



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Extracción de aceites esenciales de uva (*Vitis vinifera*) y
zarzamora (*Rubus spp.*) con fluidos supercríticos”**

Tesis que presenta

Sara de Anda Torres

Para obtener el grado de

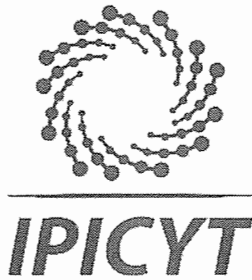
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectoras

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Dra. Erandi Vargas Ortiz

San Luis Potosí, S.L.P., 07 Octubre de 2019



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Extracción de aceites esenciales de uva (*Vitis vinifera*) y zarzamora (*Rubus spp.*) con fluidos supercríticos**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Sara De Anda Torres** y aprobada el siete de octubre del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Codirector de la tesis

Dra. Erandi Vargas Ortiz
Codirector de la tesis

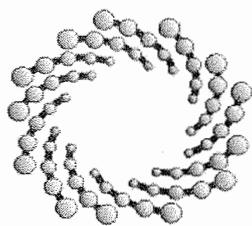
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa y la Dra. Erandi Vargas Ortiz

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (636064) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 201 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 7 días del mes de octubre del año 2019, se reunió a las 10:20 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Presidenta	IPICYT
Dra. Erandi Vargas Ortiz	Secretaria	UMSNH
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Sara De Anda Torres

sobre la Tesis intitulada:

*Extracción de aceites esenciales de uva (*Vitis vinifera*) y zarzamora (*Rubus spp.*) con fluidos supercríticos*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Dra. Erandi Vargas Ortiz (UMSNH)

El Jurado, después de deliberar, determinó

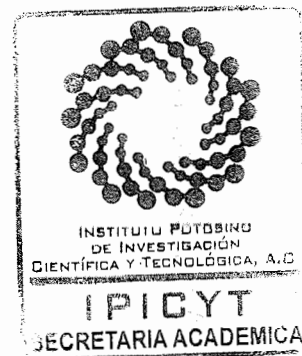
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 7 días del mes de octubre de 2019.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mis padres por su apoyo incondicional en cada meta propuesta.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por la oportunidad de trabajar y aprender dentro de su laboratorio.

Al Dr. Antonio de León Rodríguez por permitirme la entrada a su laboratorio y hacer uso de sus equipos.

Al M.C. Alberto Barrera Pacheco y el Dr. Víctor Emanuel Balderas Hernández; por su apoyo técnico, consejos y amistad.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular, por volverse otra familia para mí y compartir sus conocimientos.

A mis compañeros y amigos de generación por su apoyo y amistad durante estos dos años.

A mi familia, por el apoyo incondicional en los momentos difíciles y los logros obtenidos. Por no dudar y estar conmigo.

A mis padres, por los esfuerzos que hicieron para que yo pudiera estudiar la maestría y creer siempre en mí.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Resumen	xi
Abstract	xii
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Desperdicio de alimentos y Seguridad Alimentaria	1
1.2 Metabolitos secundarios o fitoquímicos	2
1.2.1 Fuentes de compuestos fenólicos	6
1.3. Extracción de metabolitos secundarios	11
2. JUSTIFICACIÓN	14
CAPÍTULO 1.	15
EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL POR FLUIDOS SUPERCRÍTOS Y PURIFICACIÓN DE RESVERATROL DE UVA (<i>Vitis vinifera</i>) Y MOSTO.	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES.....	35
CAPÍTULO 2.	35
EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ZARZAMORA (<i>RUBUS SP.</i>) POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y MACERACIÓN	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA	51

Lista de Tablas

Pág.

Tabla 1. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides en muestras de uva y mosto	22
Tabla 2. Experimentos obtenidos del diseño experimental por superficie de respuesta y valores experimentales obtenidos	23
Tabla 3. Cuantificación de resveratrol, fenoles totales y flavonoides en cada uno de los experimentos del diseño experimental por superficie de respuesta..	24
Tabla 4. Rendimientos de resveratrol por distintas extracciones.....	35
Tabla 5. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides en extractos de zarzamora	42
Tabla 6. Compuestos fenólicos presentes en el extracto de zarzamora.....	43

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Generación de glucosa a partir de la fotosíntesis de las plantas.....	4
Figura 3. Ruta de la síntesis de estilbenos (resveratrol).....	6
Figura 4. Uva variedad Pinot Noir en estadio maduro	7
Figura 5 Forma isomérica trans del resveratrol.	9
Figura 6. Diagrama de fases típico de un fluido supercrítico	12
Figura 7. Cromatograma obtenido por GC-MS de la extracción por FSC..	25
Figura 8. Curva de superficie de respuesta para la óptima extracción de resveratrol.	26
Figura 9. Cromatografía de capa fina de los extractos de mosto y uva probando distintas condiciones de etanol acidificado.....	27
Figura 10. Curva de distintas concentraciones de ácido acético para extracción de resveratrol.	28
Figura 11. Cromatografía de capa fina de la purificación de resveratrol.....	29
Figura 12. Actividad antioxidante de muestras de uva, mosto y las distintas fuentes de resveratrol	30
Figura 13. Citotoxicidad de células 3T3-L1 con tratamientos de resveratrol.....	31
Figura 14. Acumulación de lípidos en células 3T3-L1 con tratamientos de resveratrol.	34
Figura 15. Cromatogramas obtenidos por GC-MS de los aceites esenciales de zarzamora	44
Figura 16. Actividad antioxidante del aceite esencial de zarzamora	45
Figura 17. Citotoxicidad de células 3T3-L1 con tratamiento de aceite esencial de zarzamora	46
Figura 18 Acumulación de lípidos en células 3T3-L1 con tratamientos de aceite esencial de zarzamora.....	49

RESUMEN

“Extracción de aceites esenciales de uva (*Vitis vinifera*) y zarzamora (*Rubus spp.*) con fluidos supercríticos”

Un tercio de los alimentos producidos en el mundo se desperdician. Estos desperdicios son mayoritariamente verduras y frutas que aún contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos extraíbles. Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes de las plantas, con más de 8,000 estructuras conocidas actualmente que van desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta sustancias altamente polimerizadas como los taninos. Los fenólicos de las plantas están generalmente involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión de patógenos, parásitos y depredadores, además de contribuir a los colores de las plantas.

El resveratrol es una fitoalexina (compuestos antimicrobianos que se acumulan en las plantas como resultado de infecciones o estrés) y se encuentra en muchas plantas, incluidas las uvas, los cacahuates y los frutos rojos. El uso de resveratrol como nutracéutico y como agente terapéutico para muchas enfermedades ha sido ampliamente investigado en estudios preclínicos y sus efectos han sido contradictorios. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue utilizar los desechos de la producción de vino (mosto), así como el desecho de la producción de zarzamoras (producto de baja calidad) para la extracción de aceites esenciales convirtiendo el material de desecho en subproductos de alto valor agregado. La obtención de aceites esenciales se hizo usando métodos convencionales (maceración con etanol absoluto y ácido acético al 0.2%) y por fluidos supercríticos considerado como tecnologías verdes emergentes. Los extractos obtenidos fueron caracterizados por GC-MS y su actividad biológica fue probada en células 3T3-L1. Los rendimientos de resveratrol fueron de 4.99 mg/100g de muestra de seca en el caso de la uva. En el caso de zarzamora se obtuvo un aceite esencial con alto poder antioxidante. Tanto el resveratrol purificado obtenido de mosto de uva como los extractos de la zarzamora mostraron efecto anti-lipogénico al disminuir la acumulación de grasa en células 3T3-L1.

PALABRAS CLAVE: fitoquímico, fluidos supercríticos, desechos alimentarios, uva, zarzamora

ABSTRACT

"Extraction of essential oils from grape (*Vitis vinifera*) and blackberry (*Rubus spp.*) with supercritical fluids"

A third of the food produced in the world is discarded. These wastes are mostly vegetables and fruits that still contain high amounts of phenolic compounds. Phenolic compounds are the most abundant secondary metabolites of plants, with more than 8,000 structures currently known; ranging from simple molecules such as phenolic acids to highly polymerized substances such as tannins. Plant phenolics are generally involved in defense against ultraviolet radiation or aggression of pathogens, parasites and predators, in addition to contributing to plant colors.

Resveratrol is a phytoalexin (antimicrobial compounds that accumulate in plants as a result of infections or stress) and is found in many plants, including grapes, peanuts, and red fruits. The use of resveratrol as a nutraceutical and as a therapeutic agent for many diseases has been extensively investigated in preclinical studies and its effects have been contradictory. Therefore, the objective of the present work was to use the waste from the wine production (must), as well as the blackberry marketing (low quality product) for the extraction of essential oils converting the waste material into by-products of high added value. Essential oils extraction was carried out using conventional methods (maceration with absolute ethanol and 0.2% acetic acid) and using supercritical fluids, which is considered as an emerging green technology. The essential oils were characterized by GC-MS and their biological activity was tested in 3T3-L1 cells. Resveratrol was purified from grape essential oil giving a yield of 4.99 mg/100g of dried sample. The blackberry essential oil showed the highest antioxidant power. Both, the purified resveratrol and blackberry essential oil showed anti-lipogenic effect by decreasing the accumulation of fat accumulation in 3T3-L1 cells.

KEY WORDS. Blackberry, grape, phytochemical, supercritical fluids, food waste

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Desperdicio de alimentos y Seguridad Alimentaria

Se estima que un tercio de todos los alimentos producidos a nivel mundial se pierden o se desperdician representando alrededor de 1,300 millones de toneladas al año de alimento desperdiciado (FAO, 2019).

La pérdida de alimentos se refiere a cualquier alimento que se pierde en la cadena de suministro entre el productor y el mercado. Esto puede ser el resultado de problemas previos a la cosecha, como infestaciones de plagas, o problemas en la recolección, manejo, almacenamiento, empaquetado o transporte. Algunas de las causas subyacentes a la pérdida de alimentos incluyen la falta de infraestructura, mercados, mecanismos de precios o incluso la falta de marcos legales (FAO, 2019).

El desperdicio de alimentos, por otro lado, se refiere al descarte o uso alternativo (no alimentario) de alimentos que son seguros y nutritivos para el consumo humano. La comida se desperdicia de muchas maneras:

- Los productos frescos se eliminan por no considerarse óptimos en términos de forma, tamaño y color, y a menudo se eliminan de la cadena de suministro durante las operaciones de clasificación.
- Los minoristas y los consumidores a menudo descartan los alimentos que están próximos a la fecha de consumo preferente o que la han superado.
- Las grandes cantidades de alimentos comestibles a menudo no se usan o se dejan y se descartan de las cocinas domésticas y los establecimientos de comidas.

Las pérdidas de alimentos afectan a la seguridad alimentaria, a la calidad y la inocuidad alimentarias, al desarrollo económico y al medioambiente. La inseguridad alimentaria es, a menudo, más una cuestión de acceso (poder adquisitivo y precio de los alimentos) que de suministro, por lo que mejorar la eficiencia de la cadena de suministro de alimentos puede ayudar a disminuir el

coste de los alimentos para el consumidor y, así, aumentar el acceso a los consumidores (FAO, 2019).

Se estima que la industria del vino genera entre 2 y 3 millones de toneladas por año a nivel nacional, de residuos o subproductos; principalmente producidos durante el periodo de vendimia; la mayoría de los residuos generados en una bodega (80-85%) son residuos orgánicos: orujos, lías, raspón, lodos, etc. Los orujos se producen durante el prensado de la uva, y están constituidos por piel y pepitas. El resto de los residuos son lías que se generan en el proceso de clarificación de la fermentación del vino; raspón, constituido por ramas y hojas de la vid, y los lodos del tratamiento de las aguas residuales. Los residuos orgánicos producidos durante el proceso de elaboración de vino contienen una gran variedad de compuestos naturales comercialmente atractivos, como son los taninos, el ácido tartárico y los polifenoles (Ventosa *et al.*, 2011).

