	<b>Antocianinas (mg EM/g)</b>	<b>Proantocianidinas extraíbles (mg PA/g)</b>
La Redonda	Malbec	49.4 ± 1.5	49.7 ± 2.0	2.9 ± 0.07	5.5 ± 0.1
Azteca	Syrah	16.8 ± 0.5	10.9 ± 0.5	1.47 ± 0.06	3.6 ± 0.1
Del Marqués	Garnacha	52.0 ± 2.6	53.7 ± 2.5	0.74 ± 0.03	1.8 ± 0.0
	Syrah	39.1 ± 1.5	31.4 ± 1.1	1.60 ± 0.05	4.0 ± 0.1
	Cabernet Sauvignon	37.8 ± 0.5	39.2 ± 1.4	1.35 ± 0.06	3.1 ± 0.1
	Merlot	50.2 ± 1.3	47.8 ± 2.0	0.81 ± 0.03	3.5 ± 0.1
Viña Magal	Cabernet Sauvignon	42.3 ± 2.1	35.7 ± 1.7	2.17 ± 0.10	3.2 ± 0.0
	Merlot	43.5 ± 3.0	35.5 ± 1.5	1.12 ± 0.05	3.2 ± 0.1
	Tempranillo	37.5 ± 1.9	32.9 ± 1.1	1.25 ± 0.05	3.1 ± 0.1

EAG: Equivalentes de ácido gálico; EC: Equivalentes de catequina; EM: Equivalentes de malvidina; PA: Proantocianidinas (Modificado de Copado Romero, 2020).

Para el caso de los compuestos fenólicos no extraíbles, la variedad Syrah presentó una mayor concentración de este tipo de fitoquímicos (Copado Romero, 2020) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Contenido de polifenoles no extraíbles en muestras de orujo de uva

<b>Viñedo</b>	<b>Variedad</b>	<b>NEPA (mg PA/g)</b>	<b>HPP (mg GAE/g)</b>
La Redonda	Malbec	64.40 ± 3.06	19.79 ± 0.83
Azteca	Syrah	86.11 ± 3.92	24.90 ± 0.98
Del Marqués	Garnacha	38.78 ± 1.86	20.40 ± 0.79
	Syrah	80.50 ± 3.81	23.61 ± 0.74
	Cabernet Sauvignon	57.98 ± 1.64	21.20 ± 0.49
	Merlot	85.49 ± 3.42	18.10 ± 0.71
Viña Magal	Cabernet Sauvignon	55.29 ± 2.61	20.20 ± 1.12
	Merlot	34.64 ± 1.53	19.44 ± 0.70
	Tempranillo	40.60 ± 1.52	23.17 ± 0.98

NEPA: Proantocianidinas no extraíbles; PA: Proantocinidinas HPP: Polifenoles hidrolizables; GAE: Equivalentes de ácido gálico (Modificado de Copado Romero, 2020).

### 2.3.3. Orujo de uva y resistencia a la insulina

Algunos estudios se han realizado para determinar el efecto de orujo sobre la resistencia a insulina. En humanos adultos aparentemente sanos, el consumo agudo de una bebida de este subproducto incrementó la sensibilidad de la insulina en tejidos periféricos, así como la insulina posprandial, sugiriendo un menor riesgo para desarrollar diabetes tipo 2 (Costabile *et al.*, 2019). Mohammad *et al.* (2021), evaluaron durante 8 semanas el efecto del consumo de 100 mg/día de extracto de semilla de uva en adolescentes que presentaban síndrome metabólico, y reportaron una disminución en la concentración de la insulina y en la resistencia.

Estudios realizado con orujo de uva completo han reportado que humanos que presentaban al menos dos factores de riesgo de síndrome metabólico, y que consumieron durante 6 semanas 8 g/día de un suplemento de orujo de uva, se mejoró la resistencia a la insulina (Martínez-Maqueda *et al.*, 2018). Asimismo,

ratas alimentadas con una dieta obesogénica y suplementada con orujo de uva (1 g/kg) durante 6 semanas presentaron una mayor respuesta a la insulina (HOMA-IR). Los autores demostraron que en tejido adiposo epididimal se presentó una disminución de las fosforilaciones de Ser307 en IRS-1 y un aumento de las fosforilaciones de Ser472 en AKT, mecanismo relacionado con el aumento de la sensibilidad de la insulina (Rodríguez Lanzi *et al.*, 2016).

A pesar de todos estos reportes en los cuales se ha demostrado el beneficio de orujo, algunos autores han reportado resultados contradictorios como Rodríguez Lanzi *et al.* (2016), quienes administraron el orujo de uva completo (1 g/kg/día) por 16 semanas a ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa; y dicho tratamiento no redujo la resistencia a insulina. Esto podría estar relacionado a la composición fitoquímica de los orujos.

Respecto a compuestos bioactivos del orujo de uva, se ha evaluado un extracto de antocianinas (200 mg/día) durante 12 semanas en ratones que consumieron una dieta alta en grasa, y se reportó que dicho extracto presentó un efecto preventivo de la resistencia a insulina. Esos efectos fueron relacionados con una modulación positiva de las proteínas señalizadoras de insulina (IR, pIRS, PI3K, pAKT), y la expresión de GLUT-4 en tejido adiposo y muscular (da Costa *et al.*, 2017).

Finalmente, ratas Wistar alimentadas con una dieta de cafetería y tratadas con proantocianidinas extraíbles (25 mg/kg) durante 9 semanas, se reportó un incremento en la secreción del péptido similar al glucágon (GLP-1) del intestino y su aumento se asoció a una mejora en la resistencia a insulina (HOMA-IR) (González-Abuin *et al.*, 2014).

Con base a esta información, es claro la capacidad del orujo de uva para mejorar la resistencia a insulina, y hasta el momento se ha reportado que el beneficio está relacionado con compuestos fenólicos extraíbles. Sin embargo, el orujo de uva tiene un alto contenido de compuestos fenólicos no extraíbles y para estos, solamente se ha sugerido un efecto en salud. Por lo tanto, es importante

determinar el efecto de los NEPP en la resistencia a insulina. En este proyecto se planteó utilizar orujos de uva de diferentes variedades con una relación contrastante de EPP:NEPP para evaluar sus beneficios en el control de la resistencia a insulina.

Esto permitirá avanzar en la identificación de orujos con potencial para ser utilizado en salud.



### 3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, el interés por dietas altas en compuestos fenólicos ha aumentado de manera significativa debido a sus beneficios en enfermedades crónicas no transmisibles asociadas a la resistencia a la insulina. Se ha reportado que en la resistencia a la insulina, la actividad de las proteínas que participan en la señalización de la insulina disminuye y, por lo tanto, se altera el transporte de glucosa en células adiposas y musculares, y se incrementa la producción de glucosa hepática, generando hiperglicemia en los individuos y, a largo plazo, complicaciones que producen altas tasas de mortalidad.

Por lo tanto, el control de estas alteraciones es un factor clave y los compuestos fenólicos derivados de algunos subproductos agroindustriales como el orujo de uva son una alternativa. Su relevancia radica en el alto contenido y diversidad de compuestos fenólicos. Se ha reportado que el consumo de orujo de uva regula la resistencia a la insulina y mejora la respuesta de esta hormona en condiciones posprandiales. El consumo de orujo también es capaz de regular el metabolismo de lípidos alterados. Estos beneficios han sido asociados principalmente a compuestos fenólicos extraíbles como las antocianinas y proantocianidinas. Sin embargo, el orujo es un subproducto con concentraciones altas de compuestos fenólicos no extraíbles, los cuales también se han recomendado para el control de estas enfermedades metabólicas, pero sus beneficios no han sido demostrados.

Por otro lado, una de las principales limitaciones en el uso del orujo con fines terapéuticos es la variación en su composición. Se ha reportado que los compuestos fenólicos, tanto extraíbles como no extraíbles de los orujos de uva dependen del cultivo, la etapa de madurez del fruto, su cosecha, así como las condiciones del proceso de elaboración del vino. Esto se debe considerar en los estudios realizados ya que la composición del orujo de uva es un factor que determina los beneficios a la salud. Sin embargo, estas variables que afectan la composición no pueden ser controladas y por ello, es importante identificar los compuestos que podrían tener relevancia en los beneficios del orujo.



Con base en lo anterior, en este proyecto se plantea evaluar orujos de uva con diferentes contenidos de compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles sobre el control de resistencia a insulina y determinar su asociación con dichos compuestos. Con esta información, se tendrá una aproximación para seleccionar aquellos orujos de uva con mayor potencial a la salud y se avanzará en la participación de los NEPPs en la prevención de la resistencia a insulina.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar el consumo de orujo de uva roja con diferentes contenidos y perfiles de compuestos fenólicos sobre la resistencia a la insulina en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica e identificar los posibles compuestos bioactivos asociados a este beneficio.

### **4.2. Objetivos específicos**

-Caracterizar los compuestos fenólicos de los orujos de uva roja de diferentes variedades provenientes de distintos viñedos del estado de Querétaro.

-Determinar el efecto de los orujos de uva roja con diferente composición de compuestos fenólicos sobre la prevención de la resistencia a la insulina en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa.

- Evaluar el efecto de los orujos de uva sobre el control de factores de riesgo asociados al desarrollo de la resistencia a insulina en los animales en estudio.

-Integrar mediante un análisis de componentes principales los compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles con el control de la resistencia a insulina.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Materiales**

#### **5.1.1. Animales**

Ratas Wistar macho de seis semanas de edad (40 animales), con peso de 160-180 g, se obtuvieron del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las ratas se alojaron dentro del bioterio de la Facultad de Química en jaulas individuales de 258 cm<sup>2</sup> de acero inoxidable, las cuales permiten la entrada de aire y luz, además de contar con un clip a prueba de escape. De igual manera, los animales se mantuvieron bajo condiciones ambientales estándar (ciclo de luz/oscuridad de 12 h, condiciones de humedad del  $55 \pm 15\%$  y temperatura  $25 \pm 2$  °C) durante una semana de adaptación. Durante esta semana las ratas se alimentaron con dieta estándar comercial (Rodent Lab Chow 5001) y agua *ad libitum*. El grado de molestia causado en los animales fue de categoría C. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las Regulaciones Federales para la Experimentación y Cuidado de Animales (SAGARPA, NOM-062-ZOO-1999 México) y al Comité de Bioética de la Facultad de Química (UAQ) (Número de dictamen CBQ21/049)

#### **5.1.2. Material vegetal**

Se utilizaron orujos de tres variedades de uva: Malbec, Syrah y Garnacha, provenientes de diferentes viñedos de la región de Querétaro (La Redonda, Azteca y el Marqués, respectivamente), recolectados en 2018. El material se secó a 45 °C, en un horno de convección por 5 horas, posteriormente se molió y tamizó, empleando un tamiz del número 40. Estos materiales fueron seleccionados con base a un estudio previamente realizado con 12 subproductos de orujo recolectados en diferentes viñedos (Copado, 2020).

### **5.2. Métodos**

#### **5.2.1. Extracción de polifenoles extraíbles**

Se pesaron 0.5 g de la muestra de orujo de uva y se mezclaron con 20 mL de una mezcla metanol/agua (1:1, v:v, pH 2), se agitó durante 1 h a temperatura

ambiente. Se centrifugó por 10 min a 1500 g. El sobrenadante se recolectó y se colocó en un matraz aforado de 50 mL.

Al residuo de la centrifugación se añadió 20 mL de una mezcla acetona/agua (7:3, v:v), se agitó por 1 h a temperatura ambiente. Se recolectó el sobrenadante y se combinó con el sobrenadante anterior. Se aforó el matraz con los dos sobrenadantes en una proporción 1:1 (v:v). Este extracto se utilizó para la determinación de compuestos fenólicos totales, antocianinas y flavonoides totales. El extracto se almacenó a -20 °C. El residuo se recuperó y se secó a 45 °C para la cuantificación de polifenoles no extraíbles (Jiménez-Escrig *et al.*, 2001).