Los frutos rojos se ubican como uno de los productos con mayor potencial en el sector agrícola mexicano. Con una producción de 390,239 toneladas¹ y un crecimiento anual promedio de 21.8% durante el periodo 2003-2016, estos frutos cuentan con una demanda creciente a nivel nacional e internacional. El 40.95% de la producción se destina al mercado internacional. En particular, las exportaciones mexicanas representaron un porcentaje muy significativo de las importaciones de berries en Chile (50.23%), Estados Unidos (40.47%) y Canadá (23.27%). (SIAP, 2017).

De este procesamiento, principalmente selección de calidad de las zarzamoras genera aproximadamente 20% de residuos o zarzamora de baja calidad, de los cuales están compuestos principalmente de pieles y semillas; que aún contienen grandes cantidades de compuestos bioactivos, principalmente fitoquímicos que pueden ser extraídos y aprovechados como subproductos de alto valor comercial (Pasquel Reátegui *et al.*, 2014).

1.2 Aceites esenciales y metabolitos secundarios

Los aceites esenciales son mezclas naturales muy complejas, de metabolitos secundarios o inclusive ácidos grasos esenciales, que pueden contener entre 20

y 60 compuestos en diferentes concentraciones. Se caracterizan por dos o tres componentes principales a concentraciones altas (20–70%) en comparación con otros compuestos que pueden estar solo presentes en cantidades traza (Bakkali y Idaomar, 2008). Estos aceites se extraen de plantas aromáticas y se caracterizan por sus olores fuertes. Los aceites esenciales fueron empleados por primera vez en la Edad Media por los árabes quienes conocían sus propiedades antisépticas (bactericidas, virucidas y fungicidas), así como sus propiedades, medicinales y por fragancias se empleaban en la elaboración de perfumes o en los procesos de embalsamamiento. Los aceites esenciales también tienen usos en la conservación de alimentos o como analgésicos, antiinflamatorios, espasmolíticos y anestésicos locales (Bandar et al., 2013; Bakkali and Idaomar, 2008).

Los aceites esenciales son líquidos, volátiles, límpidos y raramente coloreados, solubles en lípidos y solubles en solventes orgánicos con una densidad generalmente más baja que la del agua. Pueden ser extraídos de todos los órganos de la plantas, es decir, brotes, flores, hojas, tallos, ramitas, semillas, frutas, raíces, madera o corteza (Bakkali and Idaomar, 2008).

1.3. Biosíntesis de metabolitos secundarios

La fotosíntesis es el proceso por el cual las hojas de las plantas usan dióxido de carbono proveniente del aire y del agua que absorben por las raíces para biosintetizar carbohidratos con la simultánea producción de oxígeno (Figura 1). Esta reacción solo se puede llevar a cabo bajo la influencia de la luz solar y en los cloroplastos (Pengelly, 2004). La glucosa formada por la fotosíntesis es utilizada en diferentes rutas metabólicas de la planta, generando diversas moléculas como el ácido pirúvico, la acetil-CoA y los ácidos orgánicos (Pengelly, 2004). El carbono y el nitrógeno son almacenados en moléculas comunes a todas las células, tales como aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, que realizan las mismas funciones en las plantas superiores. A estos se les llaman metabolitos primarios (Ávalos y Elena, 2009).

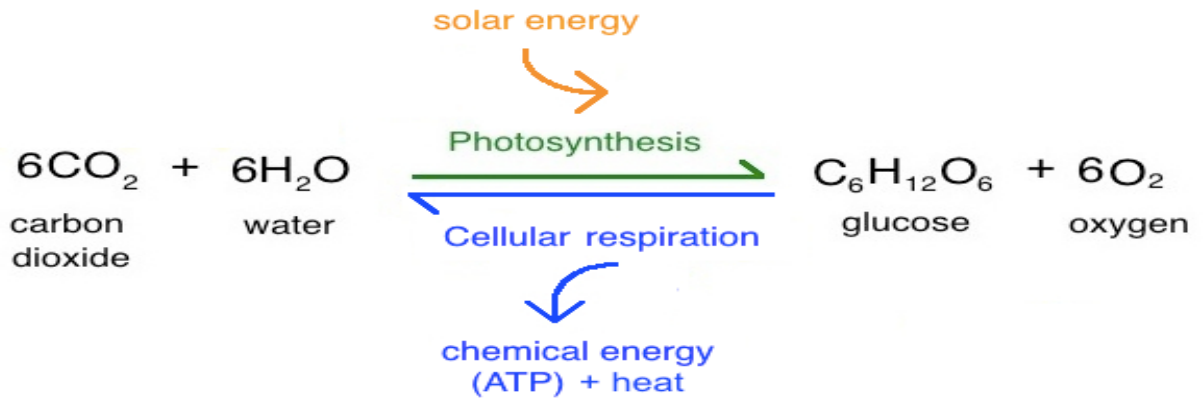


Figura 1. Generación de glucosa a partir de la fotosíntesis de las plantas

(Tomado de Berg et al., 2012)

A diferencia de otros organismos, las plantas asignan una cantidad significativa de carbono asimilado y energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en los procesos metabólicos de la planta. A estos compuestos se les denomina metabolitos secundarios (Ávalos y Elena, 2009). Estos metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no se consideran esenciales para mantener la vida de la planta pero tienen un papel muy importante en los mecanismos de defensa (Hadacek, 2002). En la actualidad, el número de estructuras descritas de metabolitos secundarios o fitoquímicos supera las 100,000. Sin embargo, el número real es mucho más alto debido a que solo se ha estudiado menos del 20% de todas las plantas.

Se han descrito cuatro rutas principales para la biosíntesis de los diversos metabolitos secundarios (**Figura 2**). La ruta de las pentosas que genera glicósidos y polisacáridos. La ruta del ácido shikímico que genera fenoles, taninos y alcaloides aromáticos. La ruta del ácido mevalónico que da lugar a terpenos, esteroides y alcaloides y por último, la ruta del acetato-malotanto, que origina fenoles y alcaloides (Pengelly, 2004).

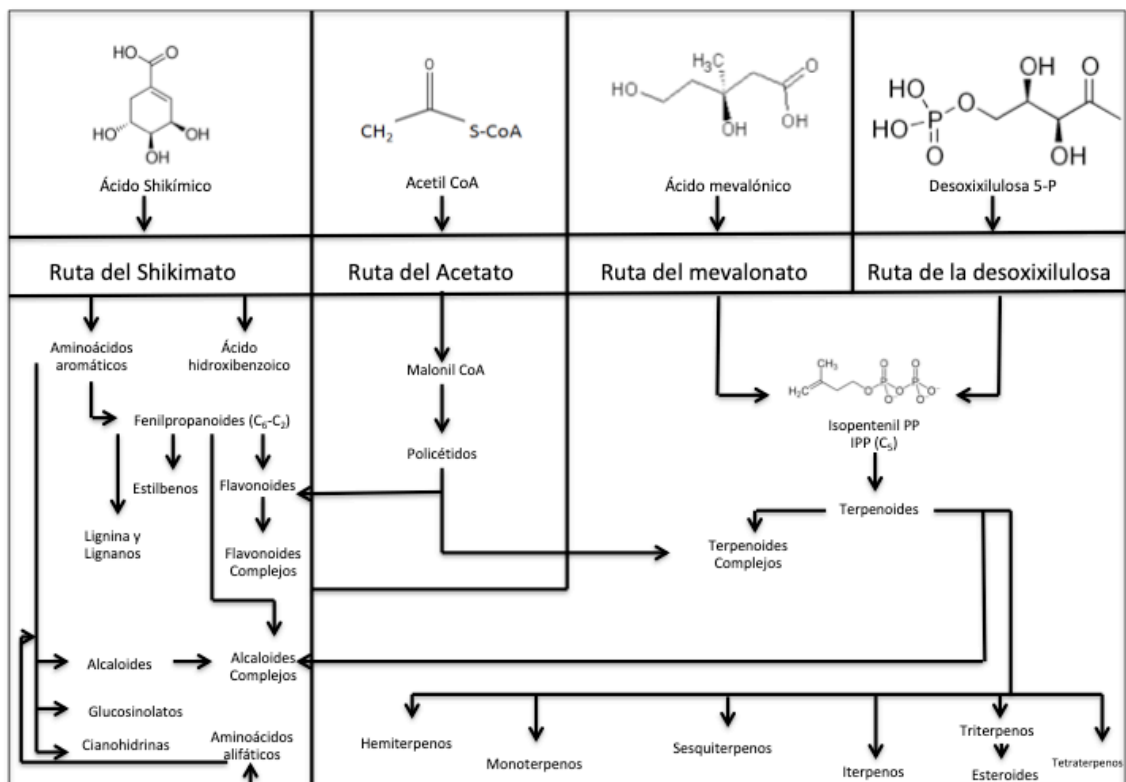


Figura 2. Principales rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios de las plantas

Tomado de (Pengelly, 2004).

La ruta del ácido shikímico es una de las rutas más estudiadas, a partir de esta ruta se producen una gran variedad de metabolitos secundarios empleando como precursores los aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano (Seigler, 1998). La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Pérez, 2014).

En la ruta de biosíntesis de estilbenos (**Figura 3**), la primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA. Esta reacción es catalizada por la enzima chalcona sintasa y da lugar a naringerina chalcona, precursor de los flavonoles y antocianinas. La misma condensación catalizada por la enzima estilbeno sintasa conduce a la formación

de estilbenos implicados en mecanismos de defensa de plantas frente a patógenos. Dentro de los estilbenos más estudiados se encuentra el **resveratrol** (Ávalos y Pérez, 2009).

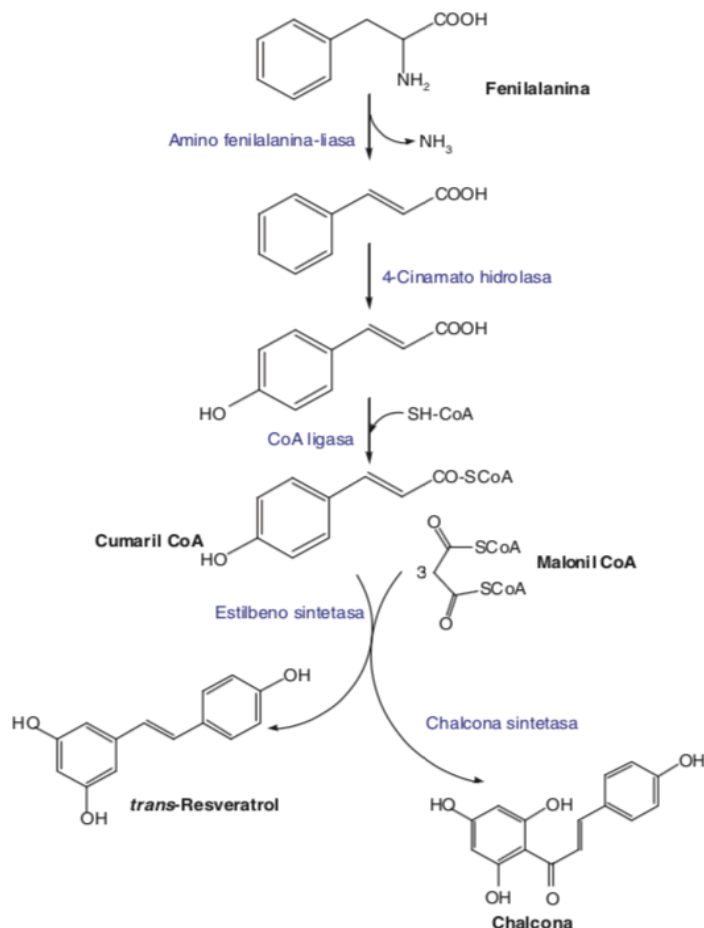


Figura 3. Ruta de la síntesis de estilbenos (resveratrol). La biosíntesis de resveratrol se da a partir de una unidad fenilpropanoide, la cual deriva de la ruta del ácido shikímico, activada en forma de Acil CoA y tres unidades de Malonil CoA (Tomado de Chung *et al.*, 2012).

1.4 Fuentes de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, presentes fundamentalmente en las frutas rojas, en las moradas, en los cítricos y en la manzana, se pueden clasificar en flavonoides (antocianinas, flavonoles y flavonas, flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, isoflavonas y flavanoles), fenilpropanoides (derivados de ácidos hidroxicinámicos, como el cafeico, ferúlico sinápico y p-cumárico), estilbenoides (resveratrol y piceatanol) y derivados del ácido benzoico (ácidos gálico y elágico).

Además de los efectos positivos en la salud, muchos compuestos fenólicos tienen un impacto directo en la calidad de los productos que los contienen, pues aportan propiedades sensoriales. Así, entre estos compuestos se encuentran pigmentos como las antocianinas (encargados de los tonos rojizos-azulados) o los flavonoles (tonos amarillentos), sustancias que transmiten el sabor amargo de algunos cítricos (la naringina en los pomelos o la neohesperidina en naranjas amargas) o del aroma intenso de los plátanos (debido al eugenol). Otros, como los derivados de los ácidos hidroxicinámicos, son susceptibles de ser oxidados por las enzimas presentes en los tejidos vegetales, y dar lugar a productos pardos (Martínez-Navarrete *et al.*, 2008).

Algunas fuentes ricas en compuestos fenólicos son la uva, así como en su derivado de vino tinto y las zarzamoras, de las cuales se han estudiado principalmente las antocianinas por lo que el resto de compuestos fenólicos presentes así como sus efectos positivos en la salud humana necesitan de mayor investigación (Kaume, Howard and Devareddy, 2012).

1.4.1 Uva (*Vitis vinifera*)

Existen diversas variedades de uva (*Vitis vinifera*), conocidas como vid o parra. Las cepas más empleadas para la elaboración de vino tinto son: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir y Cabernet Franc (Figura 4). Las cepas de uvas más empleadas para la elaboración de vino blanco son: Chardonnay, Moscatel y Sauvignon Blanc (Casas, Faraldi and Bildstein, 2008).



Figura 4. Uva variedad Pinot Noir en estadio maduro

Las uvas constan principalmente de agua (78-80%) y tienen una gran cantidad de compuestos fenólicos (2-7%) (Casas, Faraldi and Bildstein, 2008). Los compuestos fenólicos tales como flavonoides, antocianinas, flavonoles o catequinas y taninos se encuentran principalmente en la piel y en las semillas de la uva. El fitoquímico más importante en la uva son los estilbenos; siendo el resveratrol el principal estilbeno presente. La concentración de resveratrol depende del tipo de uva, así como de factores ambientales (Rodríguez Montealegre *et al.*, 2006).

Los residuos de la uva derivan principalmente del proceso de la elaboración del vino, entendiéndose por vino a la bebida resultante exclusivamente de la fermentación alcohólica completa o parcial de mostos de uva en contacto o no de sus pieles. Su elaboración consta de 3 fases principales: obtención del mosto, la fermentación y por último, la conservación y envejecimiento. La concentración de compuestos polifenólicos del vino varía entre 1.80 y 1.06 g/L, con un promedio de 2.57 g para el vino tinto y entre 0.16 y 0.30 g/L para el vino blanco. El efecto benéfico en la salud del vino tinto es el resultado de su alta concentración de polifenoles, incluido el resveratrol (NMX-V-012-1986).

Se ha prestado especial atención a la extracción de polifenoles de la uva, no sólo por sus implicaciones en las propiedades de calidad del vino, sino también por la posibilidad de convertir la enorme cantidad de residuos de uva generados por la industria vitivinícola en todo el mundo en productos de valor agregado (Pinelo *et al.*, 2007).

1.4.1.1 Resveratrol, principal compuesto fenólico en uvas y vino tinto

El resveratrol es un polifenol natural, con estructura de estilbeno que consiste en la unión de 2 anillos fenólicos mediante un doble enlace de estireno que forma 3,5,4'-trihidroxiestilbeno (peso molecular: 228.25 g/mol). En la **Figura 5** se muestra la molécula de trans-resveratrol que es el isómero más estable desde el punto de vista estérico. Además de ser el compuesto más abundante que se encuentra en los frutos rojos, la uva y las nueces. (Gambini *et al.*, 2013)

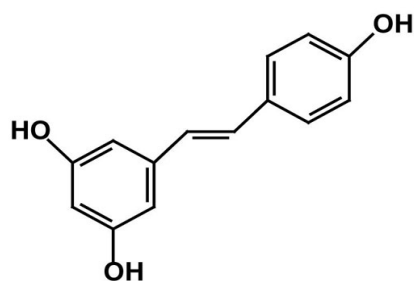


Figura 5 Forma isomérica trans del resveratrol.

Su estructura consta de la unión de 2 anillos fenólicos por un doble enlace estireno que forman el 3,5,4- trihidroxiestilbeno. Tomado de Chung *et al.*, (2012).

Los estilbenos son producidos por las plantas en respuesta a infecciones fúngicas, estrés abiótico como iones de metales pesados o exposición a luz UV, por lo que se denominan fitoalexinas; es decir metabolitos secundarios que se producen como resistencia ante daños que recibe la planta y están localizadas en el sitio subsecuente al daño (Bennett y Wallsgrave, 1994). Las fitoalexinas están presentes en muchas plantas, incluyendo uvas, nueces y frutos rojos.

1.4.1.2. Efectos positivos del resveratrol en la salud humana

El resveratrol funciona principalmente como antioxidante y también se ha visto que incrementa la actividad de la Sirtuina 1 (SIRT1), una enzima relacionada directamente con la restricción calórica y la longevidad. A su vez, tiene efectos favorables sobre el sistema cardiovascular, así como el de la regulación de la acumulación de triglicéridos y la lipólisis. Se ha descrito que el resveratrol posee propiedades anticancerígenas (Hsieh and Wu, 1999), antiinflamatorias, antialérgicas (Kim, 1999), neuroprotector (Cuzzola et al., 2011) y promueve la osteogénesis (Tseng *et al.*, 2011). Es decir, los estudios describen numerosos efectos benéficos (Gambini et al., 2013). Uno de los puntos clave de la efectividad del resveratrol es su biodisponibilidad; a pesar de su baja biodisponibilidad, el resveratrol posee eficacia in vivo, lo cual podría ser explicada por la conversión de los sulfatos y glucurónidos de nuevo a resveratrol en órganos diana (Gambini *et al.*, 2013).

1.4.1.3. Resveratrol y células 3T3

Se ha demostrado que el resveratrol reduce la síntesis de lípidos en el hígado de rata y adipocitos 3T3-L1. El resveratrol disminuye la proliferación, induce la apoptosis y la detención del ciclo celular en varias líneas celulares. Además, se demostró que el resveratrol aumenta la actividad de las sirtuinas (regulador de información de tipo de apareamiento silencioso, sir2), que funcionan en una amplia variedad de procesos celulares, y una familia de enzimas clave en la restricción de calorías, la histona de la familia Sir2 desacetilasas. La diferenciación de los preadipocitos y la inducción de vías metabólicas relacionadas con el metabolismo de los lípidos incluye la expresión de varios genes específicos de los adipocitos como el receptor-gamma PPAR γ activado por el proliferador de peroxisomas, y (CCAAT/potenciador de la unión de proteínas alfa (C/EBP α), proteínas de unión al elemento regulador del estero1c (SREBP-1) y ácido graso sintasa (FAS). La Lipoproteína lipasa (LPL) y la lipasa sensible a hormonas (HSL) son las dos principales enzimas que regulan el proceso de lipólisis (Rayalam *et al.*, 2008).

1.4.2. Zarzamoras

La zarzamora es un fruto que consiste en un agregado de drupeletes carnosos, cada uno conteniendo una sola semilla (pirene) alrededor del receptáculo (**Figura 6**). Las variedades cultivadas incluyen "Tupi" (*Rubus geoides*), "Comanche" (*Rubus ollalio*) y "Cherokee" (*Rubus eubatos*) (Kaume *et al.*, 2012). La producción mundial de zarzamora, es de aproximadamente 735,162.93 Ton/año y en México, la producción sobrepasó las 133,000 Ton, para el 2012, siendo Michoacán el que produce alrededor del 93% de toda la producción nacional. Sin embargo, uno de los principales problemas para la comercialización y la vida de anaquel de la zarzamora, es su rápida perecibilidad en postcosecha, esto se debe principalmente a su alta tasa respiratoria, textura blanda, a su poca resistencia al manipuleo y al transporte (Trejo- Márquez *et al.*, 2015).



Figura 6. Zarzamora en estadio maduro, antes de la cosecha

Las zarzamoras están mayormente compuestas por agua (88%) y azúcares (5%). Las zarzamoras son una buena fuente de vitaminas, minerales y compuestos bioactivos como polifenoles. Los ácidos orgánicos ayudan a estabilizar a las antocianinas y el ácido ascórbico juega un papel importante extendiendo la vida de anaquel de los frutos rojos. Las zarzamoras son ricas en compuestos polifenólicos como antocianinas, flavonoles, flavanoles, procianidinas, elagitaninos y ácidos fenólicos (Kaume *et al.*, 2012).

Uno de estos compuestos fenólicos presentes en la zarzamora es el resveratrol, que se encuentra en cantidades de 229 μg por cada 100g de fruta seca.

Presenta propiedades astringentes, antiescorbútcas, antiulcerosas, antiinflamatorias y anticancerígenas debido su alto contenido de compuestos como son: ácido clorogénico, felúrico, ursólico y málico (Kim, 2018).

1.5. Extracción de metabolitos secundarios

1.5.1 Extracción por métodos convencionales

Se pueden emplear varios enfoques para extraer el material vegetal. Aunque el agua se usa como extractor en muchos protocolos tradicionales, los solventes orgánicos de polaridades variables generalmente se seleccionan en los métodos

de extracción para explotar las diversas solubilidades de los constituyentes de la planta. Los procedimientos de extracción con disolventes aplicados a los productos naturales de las plantas incluyen la maceración, la percolación, la extracción Soxhlet, la extracción con solventes a presión, la extracción con solventes asistida por ultrasonido, la extracción a reflujo y la destilación a vapor (Walker, 2005).

1.5.2 Extracción por Fluidos Supercríticos (FSC)

Se dice que un fluido es supercrítico (FSC), cuando su presión y temperatura exceden su respectivo valor crítico (temperatura crítica T_c y presión crítica P_c) (Parhi and Suresh, 2013). El diagrama típico de fases de un fluido supercrítico se presenta en la Figura 7.

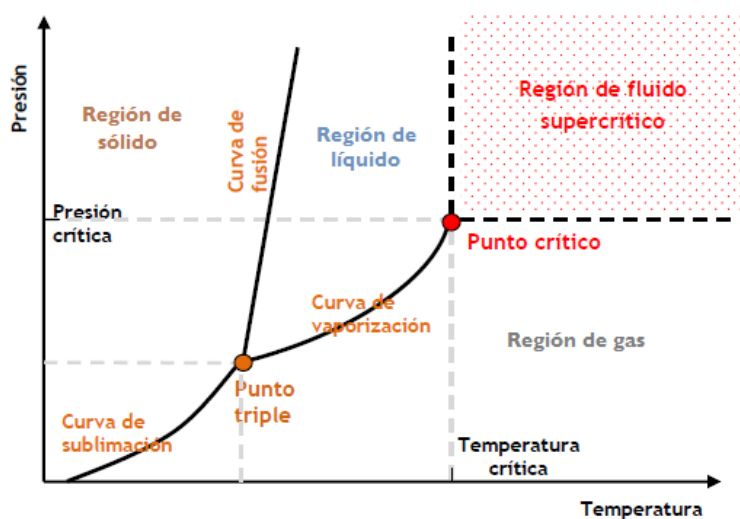


Figura 6. Diagrama de fases típico de un fluido supercrítico

(Tomada de Domínguez, 1978)

Los FSC proporcionan varias ventajas operacionales sobre los métodos de extracción convencionales ya que utilizan solventes supercríticos, con diferentes propiedades fisicoquímicas tales como densidad, difusividad, viscosidad y constante dieléctrica. Debido a su baja viscosidad y a su difusividad relativamente alta, los fluidos supercríticos tienen propiedades de transporte mejoradas que los líquidos, pueden difundirse fácilmente a través de materiales sólidos y, por lo

tanto, pueden proporcionar velocidades de extracción más rápidas. Una de las características principales de un fluido supercrítico es la posibilidad de modificar la densidad del fluido cambiando su presión y/o temperatura (del Valle, Mena y Budinich, 2008).