#### **5.2.1.1. Cuantificación de compuestos fenólicos totales extraíbles**

La determinación de compuestos fenólicos totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Se colocaron 40 µL de agua destilada en una placa y a continuación se añadieron 10 µL del extracto fenólico, el cual se diluyó en una proporción 1:4 (v:v), seguido de 25 µL del reactivo Folin-Ciocalteu. La mezcla reposó por 30 min en la obscuridad y se añadieron 125 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%). Se agitó la placa a temperatura ambiente por 30 min y se leyó su absorbancia a 765 nm (equipo).

La cuantificación se realizó con una curva de calibración utilizando un estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de muestra (Singleton *et al.*, 1999).

#### **5.2.1.2. Cuantificación de antocianinas monoméricas extraíbles**

La determinación de antocianinas monoméricas se realizó con el método de pH diferencial. Se añadieron 175 µL de solución amortiguadora (KCl, 0.025N a pH 1.0 y CH<sub>3</sub>COO Na<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O, 0.4 M a pH 4.5) y 50 µL del extracto de compuestos fenólicos en un pozo de una placa. En un diferente pozo se adicionaron 175 µL de solución amortiguadora de acetato de sodio (0.4 M, pH 4.5) y 50 µL del extracto de compuestos fenólicos. Se leyeron las absorbancias de ambos pozos a 510 nm y 700 nm.

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

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

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

Donde:

Abs: Absorbancia

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

FD: Factor de dilución (4.5)

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

d: longitud de recorrido óptico (0.7 cm)

### 5.2.1.3. Cuantificación de flavonoides totales extraíbles

La determinación de flavonoides totales se realizó a partir de la cuantificación de quelatos con AlCl<sub>3</sub> y los flavonoides orto-, meta- y para-hidroxilados. Se añadieron 116  $\mu$ L de agua destilada, en seguida de 9  $\mu$ L del extracto de compuestos fenólicos y 7.5  $\mu$ L de NaNO<sub>2</sub> (5%), se reposó por 6 min y se añadieron 15  $\mu$ L de AlCl<sub>3</sub> (10%); después de 5 min de reposo se añadieron 50  $\mu$ L de NaOH (1 N) y 52.5  $\mu$ L de agua destilada. La absorbancia se leyó a 510 nm en un lector de placa Marca Thermo Scientific, Multiscan GO.

La cuantificación se llevó a cabo con 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).

#### **5.2.1.4. Cuantificación de proantocianidinas extraíbles**

La cuantificación de proantocianidinas extraíbles se realizó hidrolizando el extracto de compuestos fenólicos de la sección 5.2.1. Se tomaron 5 mL del extracto y se aforó a 10 mL con una solución butanol/HCl/FeCl<sub>3</sub> (95:5; v:v) y se colocó en un baño de agua a 100 °C por 1 h. Se tomaron 200 µL del extracto hidrolizado y se colocaron en un pozo de una placa. Se leyeron las absorbancias a 450 y 555 nm en un lector de placa Marca Thermo Scientific, Multiscan GO. Se utilizó la curva reportada por Zurita *et al.* (2012) y los resultados se expresaron como mg de proantocianidinas (PA)/g de muestra.

#### **5.2.2. Compuestos fenólicos no extraíbles**

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

Se tomaron 0.2 g del residuo del apartado 5.2.1. y se sometieron a hidrólisis, se añadieron 4 mL de una solución de butanol/HCl/FeCl<sub>3</sub> (95:5, v:v) y se sometieron a 100 °C por 1 h. Posteriormente se centrifugó a 3000 g por 10 min y se recuperó el sobrenadante. El residuo se lavó con 2 mL de la solución butanol/HCl/FeCl<sub>3</sub> con agitación y se centrifugó a 3000 g por 10 min. Se tomó el sobrenadante y se mezcló con el primer sobrenadante. EL residuo se lavó por 3 veces consecutivas. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron y se aforaron a 10 mL con la solución de butanol/HCl/FeCl<sub>3</sub>. En una placa se añadieron 190 µL de la solución butanol/HCl/FeCl<sub>3</sub> y 10 µL del extracto hidrolizado. Se leyeron las absorbancias a 450 y 555 nm (Pérez-Ramírez *et al.*, 2018). Se utilizó la curva reportada por Zurita *et al.* (2012) y los resultados se expresaron como mg de proantocianidinas (PA)/g de muestra.

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

Se mezcló 0.1 g del residuo del apartado 5.2.1. con 2 mL de metanol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (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. La cantidad de polifenoles hidrolizables se midió con el método Folin-Ciocalteu descrito en el apartado 5.2.2.1 (Singleton *et al.*, 1999).

### **5.2.2.3. Identificación de compuestos fenólicos extraíbles**

Se realizó un extracto fenólico de acuerdo a la metodología de la sección 5.2.1, y 1 mL de este extracto fue concentrado al vacío (Speedvac, Thermo Fisher Scientific) y resuspendido en 200  $\mu$ L de metanol y filtrado (0.45  $\mu$ m). La separación cromatográfica se llevó a cabo en un equipo de Cromatografía de Ultra resolución acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo con una fuente de ionización de electrospray, por sus siglas en inglés UPLC-QTOF MS ESI (Vion, Waters Co.). Se utilizó una columna BEH Acquity C<sub>18</sub> (2.1 x 100 mm, 1.7  $\mu$ m) a 35 °C. La fase móvil consistió de agua con 0.1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B) a un flujo de 0.5 mL/min. Las condiciones de los gradientes fueron las siguientes: 0% B a los 0 min, 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 incluyeron: adquisición de datos en modo de ionización negativo (ESI-), rango de masas de 100 a 1200 Da, voltaje del capilar de 2 kV, voltaje de cono de 40 eV, energía de colisión baja de 6 V y energía de colisión alta de 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. Con respecto al DAD, se realizó el monitoreo de las absorbancias a 214 nm (flavanoles), 280 nm (ácidos hidroxibenzoicos), 320 nm (ácidos hidroxicinámicos), 365 nm (flavonoles) y 520 nm (antocianinas) (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 por medio de curvas de calibración con ácido gálico (ácido hidroxibenzoico), (-)-epicatequina (flavanoles), naringenina (flavanonas), quercetina (flavonoles), y cloruro de cianidina (antocianina).

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

Se añadieron 10 g de muestra de orujo de uva a 90 mL de diluyente estéril a temperatura ambiente, se homogenizó por 2 min con un homogenizador automatizado (Stomacher) hasta que se obtuvo una suspensión completa y homogénea; se dejó sedimentar y se separó la cantidad deseada de la suspensión.

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

La determinación se realizó como se indica en la NOM-110-SSA1-1994; se prepararon diluciones 1:10. Se colocaron 1 mL de la dilución en una placa Petri en un volumen de 15 a 20 mL de agar triptona y se mezcló. Se incubaron las cajas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  durante 24 a 48 h, se seleccionaron placas que contengan entre 25 a 250 colonias y se reportó de acuerdo con la NOM-092-SSA1-1994.

Las placas se contaron después de 3, 4 y 5 días; a los 5 días se seleccionaron las que tenían entre 10 y 150 colonias; el conteo se realizó de acuerdo con la NOM-111-SSA1-1994.

#### **5.2.3.2. Determinación de coliformes totales**

La determinación se realizó como se indica en la NOM-210-SSA1-2014; se hicieron diluciones 1:10 en tubos con caldo lauril triptosa. Se realizaron al menos 3 diluciones consecutivas por cada dilución; se homogenizó de 15 a 20 min. Los tubos se incubaron a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  durante 24 h y se observó si existe la formación de gas; si no existiera gas, se dejó incubar otras 24 h. Se realizó un cálculo de la concentración de coliformes en base al número de tubos positivos en cada dilución utilizando las distintas tablas contenidas en la norma.

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



La determinación se realizó como se indica en la NOM-110-SSA1-1994; se hicieron diluciones 1:10 en el diluyente hasta obtener la densidad de microorganismos esperados. Se colocó 1 mL de la dilución primaria en una placa Petri en un volumen de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado y se mezcló cuidadosamente en movimientos de derecha a izquierda. Se incubaron las cajas a 25 °C ± 1 durante 24 h, las placas 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. El conteo se realizó de acuerdo con la NOM-111-SSA1-1994

#### **5.2.4. Evaluación de los orujos de uva sobre el control de la resistencia a insulina *in vivo***

Las ratas se dividieron en 5 grupos (n = 8): (i) grupo control sano, alimentado con una dieta estándar (proteína 28.5 %, lípidos 13.4 % y carbohidratos 57.9 %) (Rodent Lab Chow 5001, Purina) (ii) grupo control obeso, (iii) grupo obeso tratado con orujo de uva variedad Syrah, (iv) grupo obeso tratado con orujo de uva variedad Garnacha y (v) grupo obeso tratado con orujo de uva variedad Malbec. Los grupos obesos fueron alimentados con una dieta hipercalórica (60 % dieta estándar, 20 % manteca de cerdo, 20 % fructosa, 1 % minerales y 0.03 % vitaminas). El orujo de uva se administró en el alimento en una concentración de 1 g/kg de peso de rata por día, con base a evidencias de ingestas habituales de compuestos fenólicos por distintas poblaciones (1.2 g de compuestos fenólicos por día). Este contenido de compuestos fenólicos se ajustaba semanalmente en función del peso corporal. La duración del experimento fue de 16 semanas, en las cuales se registró semanalmente el consumo de alimento y la ganancia de peso. Se llevó a cabo el lavado diario de los bebederos, comederos, pisos y charolas de recolección, además del lavado de jaulas cada tercer.

##### **5.2.4.1. Matanza**

La matanza se llevó a cabo después de 8 h de ayuno y mediante decapitación por guillotina. Se recolectaron muestras sangre, de tejido hepático y muscular, estas últimas fueron lavadas con solución salina y congeladas en

nitrógeno líquido. La sangre fue centrifugada a 4000 g durante 15 min para obtener el suero, el cual fue almacenado a -80 °C.

Las jeringas utilizadas se colocaron en un bote rojo de polipropileno especial para objetos punzocortantes con una leyenda que indique “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 garantiza 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 °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.

#### **5.2.4.2. Evaluación del metabolismo de carbohidratos**

##### **5.2.4.2.1 Curva de tolerancia oral a la glucosa**

Una semana antes del sacrificio, las ratas se mantuvieron en ayuno de 8 h. Se administró una solución de glucosa (50% p/v) en una dosis de 4 mL/kg. La glucosa en sangre se midió de la vena de la cola utilizando un glucómetro (Chek Active, Roche ®) a los 0, 30, 60, 90 y 120 min.

##### **5.2.4.2.2. Evaluación de la resistencia a la insulina**

Se cuantificó la concentración de glucosa en suero empleando un kit colorimétricos (Spinreact, España). Además, se midieron los niveles de insulina mediante un kit ELISA (EZRMI-13K, Merck Millipore). Se calculó el índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assesment for Insulin Resistance).