Dado que la densidad está relacionada con la solubilidad, al alterar la presión de extracción, se puede modificar la fuerza del disolvente del fluido. Otras ventajas, en comparación con otras técnicas de extracción, son el uso de solventes generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés), la mayor eficiencia del proceso de extracción en términos de aumento de rendimientos y tiempos de extracción más bajos (del Valle, Mena y Budinich, 2008).

Existen varios compuestos que se pueden usar como fluidos supercríticos, aunque el dióxido de carbono (CO_2) es el disolvente más utilizado por tres razones principales: es inocuo para la salud humana y el medio ambiente, respetando los criterios de sostenibilidad; su temperatura crítica moderada ($31.2\text{ }^\circ\text{C}$) permite la preservación de compuestos bioactivos en extractos; finalmente, el extracto se conserva del contacto con el aire, donde pueden producirse ligeras reacciones de oxidación (da Silva *et al.*, 2016).

Debido a su baja polaridad, el CO_2 es menos efectivo para extraer compuestos más polares de las matrices naturales, y los modificadores (también denominados co-disolventes) se usan comúnmente para superar este problema. Estos son compuestos polares que, agregados en pequeñas cantidades, pueden inducir cambios sustanciales en las propiedades del solvente del CO_2 supercrítico puro. La extracción supercrítica ocurre básicamente en dos pasos: la solubilización de los compuestos químicos presentes en la matriz sólida y su separación en el solvente supercrítico (da Silva *et al.*, 2016).

Las aplicaciones de FSC en las industrias de alimentos, farmacéutica y química fina reportada incluyen: el descafeinado de café (Hincapié Avila, 2013) y té, la extracción de aceites esenciales, de ingredientes de especias y pimientos rojos (da Silva *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICACIÓN

México desperdicia 37% de los alimentos que se producen (10,431,000 toneladas de alimentos al año); alimentos a los cuales se les puede dar un segundo tratamiento y convertirlos de materias primas de desecho a productos de alto valor agregado.

El resveratrol es un fitoquímico que en su forma pura tiene un valor comercial elevado (1g tiene un costo de \$1,900.00 MXN), el cual se puede extraer de materias primas de “materia de desecho” de la industria alimentaria tales como el mosto del vino tinto que representan de 2 a 3 millones de toneladas por año y los desechos de las zarzamoras, de las cuales el 20% del procesamiento total se convierte en desecho que no se comercializan en el mercado. Estudios han probado que el resveratrol tiene propiedades benéficas en la salud humana como antioxidante, anticancerígeno, antilipogénico, antiinflamatorio, entre otros.

En el mundo, cerca de 1,400 millones de adultos tienen sobrepeso y 500 millones, obesidad. De acuerdo con el Global Health Observatory, México es uno de los cinco países de latinoamérica con la prevalencia más alta de sobrepeso (9.0%) en niños menores de cinco años. En México el sobrepeso y la obesidad afectan a todos los grupos de edad incluyendo niños, adolescentes y adultos. El efecto que genera la obesidad sobre mortalidad temprana, discapacidad, disminución de la calidad de vida y menor productividad en quienes la padecen, es un llamado de atención para implementar mejores estrategias para su control y prevención haciendo uso de productos naturales.

Por lo tanto, es importante investigar los efectos de los fitoquímicos como resveratrol y aceites esenciales en el tratamiento de sobrepeso y obesidad para hacer uso de estos como agentes terapéuticos.

CAPÍTULO 1.

EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y PURIFICACIÓN DE RESVERATROL DE UVA (*VITIS VINIFERA*) Y MOSTO

OBJETIVOS

General

Extraer aceites esenciales de subproductos de uva (Pinot Noir) y mosto del proceso de producción de vino tinto empleando el sistema de extracción por fluidos supercríticos. Así mismo purificar el resveratrol presente en este aceite y probar su acción biológica.

Específicos

- Cuantificar los polifenoles totales y los flavonoides en los aceites esenciales.
- Optimizar la extracción por medio de la metodología de superficie de respuesta
- Purificar el resveratrol a partir de los aceites esenciales extraídos
- Cuantificar el contenido de resveratrol por GC-MS.
- Probar acción biológica del resveratrol en células 3T3-L1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acondicionado de las muestras

Las muestras de uva y mosto se obtuvieron del viñedo Toyán ubicado en San Miguel de Allende, Gto. Las muestras se secaron en horno Novatech por 48 h a 50 °C para obtener un sólido seco, posteriormente se molieron y se secaron nuevamente por 12h a 50 °C; se molieron por segunda ocasión después del secado y almacenaron en refrigeración hasta su posterior análisis.

Cuantificación de fenoles totales y flavonoides

Para la cuantificación de fenoles totales se utilizaron 10 g de muestra (uva Pinot Noir y mosto de vino tinto) previamente acondicionada; y se extrajeron con 100 ml de etanol absoluto, sonicando por 15 min, dejando la extracción por 24h en oscuridad a temperatura ambiente. Se mezclaron 10 µl de extracto adecuadamente diluido o una solución estándar de concentraciones variables con 50 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu siguiendo el método de (Lin y Tang, 2007) con ligeras modificaciones. El agua desionizada se utilizó para la dilución y control. La solución se diluyó hasta un volumen total de 850 µl y se mezcló a fondo. Después de la incubación durante 10 min a temperatura ambiente, se añadió inmediatamente 150 µl de una solución de Na₂CO₃ al 20% y luego se incubó durante 2h a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 765 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ 51119200). Se usó ácido gálico (AG) a una concentración de 10 mg/ml como estándar, y se realizó una curva de calibración con AG a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500 600 y 700 µg/ml ($R^2=0.990$); los compuestos fenólicos totales de las muestras se expresaron en mg GA/10g de muestra. Estos análisis se llevaron a cabo por triplicado.

Para la cuantificación de flavonoides se baso en el método reportado por (Lin y Tang, 2007) con ligeras modificaciones. se mezclaron 100 µl de extracto con 650 µl de agua desionizada que se utilizó para la dilución y control. La solución se diluyó hasta un volumen total de 750 µl y se mezcló a fondo. Después se añadieron inmediatamente 750 µl de una solución de AlCl₃ al 2% y luego se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 430 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ 51119200). Se usó quercetina (QE) a una concentración de 10 mg/ml como estándar realizando una curva de calibración con QE a concentraciones de 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 µg/ml ($R^2=0.988$); los flavonoides totales de las muestras se expresaron en mg de QE/ 10g de muestra. Estos análisis se llevaron a cabo por triplicado.

Extracción de resveratrol por fluidos supercríticos usando la metodología de superficie de respuesta

Para obtener las mejores condiciones de extracción por fluidos supercríticos (Waters Bio-Botanical Extraction System), se usó la metodología de superficie de respuesta (MSR). El diseño de MSR resultó en 20 experimentos (**Tabla 2**), teniendo como variable fija la presión, que se mantuvo a 160 bar. Los parámetros variables fueron temperatura de 40 a 60 °C, el tiempo de extracción de 15 a 40 min y etanol empleado como co-solvente (5 a 7%). El etanol se seleccionó como modificador debido a su baja toxicidad contra el metanol, además, el etanol es un disolvente polar permitido en la industria alimentaria. La muestra seca (100 g), se mantuvo en el recipiente de extracción. Los caudales de CO₂ y el modificador se fijaron en 20 g/min, el extracto obtenido se recolectó y se midió el volumen extraído. El extracto se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Cuantificación de resveratrol por GC-MS y análisis por metodología de superficie de respuesta.

Se trazó una curva de calibración con un estándar de resveratrol (Sigma-Aldrich) de 0 a 25 µg/ml. La cantidad de resveratrol obtenida por FSC se cuantificó en cada uno de los extractos tomando 2.5 ml de cada extracto. El etanol presente en la muestra, se evaporó en Eppendorf Vacufuge plus y la muestra se derivatizó con 50 µl de piridina y 50 µl de BSTFA (N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) a 37 °C por 30 min (Ragab et al., 2006). El análisis GC-MS se realizó en el equipo Agilent Technologies 5977E MSD con una temperatura de inyección de 250 °C y con una relación de división de 1:10. Cada muestra (1 µl) se inyectó en una columna (HP-5MS 250 µm x 0.25 µm x 30 m, Agilent Technologies) con un flujo de helio de 1 ml/min a 14.5 psi de presión. La temperatura de la columna se mantuvo inicialmente a 100°C durante 1 min, seguido de un gradiente de temperatura de 20 °C/min, produciendo una temperatura máxima de 300 °C, que se mantuvo durante 1 min. La interfaz se ajustó a 300°C y la fuente de iones se ajustó a 230 °C. Los datos se adquirieron en el modo de impacto electrónico (EI) a 70 eV con un rango

de exploración de 50-500 (m/z) y se monitorearon a (m/z) 444 amu para resveratrol.

Extracción de resveratrol con etanol acidificado para mejorar rendimientos

Se probó la extracción con etanol acidificado de acuerdo con reportes realizados por (Varo, 2013).

Las muestras de uva (Pinot Noir) y mosto (variedad de uva Pinot Noir) se sometieron a extracción con los siguientes extractantes:

- 1) etanol absoluto
- 2) etanol + ácido acético 0.1%
- 3) etanol + ácido acético 0.2%
- 4) etanol + ácido fosfórico 0.1%
- 5) etanol + ácido fosfórico 0.2%

La mezcla se sonicó durante 15 min y dejándola reposar por 24 h en oscuridad, posteriormente la mezcla se centrifugó y se llevó a cabo la separación por cromatografía de capa fina (TLC) usando como eluyente cloroformo-metanol ($\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$) 8:2 revelando con vainillina- H_2SO_4 al 5%.

Extracción de resveratrol con etanol + ácido acético probando diferentes concentraciones

Una vez que se eligió el etanol + ácido acético como solvente de extracción se realizó una curva con diferentes concentraciones para probar con cuál de estas se extrae mayor cantidad de resveratrol.

Las muestras de mosto se maceraron con etanol + ácido acético a concentraciones de 0.1-0.5%, con el método de extracción previamente mencionado; una vez obtenidos los extractos se analizaron por TLC .

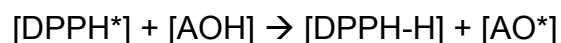
Purificación de resveratrol

El resveratrol se purificó a partir de extractos de mosto siguiendo el protocolo de (Güder *et al.*, 2014) con algunas modificaciones. Los extractos (50 g de mosto y 500 ml de etanol con ácido acético 0.2%) se filtraron a través de papel filtro, se

evaporaron totalmente hasta sequedad bajo presión reducida (30 °C). Los residuos se resuspendieron en metanol CH₃OH 200 ml mezclado con 5g silica gel y se removió el solvente. La muestra (22 g) se depositó en una columna (2.5 x 50 cm) de silica gel (18.5 g) usando cloroformo-metanol (CHCl₃-CH₃OH) en gradientes 100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100 y colectado en 28 fracciones de 8 ml cada una. Estas fracciones se analizaron por TLC, las fracciones donde se encontró el resveratrol se juntaron y se pasaron nuevamente por la columna de silica gel, usando como eluyente acetato de etilo-metanol (CH₃OOCH₂CH₃-CH₃OH) en gradientes 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100 y colectado en 25 fracciones de 3 ml, analizando cada fracción por TLC con un sistema cloroformo-metanol (CHCl₃-CH₃OH) 9:1 x1 revelando con vainillina-H₂SO₄ al 5%. Las fracciones en las que se encontró el resveratrol puro se juntaron y se llevaron hasta sequedad.

Actividad de captación de radicales DPPH

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas; una preferencial atención es la técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH. Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante.



Las actividades antioxidantes de los extractos de uva Pinot Noir, mosto de vino tinto y el resveratrol extraído; se determinaron mediante el ensayo de captación de radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) siguiendo el método de Kim (2018) con ligeras modificaciones. Se mezclaron 180 µl de solución etanólica DPPH 0.2 mM y se hicieron reaccionar con 12 µl de las muestras [3 mg/ml], Trolox (de 10 diluciones en serie, 100-1000 µM) y DPPH con etanol (blanco) por separado. Se incubaron en placa de 96 micropocillos durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. Luego, el valor de absorbancia para cada mezcla se leyó a 517 nm después de la incubación. La capacidad antioxidante de

equivalencia de Trolox (TEAC) de cada muestra se calculó utilizando la ecuación y se expresó como μM Trolox equivalente/mg de muestra (μM TEAC/mg de muestra).

Viabilidad y diferenciación celular

El efecto biológico del resveratrol extraído y purificado se evaluó y se comparó con un resveratrol estándar y un resveratrol comercial a tres concentraciones diferentes: 50 μM , 25 μM y 10 μM .

Línea celular. Se utilizó la línea celular de fibroblastos (preadipocitos) de ratón 3T3-L1 proveniente de la colección de cultivo tipo americano (ATCC - CL113).

Cultivo celular. Se realizó el cultivo de líneas celulares 3T3-L1 en Medio Dulbeco Modificado (DMEM), Suero Bovino Fetal (FBS) al 10% y Penicilina/Estreptomicina al 1%; se incuban durante 48 h a una temperatura de 37 °C, atmósfera con 95% de aire y 5% de CO₂, formándose una monocapa.

Posteriormente, se realizaron subcultivos mediante una digestión enzimática con tripsina 10% durante 10 minutos en incubadora de CO₂ y se sembraron 3 cajas de cultivo celular por 48 h para formar nuevamente una monocapa de células hasta alcanzar dos días postconfluencia.

Viabilidad celular. Una vez que las células alcanzaron el 70-80% de confluencia, se recolectaron con tripsinación, se contaron en cámara de Neubauer y se cultivaron en placas de 96 pozos (5x10³ células/pozo) con medio de expansión por 7 días hasta alcanzar 100% de confluencia para posteriormente aplicar los tratamientos como se muestra a continuación:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Rs7	Rs7	Rs7	Rc5	Rc5	Rc5	Rp3	Rp3	Rp3
B	C+V	C+V	C+V	Rs8	Rs8	Rs8	Rc6	Rc6	Rc6	Rp4	Rp4	Rp4
C	Rs1	Rs1	Rs1	Rs9	Rs9	Rs9	Rc7	Rc7	Rc7	Rp5	Rp5	Rp5
D	Rs2	Rs2	Rs2	Rs10	Rs10	Rs10	Rc8	Rc8	Rc8	Rp6	Rp6	Rp6
E	Rs3	Rs3	Rs3	Rc1	Rc1	Rc1	Rc9	Rc9	Rc9	Rp7	Rp7	Rp7
F	Rs4	Rs4	Rs4	Rc2	Rc2	Rc2	Rc10	Rc10	Rc10	Rp8	Rp8	Rp8
G	Rs5	Rs5	Rs5	Rc3	Rc3	Rc3	Rp1	Rp1	Rp1	Rp9	Rp9	Rp9
H	Rs6	Rs6	Rs6	Rc4	Rc4	Rc4	Rp2	Rp2	Rp2	Rp10	Rp10	Rp10

Ctrl= Control (medio DMEM completo)

C+V= Control + Vehículo (medio DMEM completo+ PBS)

Rs= Resveratrol sigma

Rc=Resveratrol comercial

Rp=Resveratrol extraído y purificado

1-10=Concentraciones para resveratrol en μM :

1=0.1; 2= 0.5; 3=1; 4=6.25; 5= 12.5; 6=25; 7=37.5; 8= 50; 9=75 y 10=100

Después de 24 h de aplicar los tratamientos se retiraron 100 μl de medio y se agregaron 10 μl del reactivo 1 del kit de proliferación MTT, se incubaron por 4 h y posteriormente se agregaron 100 μl del reactivo 2 y se dejaron incubando toda la noche. Al día siguiente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a longitudes de onda de 580 y 670 nm. Esto se realizó a las 24, 48, 72 y 96 h.

Diferenciación celular

Cuando las células cultivadas alcanzaron una confluencia del 70-80%, se recolectaron las células mediante tripsinización. Las células se sembraron en cajas de 24 pozos con el medio de expansión de preadipocitos (medio DMEM+ 1% antibiótico + 10% suero de ternera).

Se dejaron crecer durante 48 h, o hasta que el cultivo alcanzara el 100 % de confluencia, se retiró el medio de crecimiento de cada pocillo y se agregó un volumen idéntico del medio de diferenciación (medio DMEM+ 1% antibiótico + 10% suero de ternera + 1 $\mu\text{g/ml}$ insulina + 0.5mM Metilisobutilxantina (IBMX) + 1 μM Dexametasona), se incubaron en medio de diferenciación durante 48 h y después de este tiempo se reemplazó el medio de diferenciación con medio de mantenimiento de adipocitos (medio DMEM+ 1% antibiótico + 10% suero de ternera + 1 $\mu\text{g/ml}$ insulina). El medio de mantenimiento de adipocitos se reemplazó cada 48 h. Las células se diferenciaron completamente a los 14 días después de la inducción, como lo demuestra la observación de la formación de gotas de lípidos. Las células se tiñieron con rojo oleoso y se midió la absorbancia a 510nm. Los tratamientos se añadieron durante todo el proceso de diferenciación y una vez finalizada la diferenciación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de fenoles totales y flavonoides

En la Tabla 1 se muestra el promedio de fenoles totales y flavonoides de las muestras de uva (variedad Pinot Noir) y mosto (variedad de uva Pinot Noir). El fruto de uva tuvo mayor cantidad de fenoles totales y el mosto con la menor cantidad, debido a que durante el proceso de producción de vino tinto, en la etapa de maceración y oxigenación se modifica la concentración de los compuestos fenólicos para otorgar características sensoriales al vino. En cuanto a flavonoides el fruto de uva y el mosto tienen cantidades similares entre 53-57 mg eqQE/10g de muestra.

Tabla 1. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides en muestras de uva y mosto

Muestra	Fenoles Totales*	Flavonoides**
Uva Pinot Noir	318.8 ± 0.02	5.39 ± 0.05
Mosto Pinot Noir	34.2 ± 0.08	5.74 ± 0.02

*mg eq AG/g de muestra seca

**mg eq QE/g de muestra seca

Las muestras presentan cantidades considerables de fenoles totales que pueden ser extraíbles para uso comercial, tal es el caso del resveratrol que es usado como nutraceutico; el contenido de fenoles totales y flavonoides reportada en este trabajo fue similar comparado a otros estudios. Reis *et al.* (2016) reportan valores de 90.2 mg eq AG/10g de uva seca (Da Porto *et al.*, 2014) reportan valores de 252-281 mg eq AG/10g de uva seca.

Extracción de resveratrol por fluidos supercríticos usando la metodología de superficie de respuesta

En la **Tabla 2** se muestran los parámetros para la extracción del aceite esencial en los 20 experimentos definidos por el diseño de superficie de respuestas. También

se presentan los resultados obtenidos. Después de la extracción la muestra inicial (100 g) perdió entre 0.1 a 2.6 g de peso seco.

Tabla 2 Nivel de variables elegibilidad para los ensayos y valores experimentales obtenidos de la extracción de compuestos fenólicos

Corrida	Factor 1 T (°C)	Factor 2 t (min)	Factor 3 Etanol%	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Volumen extraído (ml)
1	60	40	5	102.1	100.8	24
2	40	15	5	102.1	100.7	5.5
3	50	27.5	6	102.4	101.1	16
4	40	40	7	102.5	101.5	22
5	60	15	7	101.1	98.5	7
6	50	27.5	6	101.9	100.8	8.5
7	40	40	5	100.6	100.5	9
8	50	27.5	6	100.5	100.1	10
9	60	15	5	102.1	100.7	250µl
10	60	40	7	101.4	100	15
11	50	27.5	6	100.4	99.2	11
12	40	15	7	100.2	98.8	4.2
13	50	27.5	6	100	98.8	5
14	50	27.5	7	100.3	99.2	14
15	50	15	6	100.7	99.3	7
16	50	27.5	5	99.9	99	12.5
17	60	27.5	6	99.2	97.9	20
18	50	40	6	100.1	99.4	19
19	50	27.5	6	100.5	99.3	11.5
20	40	27.5	6	100	99.5	12

Cada extracto se analizó consecutivamente por GC-MS para cuantificar el resveratrol y poder realizar el gráfico de superficie de respuesta, para de esta manera encontrar las mejores condiciones de extracción en relación a la concentración de resveratrol.

Cuantificación de resveratrol por GC-MS y análisis por metodología de superficie de respuesta.

En la **Tabla 3** se pueden observar las cantidades de resveratrol extraídas para cada una de las corridas, obteniendo valores desde 0.02 mg hasta 4.99 mg por

cada 100 g de muestra seca. Siendo el valor de 4.99 mg la mayor cantidad de resveratrol extraído (corrida no. 4). Las señales de espectros de masas de diagnóstico fueron los asociados con el tri-TMS-resveratrol completamente derivatizado (m/z 444 amu), en la **Figura 8** se puede observar el espectro de masas de trans resveratrol de la corrida no.4.

Tabla 3 Cuantificación de resveratrol, fenoles totales y flavonoides en cada uno de los experimentos de la metodología de superficie de respuesta.