##### **5.2.4.2.3. Cuantificación de glucógeno hepático**

Se colocaron 200 mg de tejido hepático con 200 µL de KOH 30 % (m:v) en un tubo y se incubaron en baño María a 100 °C por 20 min. Se dejó enfriar la muestra, se añadió 1 mL de etanol y se colocó en baño de hielo hasta que se formó un precipitado. Se centrifugó a 1700 g por 10 min y se retiró el

sobrenadante. Al precipitado se le añadieron 200  $\mu\text{L}$  de KOH 15% n(m:v), se añadió 1 mL de etanol y se colocó en hielo. Una vez formado el precipitado, se centrifugó a 1600 g por 10 min y se desechó el sobrenadante. Al tubo con el precipitado se le colocó 2 mL de agua destilada, se agitó hasta que el precipitado se dispersó y se añadió 10 mL del reactivo de antrona (solución de antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico al 95%, v:v). Se preparó un blanco (2 mL de agua destilada con 10 mL de reactivo de antrona) y un patrón (2 mL de solución estándar de dextrosa y 10 mL de reactivo de antrona). Se colocaron los tubos en baño maría por 15 min. Posteriormente, se colocaron en agua fría, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  y se leyó la absorbancia a 620 nm. Para calcular la concentración de glucógeno se utilizó la relación de  $\text{Abs}_{620\text{nm}} \text{ Glucógeno} / \text{Abs}_{620\text{nm}} \text{ Glucosa}$ . Dicha relación de absorbancia se expresó como mg de glucógeno/g de tejido (rendimiento) empleando las siguientes formulas:

$$\% \text{ de glucógeno} = \text{Abs}_{620\text{nm}} \text{ Glucógeno} / \text{Abs}_{620\text{nm}} \text{ Glucosa} * 100$$

$$\text{Glucógeno puro (mg)} = \text{mg precipitado} * \% \text{ glucógeno} / 100 \text{ mg}$$

$$\text{Rendimiento} = \text{mg de glucógeno puro} / \text{g de hígado.}$$

### **5.2.4.3. Metabolismo de lípidos**

#### **5.2.4.3.1. Triglicéridos en suero**

Los niveles de triglicéridos en suero se determinaron utilizando un kit colorimétrico (Spin-react, S.A).

#### **5.2.4.3.2. Cuantificación de ácidos grasos libres en suero**

Se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de suero en un tubo eppendorf con 125  $\mu\text{L}$  de cloroformo y 150  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.5. Se agitó en un vortex por 90 s y se dejó el tubo hasta la separación de las fases. Se tomó la fase de cloroformo (inferior) y se le adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de Cu-TEA (solución de trietanolamina 1 M, ácido acético 1 N y nitrato de cobre II 6.45%, 9:1:10). Se agitó con vortex y se separó la fase superior. A la fase de cloroformo se le adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de dietilditio carbomato de sodio 0.1 % (m:v) y se leyó a 400 nm. La

cuantificación se llevó a cabo utilizando una curva de calibración de ácido palmítico de 0-11.5 mM/L.

#### **5.2.4.3.3. Peroxidación lipídica**

Se prepararon homogenizados de hígado y músculo utilizando 1.2 mL una solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.4) con KCl (1.17 %, m:v) y 100 mg de tejido, después de homogenizar los tejidos se centrifugó a 800 g por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 10, 500 g por 20 min, recuperando el sobrenadante.

Para la determinación de la peroxidación lipídica por el método de TBARS, se mezclaron 2,5 mL de homogenados de tejido con 0.3 mL de HCl 5 N y 0.625 mL de ácido tricloroacético al 40 % (v:v). Se agregaron 0.625 mL de ácido tiobarbitúrico al 2 % (m:v) a cada muestra y se incubó a 90 °C durante 20 min. Después de esta incubación, las muestras se colocaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 30,000 g por 5 min. Se leyó la absorbancia de los sobrenadantes a 532 nm. La peroxidación lipídica se expresó como nmol equivalentes de TBARS/mg de tejido, utilizando un coeficiente de extinción molar  $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Wright *et al.*, 1981).

#### **5.2.4.3.4. Oxidación de proteínas**

Se prepararon homogenizados de hígado utilizando 10 mL una solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7) y 2-mercaptoetanol 1 mM y 1 g de tejido, y se homogenizó.

Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del extracto proteico y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 20% a 4 °C durante 5 min. Se centrifugó a 5000 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se le añadió 200  $\mu\text{L}$  de 2,4 DNPH 10 mM en HCl 2 M se incubó durante 30 min, se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de ATC 50% y se centrifugó a 500 g 10 min. Se lavó el precipitado 3 veces con 500  $\mu\text{L}$  de una mezcla etanol/acetato de etilo (1:1); se centrifugó a 500 g por 4 min entre cada lavado desechando el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en una solución de guanidina 6 M y se incubó a 37 °C por 15 min. Se leyó del

sobrenadante a 270 nm. Se utilizó como blanco HCL 2 M. Se calculó la diferencia de absorbancia entre la muestra y el blanco y se empleó un coeficiente de extención molar de  $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Los valores se expresaron como nmol/mg tejido.

### **5.3. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. La comparación de todos los tratamientos se realizó con un análisis de comparación de medias aplicando la prueba de Tukey. Estos análisis se realizaron utilizando el software de análisis de datos JMP, versión 8.0 (SAS, USA). La asociación de los efectos beneficiosos del orujo de uva con su perfil de compuestos bioactivos se realizaron análisis de componentes principales (PCA) utilizando el software estadístico R 3.4.3. Para la integración del heatmap, se empleo este mismo programa.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **6.2. Composición fitoquímica de los orujos de tres variedades de uva**

En la Figura 2 se muestran los resultados del contenido de los compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles de las tres variedades en estudio. Los orujos de Malbec y Garnacha fueron los que presentaron el mayor contenido de compuestos fenólicos extraíbles ( $49.42 \pm 1.64$  mg/g,  $52.07 \pm 1.42$  mg/g, respectivamente) y flavonoides extraíbles ( $48.78 \pm 1.86$  mg/g y  $51.27 \pm 2.24$  mg/g, respectivamente), comparados con los contenidos en Syrah ( $16.20 \pm 0.42$  mg/g de compuestos fenólicos extraíbles y  $10.98 \pm 0.47$  mg/g de flavonoides). Malbec fue el orujo con mayor concentración de antocianinas ( $2.94 \pm 0.07$  mg/g) y proantocianidinas extraíbles ( $7.33 \pm 1.30$  mg/g). Esto demuestra que el orujo de Malbec tiene la mayor concentración de todos los polifenoles extraíbles, seguido del orujo de Garnacha. Por el contrario, el orujo de Syrah tiene una baja cantidad de estos compuestos, pero tiene el mayor contenido de proantocianidinas no extraíbles ( $86.11 \pm 3.92$  mg/g) y polifenoles hidrolizables ( $24.90 \pm 0.98$  mg/g) comparado con los orujos de Malbec y Garnacha, siendo el material con mayor contenido de polifenoles no extraíbles. Malbec fue el orujo de uva con concentraciones similares de ambos polifenoles; extraíbles y no extraíbles y, finalmente, el orujo de Garnacha es el material con mayores concentraciones de polifenoles extraíbles y bajo contenido de polifenoles no extraíbles (Figura 2).

Las concentraciones de compuestos fenólicos extraíbles encontrados en este estudio son similares a lo reportado por Copado-Romero (2020). En dicho estudio los compuestos fenólicos totales fueron de 16-52 mg GAE/g, flavonoides de 10-54 mg CE/g, antocianinas de 0.7-2.9 mg ME/g y proantocianidinas extraíbles de 1.8-5.6 mg PA/g. Por otro lado, respecto a los no extraíbles, el orujo de uva ha sido una de las fuentes más estudiadas (Pérez-Jiménez, 2013). En esta clasificación se encuentran las proantocianidinas no extraíbles, que son polímeros de flavan-3-oles, de alto peso molecular que se encuentran libres en la matriz o compuestos fenólicos de bajo peso molecular asociados a otros componentes de la matriz alimentaria, como fibra o proteínas, y en orujo de uva se ha reportado

concentraciones de 27-67 mg/g (Zurita *et al.*, 2012; Pérez-Jiménez *et al.*, 2009). Similares concentraciones fueron encontradas en nuestro estudio de 38-86 mg/g de NEPA.

Respecto a los polifenoles hidrolizables en orujo de uva se han reportado concentraciones de 26-35 mg/g de NEPC (Arranz *et al.*, 2010; Solari-Godiño *et al.*, 2017). En nuestro estudios se detectaron concentraciones en un rango de 19-24 mg/g; estos valores son menores comparados con los de Solari-Godiño *et al.* (2017). Estas diferencias podrían estar relacionadas al proceso de secado, ya que estos autores utilizaron liofilización (-84 °C) y secado por aire frío (18 °C); mientras que, en nuestro estudio la temperatura utilizada fue de 45 °C. Adicionalmente, esta diferencia podría estar relacionada a las condiciones climáticas durante el cultivo de uva o al proceso para la elaboración de vino (Yu & Ahmedna, 2013).

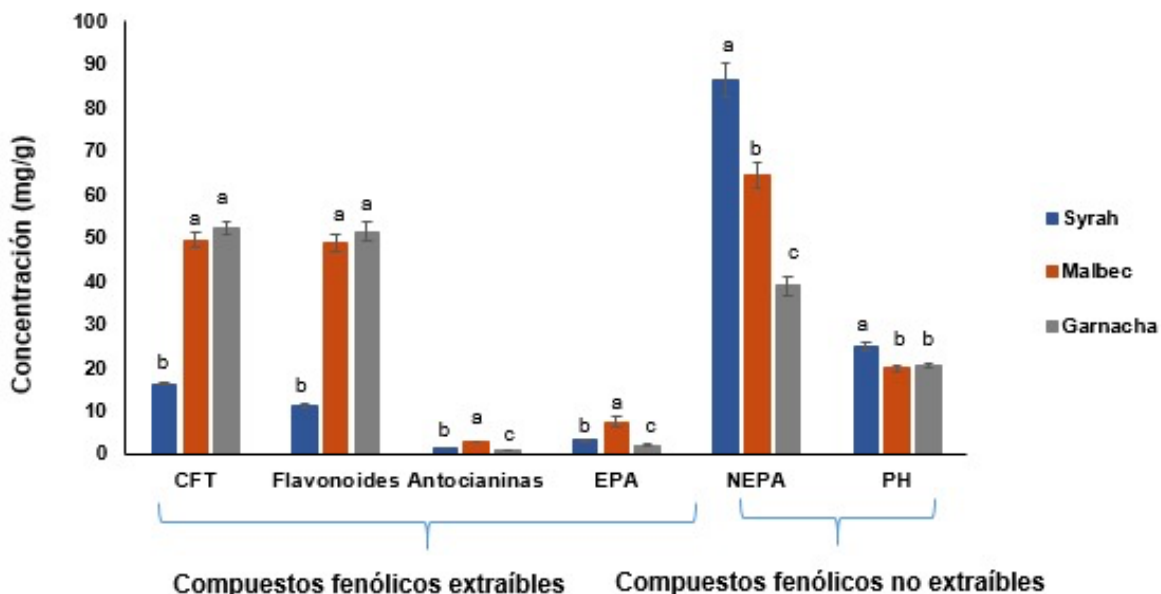


Figura 2. Concentración de compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles en tres variedades de orujo de uva. Resultados expresados en media  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ . CFT: Compuestos fenólicos extraíbles; EPA: Proantocianidinas extraíbles; NEPA: Proantocianidinas no extraíbles; PH: Polifenoles hidrolizables. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Concentración de CFT y PH en mg de equivalentes de ácido gálico/g; flavonoides en mg equivalentes de catequina/g; antocianinas en equivalentes de malvidina/g; proantocianidinas extraíbles y no extraíbles en mg equivalentes de proantocianidinas/g

Estos rangos tan amplios de los compuestos fenólicos detectados en los orujos se debe a diferentes factores como la variedad, las condiciones de cultivo, grado de madurez del fruto y el proceso de vinificación, entre otros (Averilla *et al.*, 2019; Gerardi *et al.*, 2021).

### 6.3. Perfil fitoquímico de los orujos de tres variedades de uva

En los orujos de uva se cuantificaron diversos compuestos fenólicos individuales y la Figura 3a muestra el contenido de flavanoles. Los orujos de Malbec, Garnacha y Syrah presentaron mayoritariamente (+)-catequina (308, 262 y 14  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente) y (-)-epicatequina (203, 221 y 36  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente). Se puede observar que los orujos de Malbec y Garnacha tienen concentraciones muy similares de flavanoles totales (531 y 513  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente).