Corrida	Resveratrol (mg/100g muestra seca)	Fenoles Totales*	Flavonoides **
1	2.52	344	53
2	0.65	234	76
3	0.34	151	48
4	4.99	122	17
5	0.17	164	44
6	0.72	132	63
7	0.14	123	42
8	0.2	131	33
9	0.09	239	10
10	0.34	106	27
11	0.31	129	36
12	0.2	117	51
13	0.9	147	47
14	0.2	85	22
15	0.02	101	37
16	0.12	106	38
17	1.7	89	12
18	0.15	80	24
19	0.55	87	21
20	0.31	84	27

*mg eq AG

**mg eq QE

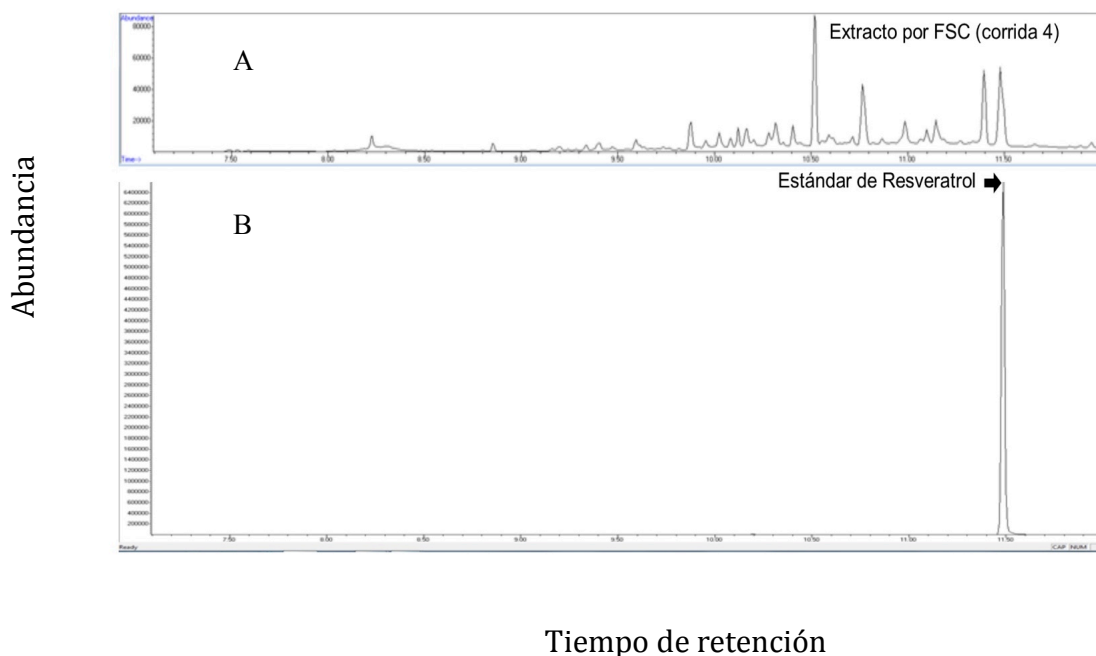


Figura 7. Cromatograma obtenido por GC-MS de la extracción por FSC. (a) Cromatograma de un solo ion (m/z 444 amu) de extracto de uva Pinot Noir. (b) El pico identificado fue confirmado por el estándar de resveratrol de Sigma Aldrich [25 $\mu\text{g/ml}$].

Una vez teniendo la cuantificación se procedió a hacer el análisis por la metodología de superficie de respuesta; usando un valor P de 0.05 y obteniendo la ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Ln}(\text{Resver}) = & 10.594210342641 - 1.1462300319001 \cdot T + 0.24818851188312 \cdot t + \\ & 4.1198317676567 \cdot C + 0.002343807808818 \cdot T \cdot t - 0.047024669574625 \cdot T \cdot C + \\ & 0.021131464328626 \cdot t \cdot C + 0.01361585892578 \cdot T^2 + 0.0078253327190949 \cdot t^2 - \\ & 0.18298746651868 \cdot C^2. \end{aligned}$$

En la **Figura 9** podemos observar la gráfica tridimensional de superficie de respuesta, la cual nos arrojó que la mejor condición de extracción es a una temperatura de 40 °C, con un tiempo de extracción de 31.2 min y usando 7% de etanol como co-solvente. Con un flujo de CO₂ de 20g/min. Es decir que la temperatura, el tiempo y el % de co-solvente son factores que afectan directamente a la extracción.

Al cuantificar los fenoles totales de la uva después de la extracción con FSC se encontró que aún contenían altas cantidades de estos compuestos y que los rendimientos de extracción se podían mejorar, por lo cual se procedió a realizar pruebas de extracción utilizando distintos ácidos y distintas concentraciones.

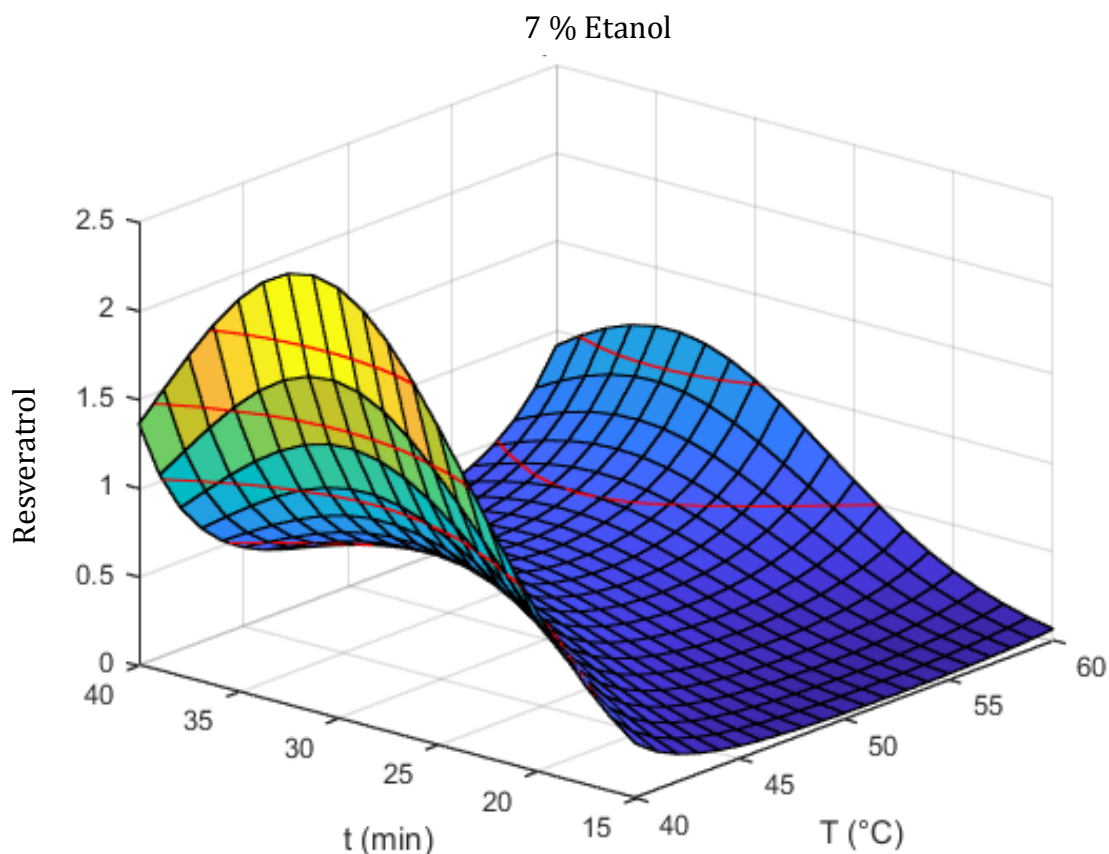


Figura 8. Curva de superficie de respuesta para la óptima extracción de resveratrol. Análisis de la superficie de respuesta para la extracción de resveratrol por fluidos supercríticos de uva Pinot Noir con respecto a las temperaturas, tiempos de extracción y % de etanol (co-solvente).

Extracción de resveratrol con etanol acidificado para mejorar rendimientos

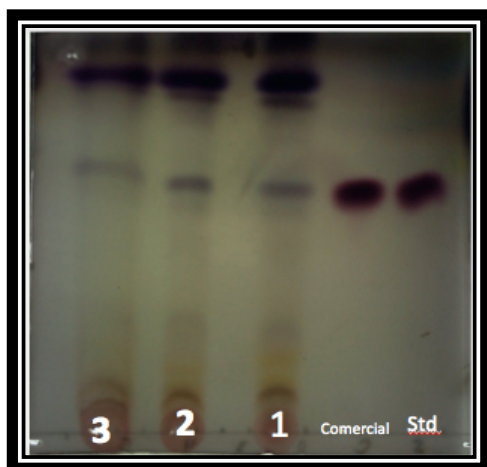
Una vez realizados los experimentos se observó que el etanol, el etanol + ácido acético y el etanol + ácido fosfórico fueron los tres mejores solventes para la extracción de resveratrol en concentración de 0.2%. En la Figura 10 podemos ver

una comparación entre estos tres solventes usando la concentración de 0.2% para cada uno de los ácidos para las muestras de uva y mosto.

La mayor concentración de resveratrol se identificó con el extractante de etanol + ácido acético (**Figura 10** carril 2 para todas las muestras), que además ayudó a la separación entre los compuestos extraídos, lo cual resultó benéfico para posteriormente aislar el compuesto.

Para verificar que la mejor concentración de ácido acético es 0.2% se procedió a realizar una curva probando concentraciones desde 0.1 a 0.5% observando el extracto de resveratrol con TLC. El pH bajo afecta favorablemente en la extracción ya que se aumenta la estabilidad de los polifenoles, su solubilidad y la desintegración de las paredes celulares facilitando la difusión de los compuestos del sólido al disolvente (Takeuchi *et al.*, 2009).

A)



B)

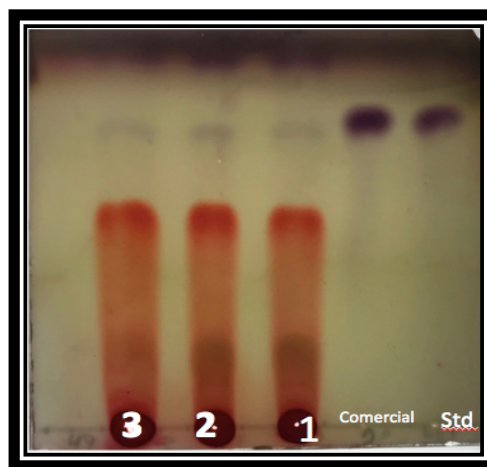


Figura 9. Cromatografía de capa fina de los extractos de mosto y uva probando distintas condiciones de etanol acidificado. (a) TLC del extracto de resveratrol de muestra de mosto de vino tinto (uva Pinot Noir); en el carril 1 se usó para la extracción etanol, en el carril 2 etanol + ácido acético 0.2% y en el carril 3 etanol + ácido fosfórico 0.2%. (b) TLC del extracto de resveratrol de muestra de uva Pinot Noir; en el carril 1 se usó para la extracción etanol, en el carril 2 etanol + ácido acético 0.2% y en el carril 3 etanol + ácido fosfórico 0.2%. Usando como control en todos los casos un resveratrol comercial y un estándar de resveratrol (SIGMA).

Extracción de resveratrol con etanol + ácido acético probando diferentes concentraciones

En la **Figura 11** podemos observar que la mayor concentración de resveratrol extraído fue usando etanol + ácido acético a una concentración de 0.2% (banda con mayor intensidad) y que, aumentando la concentración del mismo, la extracción disminuye. Con 0.5% de ácido acético no es visible el resveratrol (no se lleva a cabo la extracción). Por lo tanto, la concentración de ácido acético que será usada para todas las extracciones subsecuentes será de 0.2%.

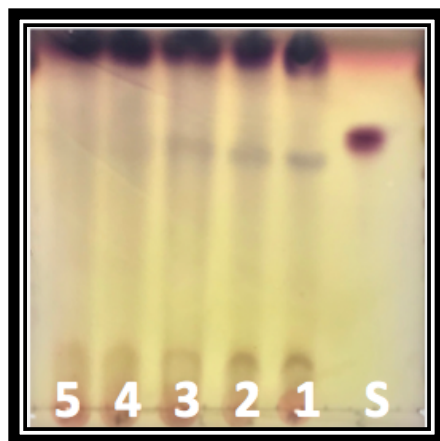


Figura 10. Curva de distintas concentraciones de ácido acético para extracción de resveratrol. TLC de extractos de resveratrol de mosto de vino tinto (uva Pinot Noir) usando etanol + ácido acético con distintas concentraciones: S= estándar de resveratrol SIGMA, 1= etanol + ácido acético 0.1%, 2= etanol + ácido acético 0.2%, 3= etanol + ácido acético 0.3%, 4= etanol + ácido acético 0.4%, 5= etanol + ácido acético 0.5%.

Purificación de resveratrol

Después de obtener los extractos el resveratrol se encontró en las fracciones 9 a 14, estas se juntaron para pasarse por la segunda columna con acetato de etilometanol ($\text{CH}_3\text{OOCH}_2\text{CH}_3\text{-CH}_3\text{OH}$). Posteriormente se encuentra en las fracciones 8 a 14 en forma pura. Estas fracciones se juntaron y se evaporó el eluyente, obteniendo 13.82 mg del compuesto aislado.