Respecto a los flavonoles, los orujos de Malbec y Garnacha fueron los que presentaron una mayor concentración de quercetina hexósido (585 y 162  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente) e (Iso)-rhamnetina hexósido (1280 y 406  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente). El orujo de Syrah tiene un mayor contenido de quercetina (149  $\mu\text{g/g}$ ), seguido de (Iso)-rhamnetina hexósido (78  $\mu\text{g/g}$ ) (Figura 3b).

(a)

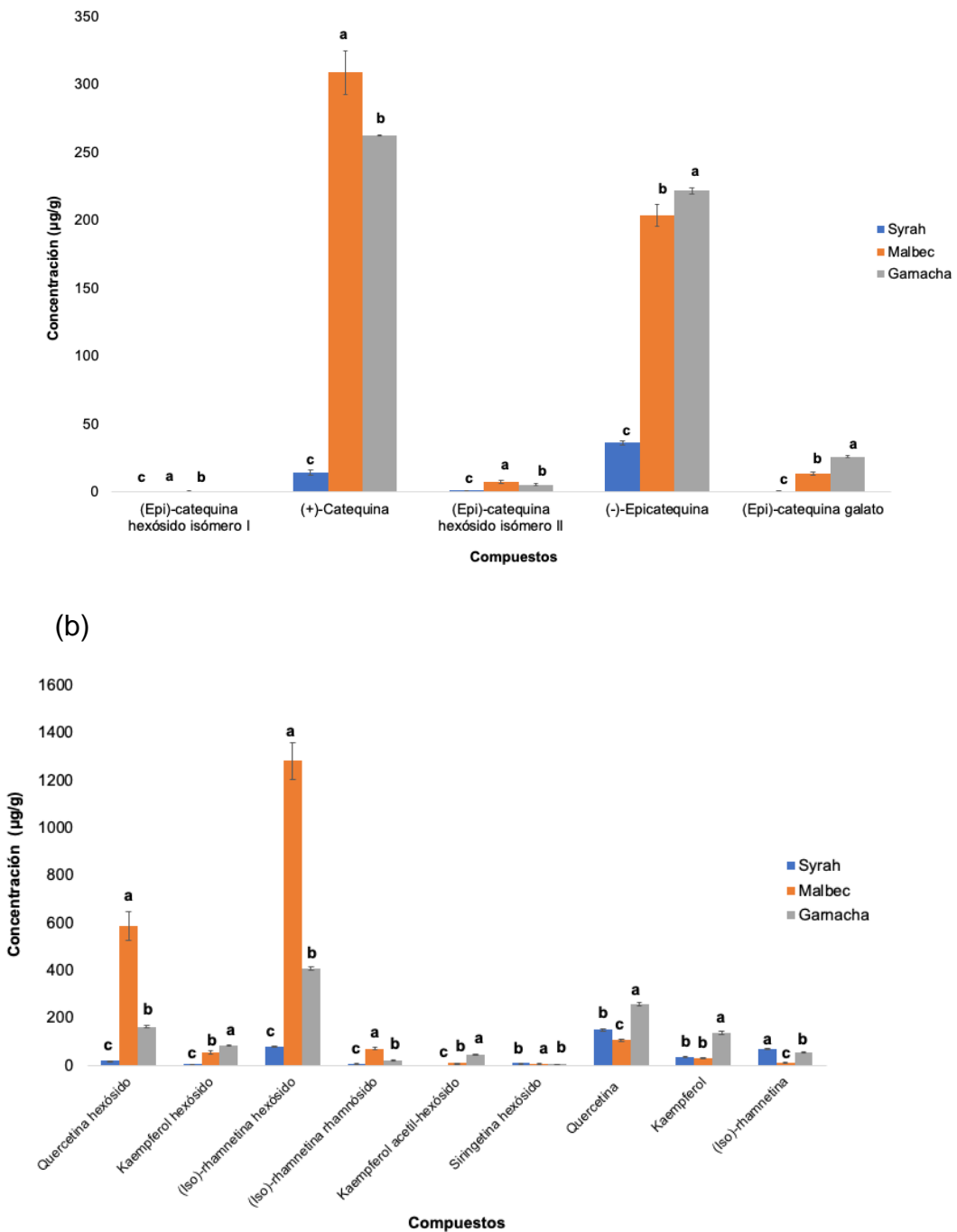


Figura 3. Contenido de flavanoles (a) y flavonoles (b) en orujo de tres variedades de uva. Resultados expresados en media  $\pm$  desviación estándar, n= 3. Letras diferentes para cada compuesto indican diferencia estadística significativa utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Las procianidinas fueron abundantes en los orujos de Malbec y Garnacha, predominando la procianidina dímero B (EC-EC) isómero II (106 y 150  $\mu\text{g/g}$ , repectivamente) y la procianidina dímero B (EC-EC) isómero I (95 y 132  $\mu\text{g/g}$ , repectivamente). El total de procianidinas es estos orujos fue de 313  $\mu\text{g/g}$  para Malbec y 402  $\mu\text{g/g}$  para Garnacha; mientras que, el orujo de Syrah presentó cantidades poco significativas (5.23  $\mu\text{g/g}$ ) (Figura 4a).

Finalmente, respecto a los contenido de antocianinas, el orujo de Malbec presentó una mayor cantidad de estos compuestos, principalmente malvidina cumaril-hexósido con 6020  $\mu\text{g/g}$ ; esta misma antocianina fue mayoritaria para el orujo de Syrah con 1710  $\mu\text{g/g}$ . La malvidina hexósido fue el segundo compuesto mayoritario en los orujos de Malbec y Syrah (683 y 4545  $\mu\text{g/g}$ ) y el más abundante para el orujo de Garnacha (2200  $\mu\text{g/g}$ ) (Figura 4b).

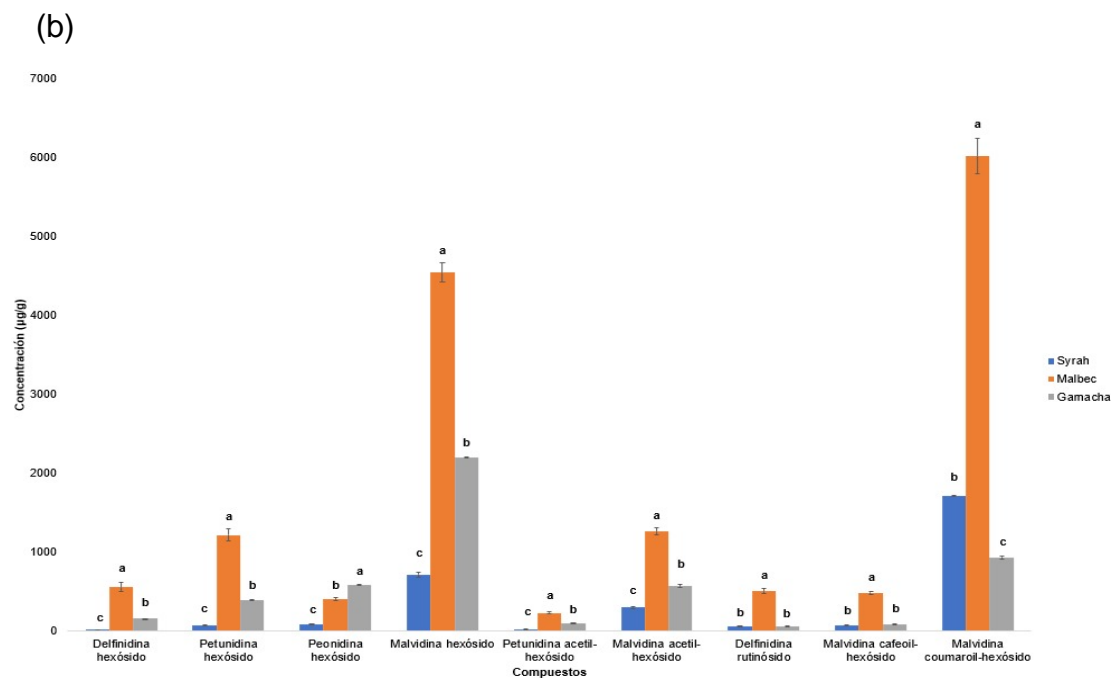
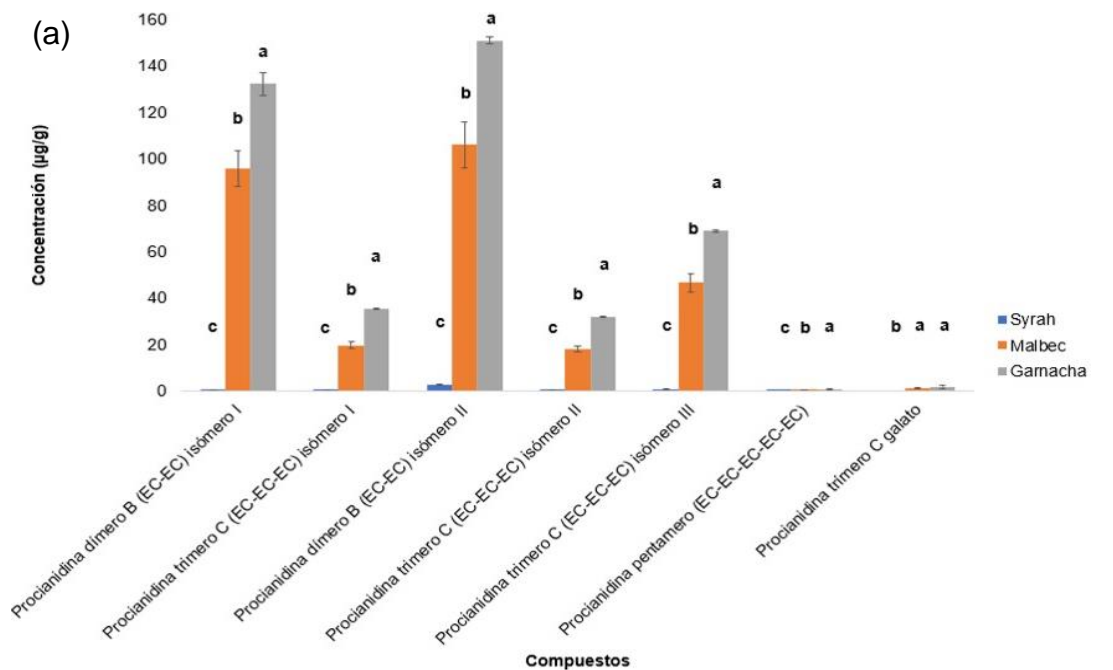


Figura 4. Contenido de proantocianidinas (a) y antocianinas (b) en orujo de tres variedades de uva. Resultados expresados en media  $\pm$  desviación estándar,  $n = 3$ . Letras diferentes para cada compuesto indican diferencia estadística significativa utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

En la Figura 5 se muestra un mapa de calor del perfil fitoquímico de compuestos fenólicos extraíbles de las tres variedades de orujo de uva. Este gráfico es una representación analítica que permite visualizar las concentraciones de compuestos con fines comparativos. Con esto se confirma que las variedades que presenta un mayor contenido de estos compuestos son Garnacha y Malbec, mientras que Syrah tiene una menor concentración. Las tres variedades tienen una composición fitoquímica de extraíbles contrastante; el orujo de Malbec presentó las mayores concentraciones de catequina, (epi)-catequinas y malvidinas. el orujo de Garnacha es abundante en quercetina, kaempferol y procianidinas y, finalmente, el orujo de Syrah fue abundante en (iso)-ramnetina, peonidina dihexósido, siringetina hexósido y malvidina dihexósido.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportado por Xia *et al.* (2010), quienes describen la distribución y presencia de ciertos compuestos fitoquímicos, como el ácido gálico, catequina, epicatequina y procianidinas diméricas. Mientras que, Kammerer *et al.* (2004), reportaron que los compuestos extraíbles más abundantes en orujo son la malvidina 3-O-glucosa, peonidina 3-O-glucosa, malvidina 3-O-p-coumaril glucosa, catequina, epicatequina, procianidina B1, quercetina 3-O-glucósido y quercetina 3-O-glucurónidos. ácido caftárico, ácido coutárico, ácido fertárico, ácido gálico, ácido procatecuico y trans-resveratrol. En nuestro estudio, los ácido fenólicos y los estilbenos no fueron identificados.

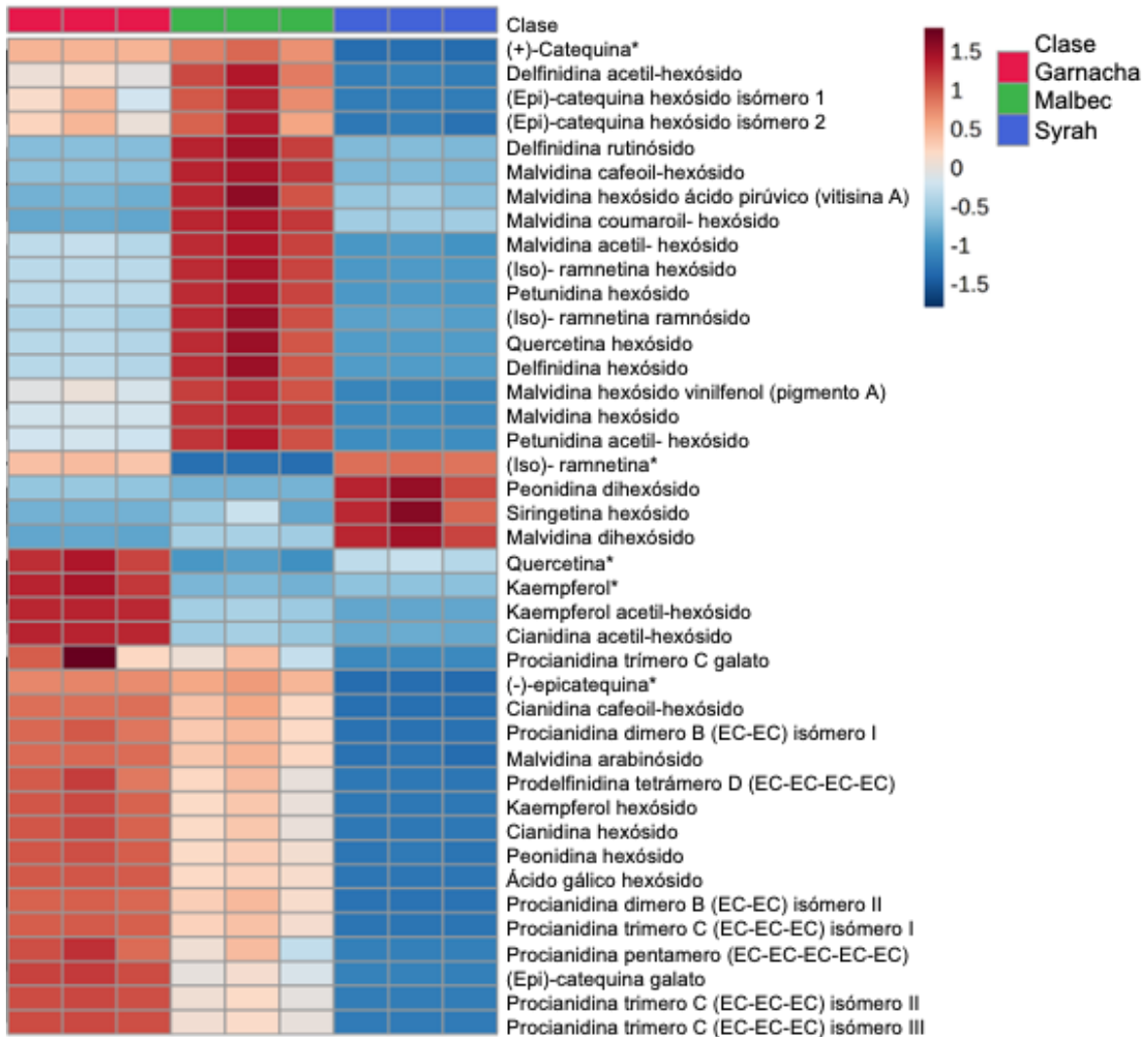


Figura 5. Mapa de calor o heatmap del perfil fitoquímico de los orujos de las variedades Malbec, Garnacha y Syrah. El gráfico fue elaborado utilizando el promedio de la concentración de los compuestos fenólicos.

#### 6.4. Composición microbiológica de las tres variedades de orujo de uva

En el Cuadro 5 se muestran los resultados del estudio microbiológico para los orujos de las tres variedades de uva. Debido a que no existe una normativa mexicana que regule la calidad microbiana que debe presentar los residuos agroindustriales, se tomó como referencia la norma NOM-247-SSA1-2008, la cual regula los cereales, sémolas y harinas para consumo. Se observa en los resultados que los orujos de las tres variedades de uva en estudio presentan una

calidad microbiológica aceptable; estos valores se encuentran abajo del límite permisible y son aptas para el consumo.

Cuadro 5. Análisis microbiológico de los orujos de las tres variedades

<b>Variedad</b>	<b>Coliformes totales (UFC/g)</b>	<b>Mesófilos aerobios (UFC/g)</b>	<b>Hongos (UFC/g)</b>	<b>Levaduras (UFC/g)</b>
Malbec	40	559	37	147
Garnacha	78	303	35	50
Syrah	80	662	123	13
<b>Límites permisibles</b>				
	100 UFC/g	10,000 UFC/g	300 UFC/g	300 UFC/g

UCF. Unidades Formadoras de Colonias

## **6.5. Evaluación del efecto del consumo de tres variedades de orujo de uva en animales alimentados con dietas hipercalóricas**

### **6.4.1. Metabolismo de carbohidratos**

#### **6.5.4.3. Concentración de glucosa, insulina e índice HOMA-IR**

En el Cuadro 6 se muestran los niveles de glucosa e insulina basal, así como el índice HOMA-IR de los animales tratados con los orujos de las tres variedades de uva. Se observa que estos parámetros incrementaron 1.6, 3.2 y 5.2 veces, respectivamente, en el grupo DAGF comparado con los parámetro del grupo sano ( $p < 0.05$ ).

Para el caso de los animales tratados con los orujos de las tres variedades de uva se observó una disminución de estos valores de 0.3-0.4 veces para el caso de glucosa; mientras que, para el caso de insulina fue de 0.7-1.7, y el valor de HOMA fue de 1.7-2.7 comparados con los valores del grupo DAGF, siendo los valores de HOMA-IR estadísticamente menores al del grupo DAGF ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 6. Cuantificación de glucosa, insulina y HOMA de animales tratados con orujo de uva de diferentes variedades y alimentados con una dieta hipercalórica

	<b>Sanos</b>	<b>DAGF</b>	<b>DAGF + Malbec</b>	<b>DAGF + Garnacha</b>	<b>DAGF + Syrah</b>
Glucosa (mg/dL)	113.2 ± 41.4a	182.6 ± 61.9b	130.7 ± 17.7ab	144.0 ± 10.1ab	136.9 ± 11.7ab
Insulina (ng/mL)	4.0 ± 1.6b	13.7 ± 1.2a	8.1 ± 2.4ab	7.8 ± 3.2ab	5.1 ± 1.3ab
HOMA-IR	3.9 ± 1.5b	24.3 ± 6.2a	9.1 ± 3.1b	7.9 ± 3.2b	6.2 ± 1.4b

Resultados expresados en media ± desviación estándar, n=3. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). HOMA-IR. Índice de resistencia a insulina. DAGF. Dieta alta en grasa y fructosa.

Un estado de resistencia a la insulina define como la incapacidad de algunos tejidos para responder a los niveles normales de insulina y para mantener las funciones normales de esta hormona, se requieren altas concentraciones de esta (Petersen & Shulman, 2006; Lee *et al.*, 2022). En los animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa se observó un aumento de los niveles de glucosa e insulina comparado con los animales sanos. Por lo tanto, a pesar de las elevadas concentraciones de esta hormona no se regulan, en su totalidad, la producción de glucosa por el hígado o el transporte de este carbohidrato en tejido adiposo o muscular.

Los tratamientos con los orujos de diferentes variedades de uva, independientemente de su contenido contrastante de compuestos fenólicos, disminuyeron la resistencia a insulina. Estos resultados no son acordes a lo reportado por Rodríguez-Lanzi *et al.* (2016), quienes alimentaron a ratas con una dieta alta en grasa y fructosa y suplementada con orujo de uva de la variedad Malbec (1 g/kg), y reportaron que no hubo efecto sobre el control de la resistencia a insulina. Estas condiciones fueron muy similares a nuestro estudio y en la caracterización de compuestos fenólicos extraíbles que estos autores presentan, su contenido de -catequina y (-)-epicatequina fue hasta dos veces mayor que el encontrado en las variedades de orujo de nuestro estudio y a pesar de esto, no se observó un efecto en la prevención de la resistencia a insulina.



Otros autores han reportado que la regulación de la resistencia a insulina inducida por orujo está relacionada a las antocianinas como las petunidinas y malvidinas (da Costa *et al.*, 2017), el ácido gálico (Costabile *et al.*, 2019) y las proantocianidinas (Yogalakshmi *et al.*, 2013). Respecto a nuestros resultados, Malbec fue la variedad con un mayor contenido de petunidinas y malvidinas, y Garnacha y Malbec con la mayor concentración de proantocianidinas, siendo Syrah, la variedad de orujo con niveles muy bajos de estos compuestos y a pesar de esto, la prevención de la resistencia a insulina fue similar para estas tres variedades, por lo tanto, otros compuestos asociados a los no extraíbles podrían estar relacionados con estos beneficios.

#### **6.5.4.4. Curva de tolerancia oral a la glucosa**

En la Figura 6 se muestran las curvas de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de los animales tratados con los orujos de las tres variedades de uva. Se puede observar que, para todos los tiempos de muestreo, existe una diferencia estadística significativa entre el grupo sano y DAGF. Para el caso de los tratamientos no se observa una diferencia estadística significativa entre ellos y estos fueron similares al grupo sano ( $p < 0.05$ ).

La tolerancia oral a la glucosa (CTG) refleja la eficiencia con la que el cuerpo metaboliza la glucosa después de una carga oral de glucosa. La CTG se considera un método para evaluar la aparente sensibilidad a la insulina y la resistencia a la insulina de un individuo (Stumvoll *et al.*, 2000). En nuestro estudio, los animales obesos presentaron una intolerancia a la glucosa; lo que confirma, la resistencia a insulina previamente discutida. Mientras que los orujos de las tres variedades regularon los niveles de glucosa en la la curva de tolerancia.