Para asegurar que el resveratrol esté en forma pura se comparó por medio de una TLC con el resveratrol estándar y el comercial (**Figura 12**). Así mismo se analizó por GC-MS.

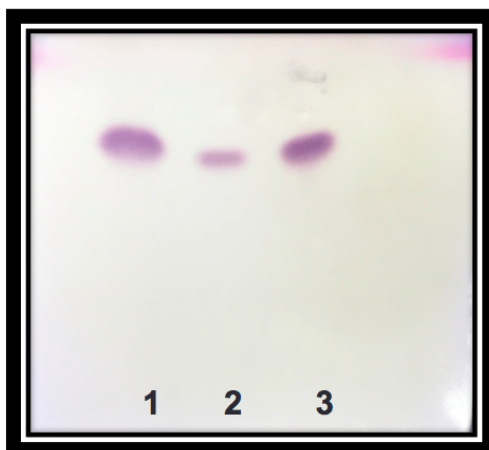


Figura 11. Cromatografía de capa fina de la purificación de resveratrol. TLC de comparación de pureza de resveratrol 1) resveratrol estándar sigma 2) resveratrol comercial 3) resveratrol extraído.

Actividad de captación de radicales DPPH

En la **Figura 13** se puede observar que el resveratrol obtenido del extracto de mosto y purificado, presenta un porcentaje de captación de radicales libres más alto que el resveratrol comercial y estándar obtenido de Sigma-Aldrich. El extracto de mosto por FSC presenta una actividad de captación de DPPH mayor que el extracto obtenido por maceración.

Cultivo de células 3T3 y experimento de viabilidad

El porcentaje de células viables en cada pocillo se calculó en relación con las células de control establecidas al 100%. Las respuestas de citotoxicidad se clasificaron como graves (30%), moderadas (30-60%), leves (60-90%) o no citotóxicas (> 90%) (Silva *et al.*, 2013)

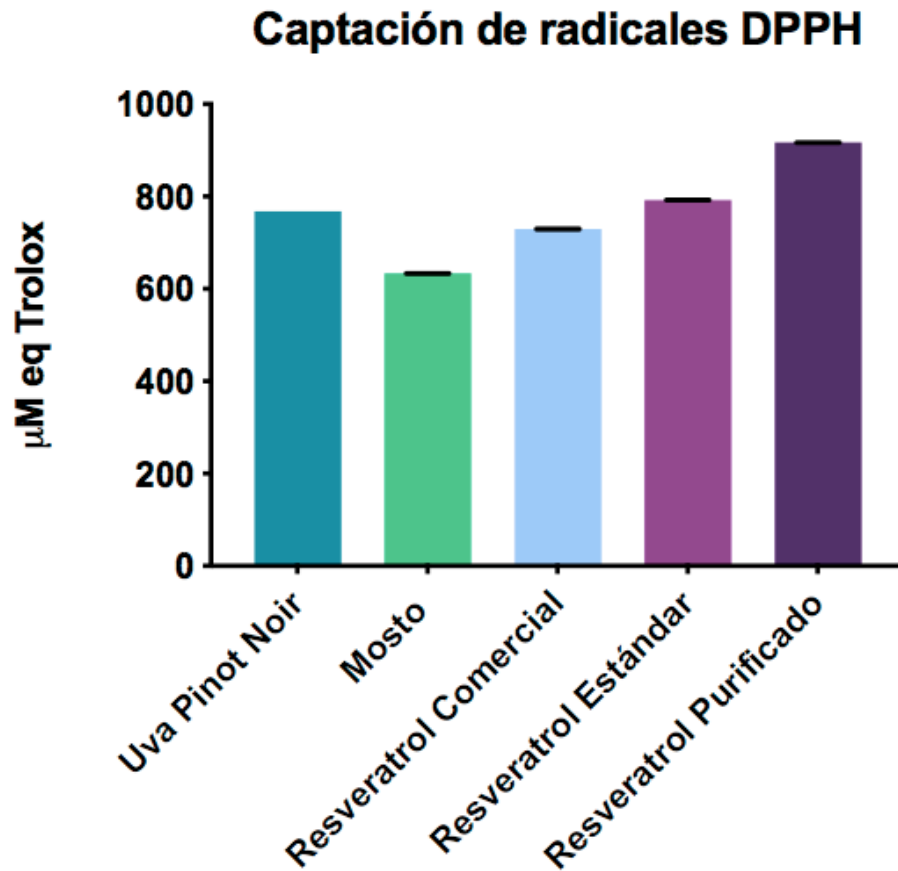


Figura 12. Actividad antioxidante de muestras de uva, mosto y las distintas fuentes de resveratrol. El resveratrol tiene la capacidad de donar un protón proveniente de los grupos hidroxilo para contrarrestar el efecto oxidativo de los radicales libres, en este caso el DPPH.

En la **Figura 14** se puede observar la citotoxicidad de los compuestos probados (resveratrol estándar, resveratrol comercial y resveratrol extraído de las muestras de mosto). En la Figura 14A se observa que con el resveratrol estándar de Sigma solo las concentraciones de 1, 6.25 y 100 μM a las 96 h empiezan a presentar una citotoxicidad leve de acuerdo a los parámetros de citotoxicidad establecidos por (Silva *et al.*, 2013). En un estudio similar con células NIH-3T3 (Guo *et al.*, 2018), se observó una citotoxicidad leve en concentraciones de 5 y 80 μM de resveratrol, similar a las concentraciones empleadas en este estudio (6.25 y 100 μM).

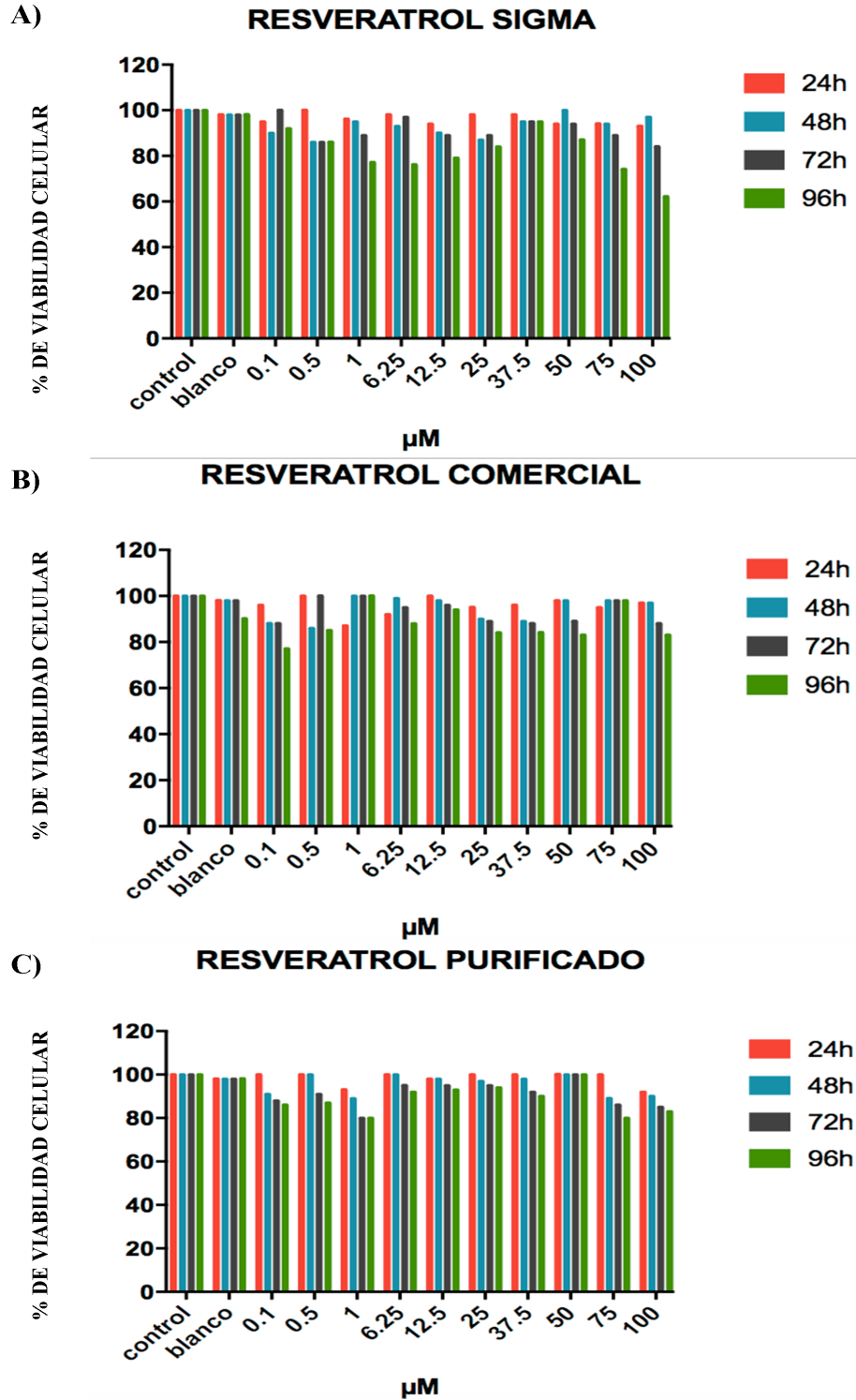


Figura 13. Citotoxicidad de células 3T3-L1 con tratamientos de resveratrol. Los efectos citotóxicos después de la exposición a los distintos compuestos y sus concentraciones, en células de fibroblastos 3T3. Los resultados se expresan como media y desviación estándar en diferentes periodos de tiempo experimentales.

DIFERENCIACIÓN CÉLULAS 3T3-L1

Los fitoquímicos que se encuentran en las frutas y verduras tienen un potencial para inhibir la adipogénesis e inducir la apoptosis (Yang *et al.*, 2008).

En los adipocitos 3T3-L1 diferenciados, los resultados se convierten en una disminución de la acumulación de lípidos intracelulares. Sin embargo, la acumulación de lípidos se redujo distinto para cada compuesto; los adipocitos se trataron con tres tipos de resveratrol; un estándar de Sigma, un resveratrol comercial y el resveratrol extraído de las muestras de mosto. Para el resveratrol estándar la mayor disminución se dio con la concentración de 10 μM , para el resveratrol comercial la mayor disminución fue con una concentración de 25 μM y para el resveratrol extraído y purificado, las tres concentraciones presentaron una disminución considerable (>50%) ante el control, donde la concentración de 10 μM presentó una disminución mayor del 80%.

Los mecanismos que explican esta acción no están del todo dilucidados; uno puede ser la capacidad del resveratrol de inducir la actividad de la Sirt 1, lo cual promueve su activación e inhibición del receptor nuclear PPAR γ ; otra alternativa es que incrementa la expresión de los genes mitocondriales, incluyendo los involucrados en la fosforilación oxidativa (Celis, Rozo and Garay, 2008).