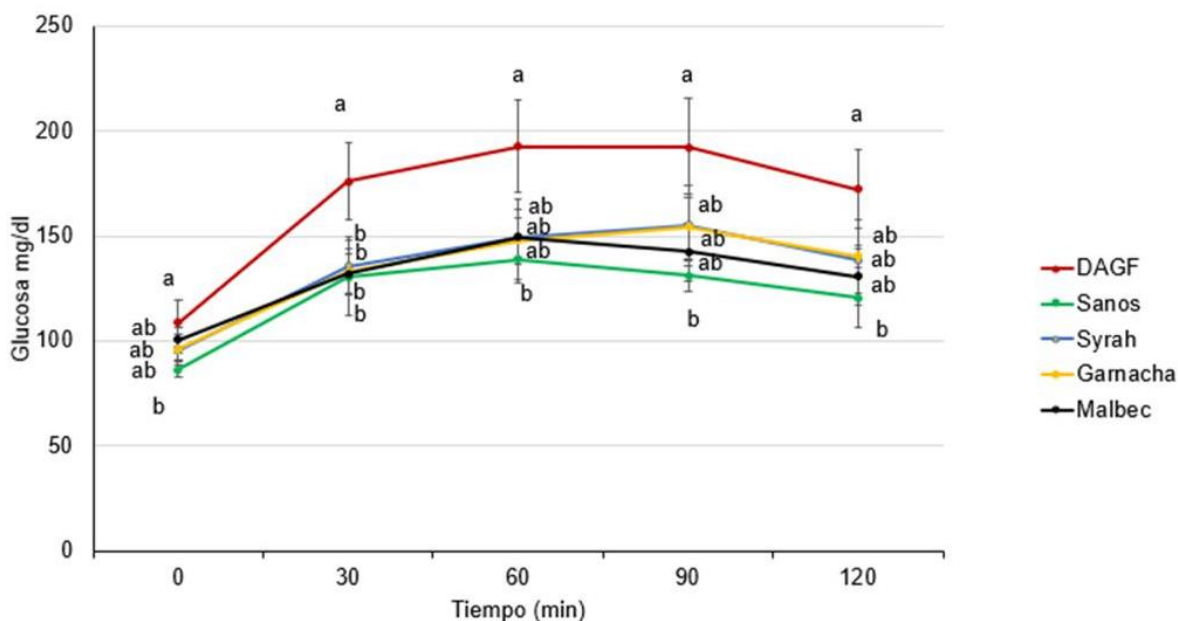


Figura 6. Curva de tolerancia a la glucosa de animales alimentados con una dieta hipercalórica y suplementada con orujos de diferentes variedades de uva. Resultados expresados en media  $\pm$  desviación estándar, n = 8. Letras diferentes indican diferencias significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para cada tiempo. DAGF. Dieta alta en grasa y fructosa.

Un estudio realizado con humanos con al menos dos factores de riesgo cardiovascular, se les administró 8 g de orujo al día de la variedad tempranillo durante 6 semanas, este contenía 29.6% de compuestos fenólicos, con un 23.4% de NEPP. Se reportó una disminución importante en la concentración de los niveles de insulina y en el índice HOMA, así como una regulación posprandial de la sensibilidad a insulina, estos autores sugieren que el efecto podría estar relacionado a los productos derivados del metabolismo microbiano de los polifenoles (Martínez-Maqueda *et al.*, 2018). La relación del contenido de NEPP y EPP del orujo del trabajo previamente citado (79% NEPPs y 21% EPPs), es similar al orujo de Syrah evaluado en nuestro estudio, en cual contiene 85 % de NEPPs y 15 % EPPs.

#### 6.5.4.5. Contenido de glucógeno hepático

Debido a que se ha propuesto que el orujo induce una mejora del metabolismo de glucosa en hígado, se evaluó el contenido de glucógeno en

hígado, ya que es el carbohidrato de almacén en este órgano. En la Figura 7 se muestra el contenido de glucógeno hepático en los animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa y tratados con los orujos de las tres variedades de uva. Se observa que el grupo DAGF presenta un aumento significativo en el contenido de 4.2 veces ( $p < 0.05$ ), comparado con el del control sano. Por el contrario, se observa que el contenido de glucógeno hepático en los grupos tratados con los orujos de las tres variedades de uva es estadísticamente similar al del control sano, sin presentar diferencia estadística entre ellos.

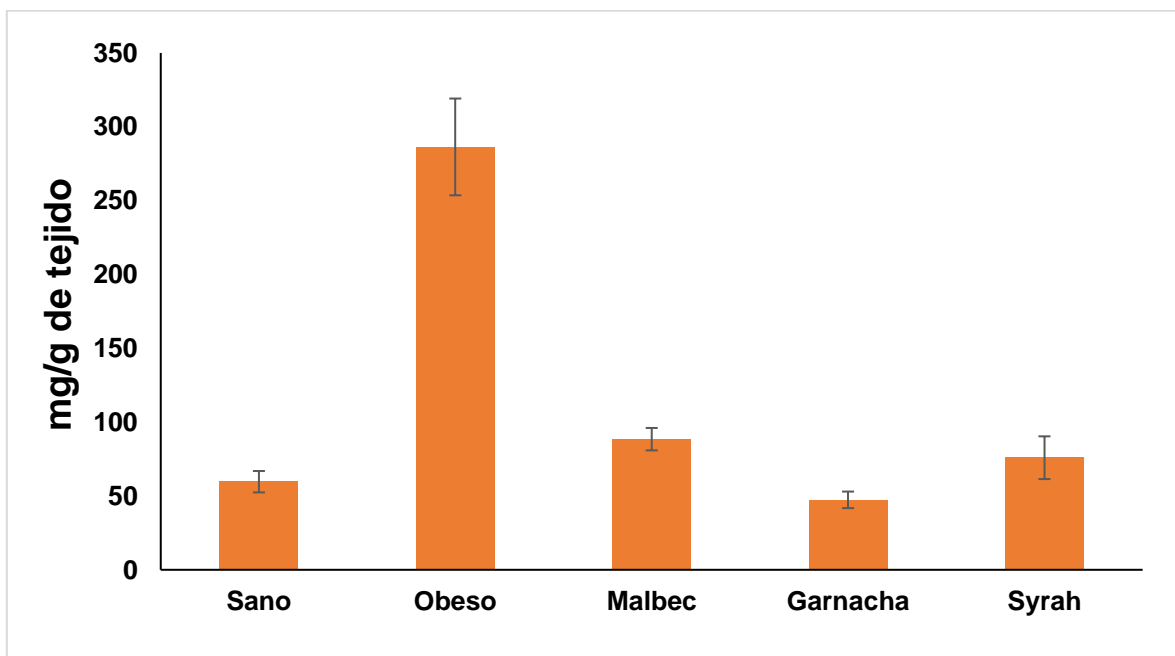


Figura 7. Contenido de glucógeno hepático de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica suplementada con orujo de diferentes variedades de uva. Resultados expresados en media  $\pm$  desviación estándar,  $n=8$ . Letras diferentes muestran diferencias significativas por prueba de Tukey ( $p<0.05$ ).

Las principales enzimas responsables de la síntesis de glucógeno son la quinasa de la glucógeno sintasa (GSK) y la glucógeno sintasa (GS). La síntesis de glucógeno es inducida por insulina la actividad de la GSK, la cual a su vez induce a la glucógeno sintasa. En un estado de resistencia a la insulina, la enzima no es activada; y, por lo tanto, no se sintetiza el glucógeno. Los resultados presentados en la Figura 7 muestran lo contrario, ya que se observa una mayor concentración de glucógeno en el grupo DAGF comparado con la del control sano y los grupos

tratados; esto podría explicarse por la activación de una vía alterna a la glucógeno sintasa. El hígado, al no ser dependiente de insulina para la absorción de glucosa, internaliza la glucosa del torrente sanguíneo, la cual, al saturar la vía glucolítica acumula glucosa 6 fosfato; exceso de metabolito puede activar la GS y conducir a la síntesis de glucógeno (von Wilamowitz-Moellendorff *et al.*, 2013; Santoleri *et al.*, 2019).

Adicionalmente, Lu *et al.* (2014) reportaron que ratones alimentados con una dieta alta en grasa desarrollaron resistencia a insulina y presentaron niveles elevados de glucógeno hepático. Estos autores detectaron un aumento en los niveles de expresión del mRNA para la proteína PTG (Proteína dirigida al glucógeno, Ppp1r3c). Esta proteína tiene un papel importante en la síntesis de glucógeno, ya que ratones OK para esta proteína muestran niveles de glucógeno notablemente reducidos en hígado. Por lo tanto, una dieta alta en grasas puede inducir la síntesis de glucógeno mediante vías alternas a la vía Akt/GS3K-mediada por insulina. Por lo que, nuestros resultados concuerdan con dicha activación, en la cual se proponen vías alternas de síntesis de glucógeno.

Cordero-Herrera *et al.* (2015) evaluaron un extracto de cocoa rico en compuestos fenólicos, principalmente (-)-epicatequina, adicionado a una dieta alta en grasa en animales diabéticos-obesos y encontraron que los animales diabéticos presentaron altas concentraciones de glucógeno hepático comparado con un grupo sano, el cual disminuyó con el extracto de cocoa. Adicionalmente, la concentración de GSK3 y GS no fue modificada pero las fosforilaciones de GSK3 disminuyeron y las fosforilaciones de GS aumentaron en el grupo obeso, lo que disminuiría la síntesis de glucógeno; sin embargo, ellos reportaron altos contenidos en ese grupo, lo que es acorde a lo anteriormente mencionado.

#### **6.5.5. Evaluación del metabolismo lipídico y niveles de oxidación hepática**

El metabolismo de lípidos está asociado al desarrollo de la resistencia a la insulina, debido a la acumulación de ácidos grasos libres en los tejidos hepático y muscular, los cuales disminuyen la señalización de la insulina (Savage *et al.*, 2007).

En el Cuadro 7 se muestra la concentración de triglicéridos y ácidos grasos libres en suero, así como la peroxidación lipídica y de proteínas expresada en los animales en estudio tratados con diferentes variedades de orujo de uva. Para el caso de los triglicéridos en suero se puede observar que los animales obesos incrementaron sus niveles 2.8 veces comparado con los animales sanos. Respecto a los animales tratados con el subproducto de uva, para la variedad Malbec se observaron menores niveles hasta de un 47 %, comparado con el grupo DAGF ( $p < 0.05$ ), Garnacha un 31 % y Syrah un 16 %.

Respecto a los ácidos grasos libres, el grupo alimentado con DAGF mostró una mayor concentración en un 21 % respecto al grupo sano ( $p < 0.05$ ). Los tratamientos con orujo presentaron una disminución en la concentración de dichos ácidos grasos en un 31, 24 y 33 % para Malbec, Syrah y Garnacha, respectivamente ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, para la peroxidación lipídica y oxidación de proteínas en tejido hepático, la concentración de TBARS en el grupo DAGF fue 2 veces más alta y la de proteínas 3.4 veces comparado con las del grupo sano ( $p < 0.05$ ). Todos los orujos disminuyeron estas oxidaciones comparado con el grupo DAGF y sus concentraciones fueron estadísticamente similar entre los tratamientos: lípidos (33-51 %) y proteínas (57-67 %).

Cuadro 7. Concentración de triglicéridos, ácidos grasos libres en suero, y niveles de oxidación hepática en animales alimentados con una dieta hipercalórica y

Tejido	Determinación	Sanos	DAGF	Malbec	Syrah	Garnacha
Suero	Triglicéridos	58 ± 6.9c	168 ± 30a	90 ± 23b	141 ± 29a	116 ± 21ab
Suero	Ácidos grasos libres	5.1±0.11b	6.2±0.2a	4.3±0.2bc	4.7±0.5bc	4.1±0.6bc
Hígado	Peroxidación de lípidos	1.2±0.06c	3.3±0.07a	2.2±0.19b	2.2±0.19b	1.6±0.11b
Hígado	Oxidación de proteínas	67.3 ± 4.0c	231.1 ± 16a	83.8 ± 8.3bc	76.2 ± 7.1bc	98.4 ± 12.3b

adicionada con orujos de uva de diferentes variedades

Resultados expresados en media ± desviación estándar, n=8. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Resultados de niveles de triglicéridos expresados como mg/dL, ácidos grasos libres como nmol/L, peroxidación lipídica como MDA/mg de tejido y oxidación de proteínas como nmol/mg tejido.

El orujo de Syrah mostró una menor capacidad para regular los niveles de triglicéridos en suero y este orujo se caracterizó por su alto contenido en NEPA y HPP. Por lo tanto, estos compuestos podrían no estar asociados con la regulación de los triglicéridos. Se ha propuesto que los compuestos fenólicos extraíbles del orujo están relacionados con la regulación de los triglicéridos. Por ejemplo, Adisakwattana *et al.* (2010) reportaron que la administración oral de extracto de semilla de uva redujo significativamente los triglicéridos séricos en ratas. El mecanismo propuesto fue una inhibición de la digestión y absorción de lípidos (inhibición de la lipasa pancreática y la esterasa del colesterol). Además, estos autores sugieren que uno de los principales compuestos en el extracto de semilla de uva son las procianidinas oligoméricas que, de acuerdo con la Figura 2, la variedad Malbec tuvo el mayor contenido total de estos compuestos y el grupo DAGF + Malbec presentó un menor contenido de triglicéridos séricos

Por otro lado, los ácidos grasos son precursores de diacilglicéridos (DAG), y éstos son precursores inmediatos de TAG. En un estudio en humanos y ratones se reportó que un alto contenido de DAGs induce la actividad de la enzima PKC $\theta$ , lo cual altera la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS), conduciendo a una inhibición del transporte glucosa estimulada por insulina en músculo. Aunado a esto, tanto en músculo como hígado, se ha observado constantemente la activación de isoformas de PKC (da Silva Rosa *et al.*, 2020). En nuestro estudio, la concentración de ácidos grasos libres presentó un incremento en el grupo DAGF ( $p < 0.05$ ) comparado con el control sano; lo cual puede estar asociado con el aumento de la resistencia a la insulina en el grupo DAGF.

Los animales tratados con orujo presentaron niveles de ácidos grasos libres similares entre todos los tratamientos y menor en un 25 % al control sano. Estos resultados son similares a los reportados por Van Hul *et al.* (2018) quienes administraron un extracto rico en antocianinas a ratones alimentados con una dieta alta en grasas y observaron una disminución del contenido de ácidos grasos no esterificados; los autores sugieren que este efecto está relacionado con una mejora a la resistencia a insulina.

Respecto a los procesos de oxidación en el hígado, el incremento de TBARS y residuos de carbonilo está relacionado a una mayor actividad metabólica. Iboyte *et al.* (2017) reportaron niveles de MDA en tejido hepático de ratas obesas con un cambio de 7.5 veces comparado con el control sano; mientras que, sus tratamientos con una dieta enriquecida con distintos compuestos fenólicos disminuyeron 6.5-7 veces comparado con su control obeso en tejido hepático. Estas diferencias se pueden atribuir a la alta concentración de compuestos fenólicos presentes en la dieta de estos autores. El alimento fue enriquecido con ácidos fenólicos, como el ácido caféico, ferúlico, gálico y protocatecuico; mientras que, en nuestro estudio los compuestos fenólicos se encuentran en la matriz del orujo, y la accesibilidad y biodisponibilidad podría ser menor, generando menor protección para la oxidación lipídica.

#### **6.5.6. Integración de los compuestos fenólicos del orujo de uva con componentes fisiológicos relacionados con la resistencia a insulina**

La Figura 8 muestra el análisis de componentes principales a partir de los resultados de HOMA-IR, concentración de glucosa, insulina, ácidos grasos libres y triglicéridos en sangre. El PCA analiza una matriz de datos que representa observaciones descritas por diferentes variables dependientes que, en general, están interrelacionadas. Su objetivo es obtener información importante a partir de los datos de la matriz y expresar esta información como un conjunto de nuevas variables llamadas componentes principales; asimismo, representa el patrón de similitud de las observaciones y las variables al mostrarlas como puntos en un mapa (Abid y Williams, 2010).

En la Figura 8 se observa que la varianza total explicada es del 97 % y la agrupación de DAGF y el control sano se ubican en cuartiles opuestos con respecto al componente 1; mientras que, los grupos tratados con los orujos tienden hacia los grupos sanos. Respecto a los parámetros relacionados con la dinámica fisiológica de la resistencia a insulina como las concentraciones en suero de glucosa, insulina, triglicéridos y ácidos grasos libres, fueron parámetros que caracterizaron al grupo alimentado con DAGF. Asimismo, los grupos tratados con

las variedades de orujo que se posicionaron hacia el control sano, confirma que dichos tratamientos mejoraron la resistencia a la insulina.

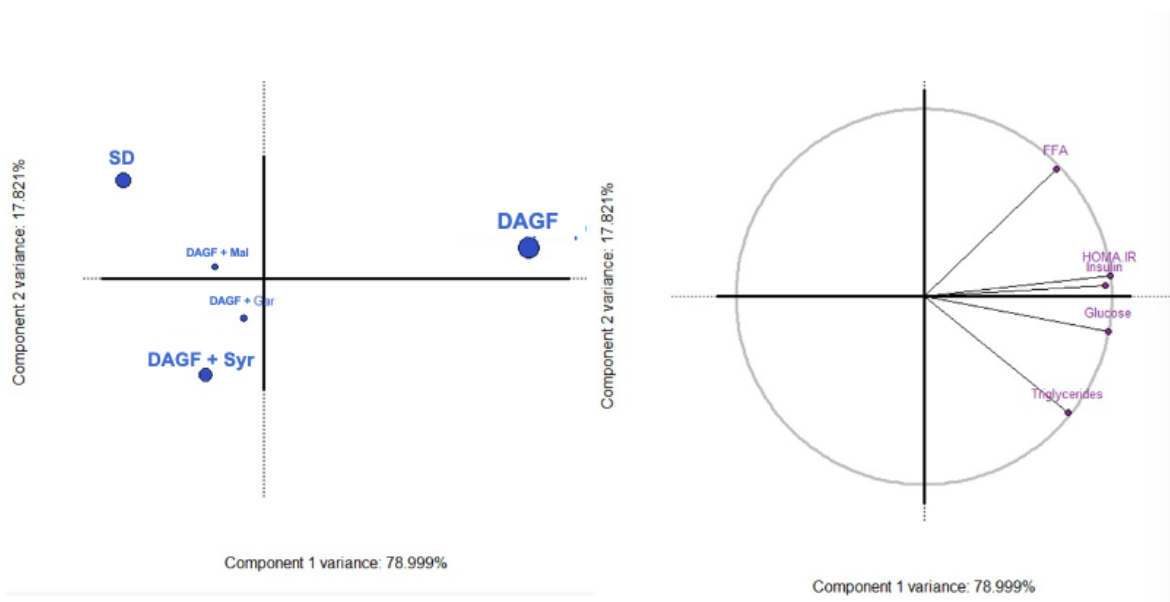


Figura 8. Análisis de componentes principales (PCA) del efecto de una dieta estándar, alta en grasa y fructuosa y adicionada con orujo de diferentes variedades de uva sobre la dinámica fisiológica del metabolismo de ratas asociado con la resistencia a insulina.

Por otra parte, la Figura 10 muestra el análisis de PCA a partir de parámetros relacionados con resistencia a la insulina, únicamente en animales con tratamiento. El componente 1 explica el 80 % de la varianza; en este sentido, se observa que el grupo DAGF + Malbec está altamente representado con la concentración de insulina, los ácidos grasos libres y el índice HOMA; lo que sugiere que de los tres orujos evaluados, a pesar de que todos regularon estos parámetros, el orujo de la variedad Malbec fue el que presentó la menor capacidad; por el contrario, el grupo DAGF + Syrah tiene una menor representación respecto a estos parámetros, pero se caracterizó por mayores concentraciones de triglicéridos en suero. Por lo tanto, se observa que el grupo DAGF + Syrah mejoró la resistencia a insulina sistémica en mayor medida que los otros grupos. Esta respuesta se puede atribuir a los polifenoles hidrolizables y proantocianidinas no extraíbles del orujo de la variedad Syrah como se observa en el análisis componentes principales; el cual muestra que la variedad Syrah está



mayormente representada por estos compuesto; mientras que, el orujo de Malbec se caracterizó por la mayor concentración de antocianinas y proantocianidinas extraíbles y este orujo fue el que reguló de manera importante los triglicéridos en suero (Figura 10b). Ratas alimentadas durante 10 semanas con dieta estándar y suplementada con diferentes concentraciones de orujo de uva Muscadina (6.8-20.6%) presentaron una menor concentración de triglicéridos y este efecto fue asociado a una menor expresión de transcrito de síntesis de ácidos grasos. Se identificaron algunos compuestos fenólicos extraíbles en este orujo como (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina, kamferol, antocianinas como peonidinas y petunidinas, así como procianidina B2, sin embargo, estos no fueron cuantificados (Yu *et al.*, 2017). Los compuestos anteriormente mencionados fueron detectados en nuestro estudio, mayoritariamente en los orujos de las variedades Malbec y Garnacha, mientras que Syrah presentó concentraciones muy bajas de estos compues polifenólicos extraíbles.

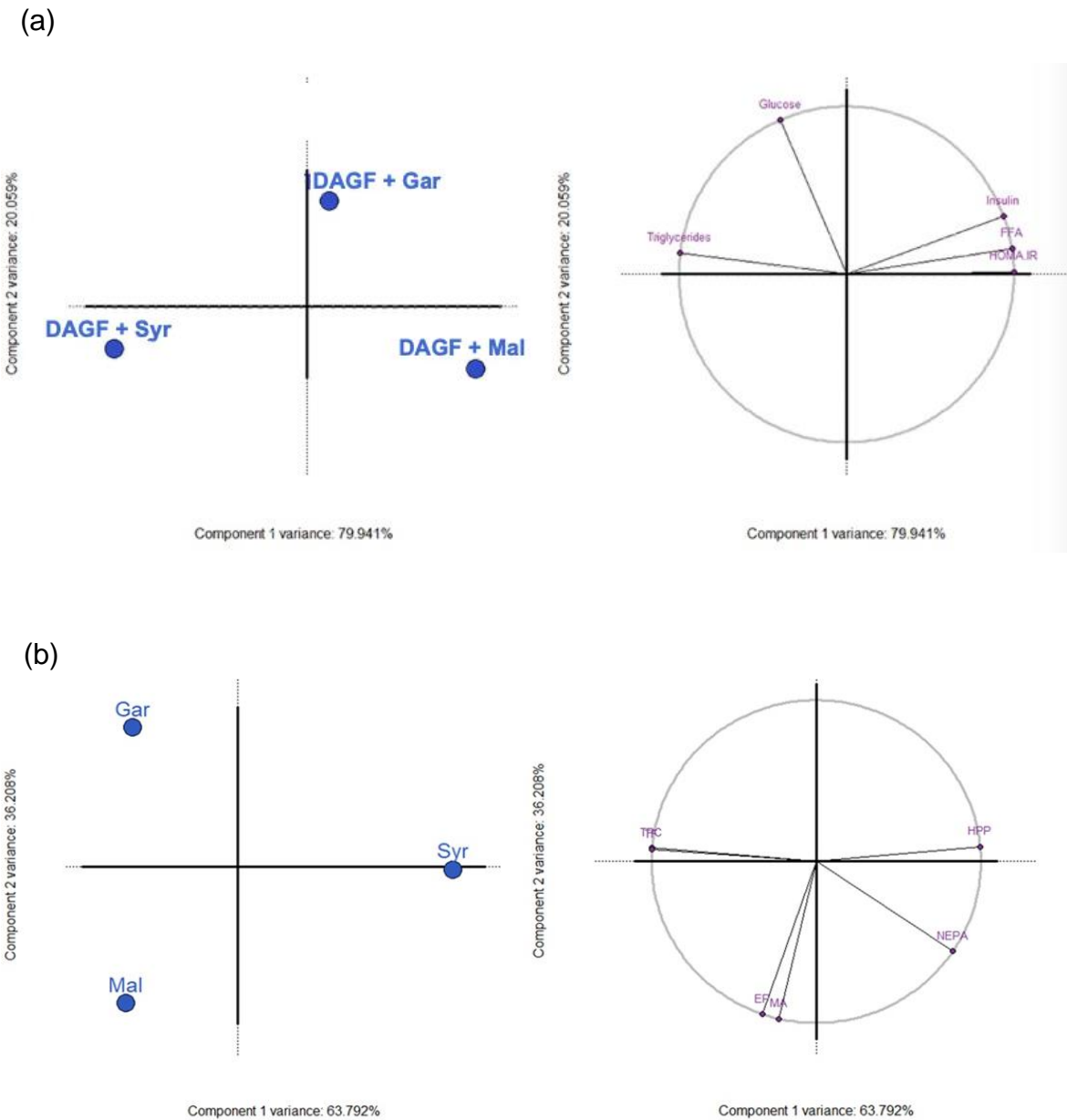


Figura 9. Análisis de componentes principales (PCA) del efecto de una dieta alta en grasa y fructuosa adicionada con orujos de diferentes variedades de uva sobre la dinámica fisiológica del metabolismo de ratas asociado con la resistencia a insulina (a). Análisis de componentes principales del contenido de polifenoles extraíbles y no extraíbles de orujos de diferentes variedades de uva (b). CFT:

Compuestos fenólicos totales. TF: Flavonoides totales. AM: Antocianinas monoméricas. PAE: Proantocianidinas extraíbles. PH: Polifenoles hidrolizables. NEPA: Proantocianidinas no extraíbles.

## 7. CONCLUSIONES

- La regulación de la resistencia a la insulina fue similar para los orujos de las diferentes variedades de uva, lo cual nos indica que la relación de polifenoles extraíbles y no extraíbles no es un parámetro por considerar para la selección de los orujos con posibles beneficios en la prevención de esta enfermedad metabólica.

- Los orujos con mayor contenido de antocianinas y proantocianidinas extraíbles presentaron efectos ligeramente menores para mejorar la resistencia a insulina; mientras que, los orujos con menor contenido de estos compuestos fenólicos extraíbles, hasta en un 64%, mostraron ligeramente mayor capacidad de prevención de la resistencia a insulina. Estos resultados sugieren que posiblemente el efecto no es dependiente solamente de antocianinas y proantocianidinas extraíbles.

-La variedad con mayor contenido de los compuestos fenólicos no extraíbles, como los polifenoles hidrolizables, y las proantocianidinas no extraíbles presentaron menor capacidad para producir un efecto hipotriglicéridémico. Estos resultados sugieren que posiblemente algún compuesto extraíble no presente en ese orujo o presente en menor cantidad es el responsable de la disminución de los triglicéridos en suero

-El orujo de uva, independientemente de la casa productora de vinos, es una alternativa recomendable para la prevención de la resistencia a insulina e hipertrigliceridemia.

-Para confirmar la relación de los NEPPs con estos beneficios, se requiere evaluar un mayor número de variedades con contenidos contrastantes de NEPPs y EPPs.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

**Abid, H., & Williams, L. J.** (2010). Principal component analysis. Interdisciplinary reviews. *Computational Statistic*, 2, 433-459. <https://doi.org/10.1002/wics.10>

**Adisakwattana, S., Moonrat, J., Srichairat, S., Chanasit, C., Tirapongporn, H., Chanathong, B., ... & Sapwarobol, S.** (2010). Lipid-Lowering mechanisms of grape seed extract (*Vitis vinifera* L) and its antihyperlipidemic activity. *J Med Plant Res*, 4(20), 2113-2120.

**Arranz Martínez, S.** (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos en la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. Tesis para obtener el grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid

**Arranz, S., Silván, J. M., & Saura-Calixto, F.** (2010). Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study on the Spanish diet. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(11), 1646-1658. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900580>

**Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., & Freitas, S. P.** (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, 68, 581-594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>

**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>

**Cantos, E., Espin, J. C., & Tomás-Barberán, F. A.** (2002). Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC- DAD- MS- MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5691-5696. <https://doi.org/10.1021/jf0204102>

**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 grado de Ingeniero Químico en Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.

**Cordero-Herrera**, I., Martín, M. Á., Escrivá, F., Álvarez, C., Goya, L., & Ramos, S. (2015). Cocoa-rich diet ameliorates hepatic insulin resistance by modulating insulin signaling and glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(7), 704-712. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.01.009.

**Costabile**, G., Vitale, M., Luongo, D., Naviglio, D., Vetrani, C., Ciciola, P., Tura, A., Castello, F., Mena, P., Del Rio, D., Capaldo, B., Rivellese, A. A., Riccardi, G. & Giacco, R. (2019). Grape pomace polyphenols improve insulin response to a standard meal in healthy individuals: A pilot study. *Clinical Nutrition*, 38(6), 2727-2734. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.11.028>

**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., ... & de Moura, R. S. (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>

**da Silva Rosa**, S. C., Nayak, N., Caymo, A. M., & Gordon, J. W. (2020). Mechanisms of muscle insulin resistance and the cross-talk with liver and adipose tissue. *Physiological Reports*, 8(19), e14607. <https://doi.org/10.14814/phy2.14607>

**Evans**, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2003). Are oxidative stress – activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction? *Diabetes*, 52(1), 1-8. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.1>

**Gerardi, C., D'amico, L., Migoni, D., Santino, A., Salomone, A., Carluccio, M. A., & Giovinazzo, G. (2020).** Strategies for reuse of skins separated from grape pomace as ingredient of functional beverages. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 645. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00645>

**Gil-Sánchez, I., Esteban-Fernández, A., de Llano, D. G., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrana, A., Salazar, N., Gueimonde, M., De los Reyes-Gavilán, C. G., Martín Gómez, L., García Bermejo, M. L., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2018).** Supplementation with grape pomace in healthy women: Changes in biochemical parameters, gut microbiota and related metabolic biomarkers. *Journal of Functional Foods*, 45, 34-46. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.031>

**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)

**González-Centeno, M. R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M. C., López, F., & Femenia, A. (2010).** Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT-Food Science and Technology*, 43(10), 1580-1586. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.024>

**González-Abuín, N., Martínez-Micaelo, N., Margalef, M., Blay, M., Arola-Arnal, A., Muguerza, B., ... & Pinent, M. (2014).** A grape seed extract increases active glucagon-like peptide-1 levels after an oral glucose load in rats. *Food & function*, 5(9), 2357-2364. <https://doi.org/10.1039/C4FO00447G>

**Goñi, I., & Serrano, J. (2005).** The intake of dietary fiber from grape seeds modifies the antioxidant status in rat cecum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(11), 1877-1881. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2213>

**Hano C. (2020).** Antioxidant and Anti-Aging Action of Plant Polyphenols. *Medicines*. 1(14) DOI: <https://www.researchgate.net/publication/342924827>

**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>

**Jiménez-Escrig**, A., Rincón, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5489-5493.  
<https://doi.org/10.1021/jf010147p>

**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, 4360-4367.  
<https://doi.org/10.1021/jf049613b>

**Laura**, A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253-271). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>

**Lu**, B., Bridges, D., Yang, Y., Fisher, K., Cheng, A., Chang, L & Saltiel, A. R. (2014). Metabolic crosstalk: molecular links between glycogen and lipid metabolism in obesity. *Diabetes*, 63(9), 2935-2948. <https://doi.org/10.2337/db13-1531>

**Manach**, C., & Donovan, J. L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*, 38(8), 771–785.  
<https://doi.org/10.1080/10715760410001727858>

**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., Pérez-Jiménez, J., Rocha-Guzmán, NE., Rodríguez-García, ME., Alonzo-Macias, M. & Reynoso-Camacho, R. (2021). Modification on the polyphenols and dietary fiber content of grape pomace by instant controlled



pressure drop. *Food Chemistry*, 36, 130035.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130035>

**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*, 15(1), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.12.028>

**NIDDK**. (2018). Insulin Resistance & Prediabetes. 24/02/2021, de NIH Sitio web <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/what-is-diabetes/prediabetes-insulin-resistance>

**Petersen**, K. F., & Shulman, G. I. (2006). Etiology of insulin resistance. *The American Journal of Medicine*, 119(5), S10-S16.  
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.01.009>

**Petersen**, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133–2223.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>

**Pérez-Jiménez**, J., Arranz, S., & Saura-Calixto, F. D. (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 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.002>

**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>

**Rockenbach**, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliani, V., Genovese, M. I., de Souza Schmidt Gonçalves, A. E., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and

*Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, 127(1), 174-179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.137>

**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>

**Rosenzweig**, T., Skalka, N., Rozenberg, K., Elyasiyan, U., Pinkus, A., Green, B., ... & 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>

**Santoleri**, D., & Titchenell, P. M. (2019). Resolving the paradox of hepatic insulin resistance. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 7(2), 447-456. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.10.016

**Saura-Calixto**, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006>

**Savage**, D. B., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2007). Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological reviews*, 87(2), 507-520. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2006>

**Schmitz**, O., Rungby, J., Edge, L., & Juhl, C. B. (2008). On high-frequency insulin oscillations. *Ageing Research Reviews*, 7(4), 301-305. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.04.002>

**Singla**, P., Bardoloi, A., & Parkash, A. A. (2010). Metabolic effects of obesity: A review. *World Journal of Diabetes*, 1(3), 76–88. <https://doi.org/10.4239/wjd.v1.i3.76>

**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. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.  
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

**Solari-Godiño**, A., Lindo-Rojas, I., & Pandia-Estrada, S. (2017). Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of two grapes residues (*Vitis vinifera*) of varieties dried: quebranta (red) and torontel (white). *Cogent Food & Agriculture*, 3(1), 1-11. <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1361599>

**Stumvoll**, M., Mitrakou, A., Pimenta, W., Jenssen, T., Yki-Järvinen, H., & Van Haefen, T. (2000). Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Journal of Diabetes Care*, 23, 295-301. Doi: 10.2337/diacare.23.3.295.

**Suckale**, J., & Solimena, M. (2008). Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 13, 7156–7171. <https://doi.org/10.2741/3218>

**Sun**, J., Shannon, M., Ando, Y., Schnackenberg, L. K., Khan, N. A., Portilla, D., & Beger, R. D. (2012). Serum metabolomic profiles from patients with acute kidney injury: a pilot study. *Journal of Chromatography*, 893-894, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.042>

**Van Hul**, M., Geurts, L., Plovier, H., Druart, C., Everard, A., Ståhlman, M & Cani, P. D. (2018). Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 314(4), E334-E352. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00107.2017>

**von Wilamowitz-Moellendorff**, A., Hunter, R. W., García-Rocha, M Sakamoto, K. (2013). Glucose-6-phosphate-mediated activation of liver glycogen synthase plays a key role in hepatic glycogen synthesis. *Diabetes*, 62(12), 4070-4082. doi:10.2337/db13-0880

**Wilcox**, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist Reviews*, 26(2), 19–39.

**Wright**, J. R., Colby, H., D. & Miles, P. R. (1981). Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 206(2), 296-304. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90095-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90095-3)

**Xiang**, L., Zhang, H., Wei, J., Tian, X. Y., Luan, H., Li, S., Zhao, H., Cao, G., Chung, A., Yang, C., Huang, Y., & Cai, Z. (2018). Metabolomics studies on db/db diabetic mice in skeletal muscle reveal effective clearance of overloaded intermediates by exercise. *Analytica Chimica Acta*, 1037, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.082>

**Xia**, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., & Li, H. B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622–646. <https://doi.org/10.3390/ijms11020622>

**Yaribeygi**, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8152–8161. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>

**Yaribeygi**, H., Sathyapalan, T., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2020). Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020 <https://doi.org/10.1155/2020/8609213>

**Yogalakshmi**, B., Bhuvaneshwari, S., Sreeja, S., & Venkatraman Anuradha, C. (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. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2), 221-237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>

**Yu**, J., Bansode, R. R., & Smith, I. N. (2017). Impact of grape pomace consumption on the blood lipid profile and liver genes associated with lipid

metabolism of young rats. *Food & Function* 8(8):2731-2378. DOI: 10.1039/c7fo00542c.

**Zhang**, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *Journal of Proteomics*, 75(4), 1079–1088. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.10.027>

**Zurita**, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2012). Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(8), 936-939. <https://doi.org/10.3109/096374>