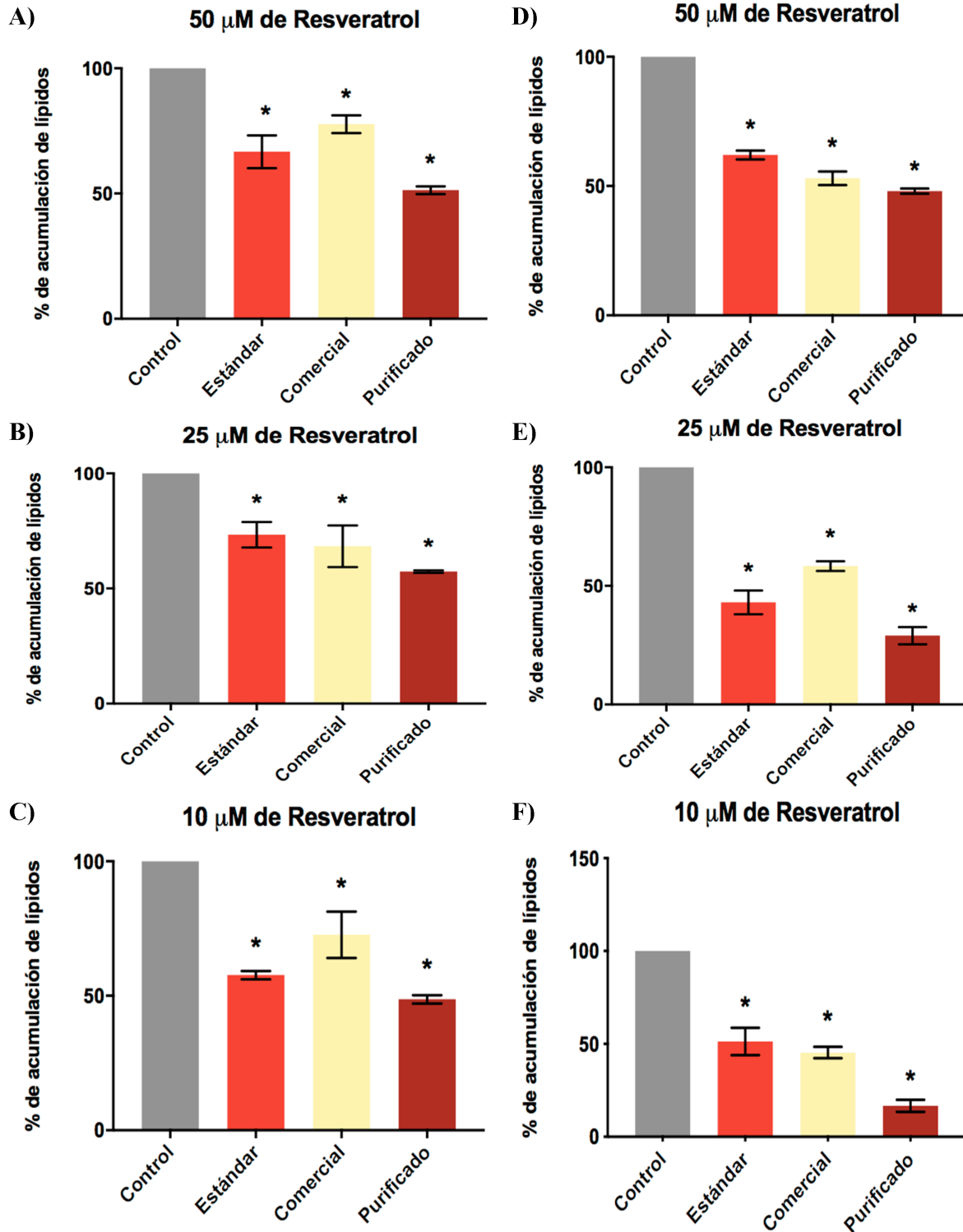


Figura 15. Acumulación de lípidos en células 3T3-L1 con tratamientos de resveratrol. La densidad de absorbancia del colorante rojo oleoso extraído de adipocitos diferenciados con los tratamientos de resveratrol sigma (A), comercial (B) y extraído de mosto (C) aplicados durante el proceso de diferenciación y resveratrol sigma (D), comercial (E) y extraído de mosto (F) aplicados terminando la diferenciación. Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos separados.

En la Figura 16 se muestran las fotografías de la acumulación de lípidos en células 3T3-L1 tratadas con los diferentes tipos de resveratrol a la concentración de 50 μ M, comparadas con el control. Donde se observa una disminución de células teñidas con los tres compuestos, notándose un decremento mayor para el resveratrol estándar de Sigma (B) y el resveratrol extraído de las muestras de mosto (D).

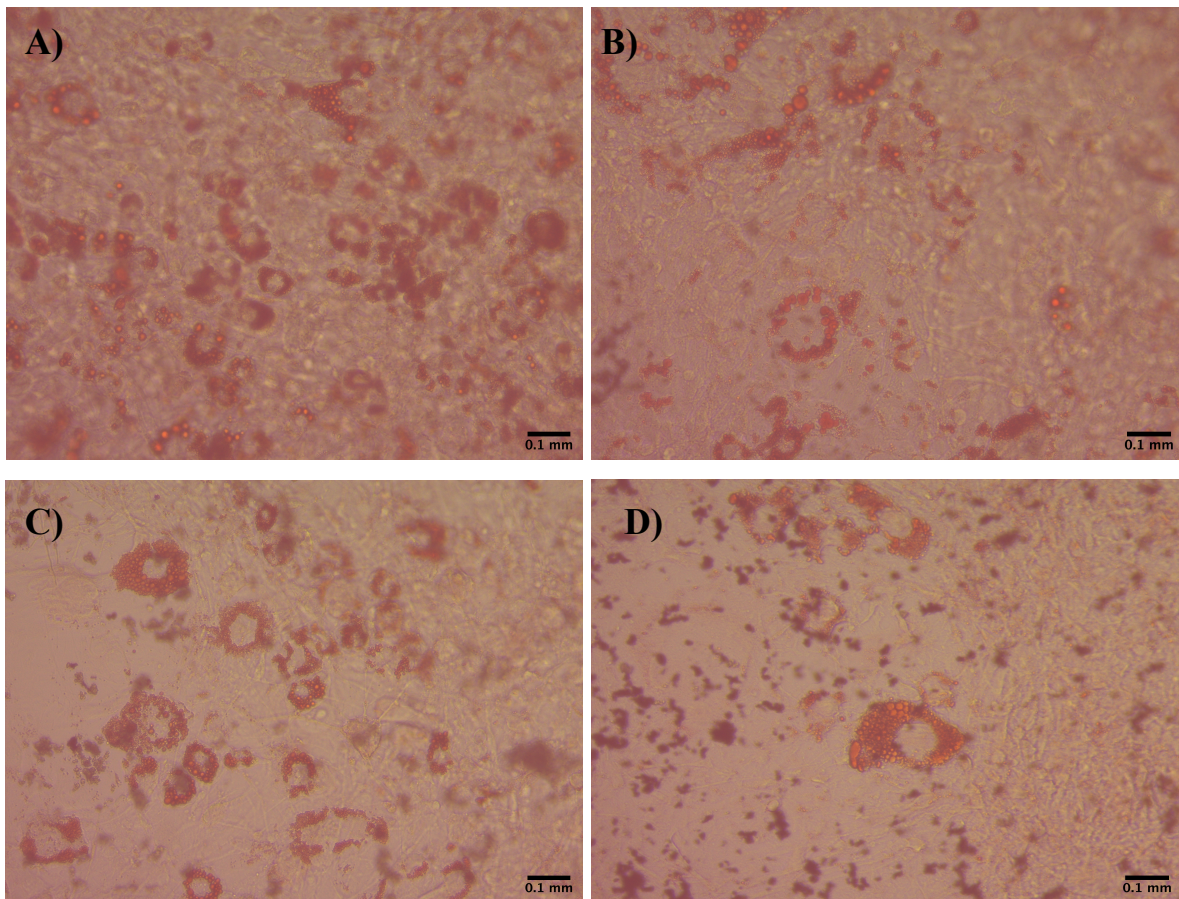


Figura 14. Acumulación de lípidos en células 3T3-L1 con tratamientos de resveratrol. Efecto de 50 mM de resveratrol en la acumulación de lípidos en los adipocitos. Se trataron con los diferentes tipos de resveratrol: B) resveratrol estándar C) resveratrol comercial D) resveratrol extraído y purificado en comparación con el control A). Los adipocitos 3T3-L1 diferenciados se establecieron por inducción durante 10 días. Los adipocitos fueron detectados por tinción con aceite rojo oleoso. El aumento del microscopio para observación fue 50X.

En la Tabla 4 se muestran las comparaciones de rendimientos de extracción de resveratrol en estudios realizados por diferentes autores y nuestro trabajo. Así como la comparación de los distintos métodos de extracción.

Tabla 4 Rendimientos de resveratrol por distintas extracciones

Referencia	Método	Resveratrol (mg/100g muestra seca)	Rendimiento
Geana et al. (2015)	Solventes metanol:acetato de etilo:etanol	1.3	26%-13%
Reis et al. (2016)	Solventes etanol:agua:ácido fórmico	0.1	2%-1%
Pascual- Martí (2001)	Fluidos supercríticos	4.8	96%-48%
En el presente trabajo	Fluidos supercríticos	5.0	99.8%-49.9%

CONCLUSIONES

La extracción por FSC aumenta los rendimientos de resvetatrol (4.99 mg/100g de muestra seca) en comparación con extractos de resveratrol por maceración (1.3 mg/100g de muestra seca).

El resveratrol extraído de materias primas de desecho presentó una alta capacidad antioxidante, así como propiedades anti lipogénicas, al disminuir la acumulación de lípidos en células 3T3-L1.

El costo de producción de la extracción por FSC es menor a la que se lleva a cabo con solventes orgánicos, debido a que el dióxido de carbono se puede reutilizar y de igual forma representar una ventaja para el medio ambiente.

CAPÍTULO 2.

EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ZARZAMORA (*RUBUS SPP.*) POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y MACERACIÓN

OBJETIVOS

General

Extraer el aceite esencial de residuos de zarzamora (*Rubus spp.*) empleando el sistema de fluidos supercríticos y maceración. Caracterizar estos aceites esenciales y probar su acción biológica.

Específicos

- Extraer aceites esenciales por fluidos supercríticos y maceración
- Cuantificar polifenoles totales y flavonoides de las muestras y los aceites esenciales
- Caracterizar los aceites esenciales por GC-MS.
- Probar la actividad antioxidante (DPPH) de los extractos
- Probar acción biológica del aceite esencial de zarzamora en células 3T3-L1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acondicionado de las muestras

Las zarzamoras fueron donadas por la huerta San José ubicada en Los Resyes, Mich. Las zarzamoras contienen un alto porcentaje de humedad por lo cual, una vez recolectadas en las huertas se conservaron a -20 °C y posteriormente se liofilizaron.

Una vez liofilizadas, las muestras fueron molidas hasta obtener un tamaño de partícula homogéneo y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

Cuantificación de fenoles totales y flavonoides

Para la cuantificación de fenoles totales se utilizaron 10 g de muestra previamente acondicionada; y se extrajeron con 100 ml de etanol absoluto, sonicando por 15 min y dejando la extracción por 24 h en oscuridad a temperatura ambiente. Se mezclaron 10 µl de extracto adecuadamente diluido o una solución estándar de concentraciones variables con 50 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu siguiendo el método de (Lin y Tang, 2007) con ligeras modificaciones. El agua desionizada se utilizó para la dilución y control. La solución se diluyó hasta un volumen total de 850 µl y se mezcló a fondo. Después de la incubación durante 10 min a temperatura ambiente, se añadió inmediatamente 150 µl de una solución de Na₂CO₃ al 20% y luego se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 765 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ 51119200). Se usó ácido gálico (AG) a una concentración de 10 mg/ml como estándar, Se realizó una curva de calibración con AG a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500 600 y 700 µg/ml ($R^2=0.990$); los compuestos fenólicos totales de las muestras se expresaron en mg GAE/10g de muestra. Estos análisis se llevaron a cabo por triplicado.

Para la cuantificación de flavonoides se mezclaron 100 µl de extracto con 650 µl de agua desionizada que se utilizó para la dilución y control siguiendo el método de (Lin y Tang, 2007) con ligeras modificaciones. La solución se diluyó hasta un volumen total de 750 µl y se mezcló a fondo. Después se añadieron

inmediatamente 750 µl de una solución de AlCl₃ al 2% y luego se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 430 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ 51119200). Se usó quercetina (QE) a una concentración de 10 mg/ml como estándar realizando una curva de calibración con QE a concentraciones de 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 µg/ml ($R^2=0.988$); los flavonoides totales de las muestras se expresaron en mg de QE/ 10g de muestra. Estos análisis se llevaron a cabo por triplicado.

Extracción de aceites esenciales por fluidos supercríticos

Para la extracción por fluidos supercríticos (Waters Bio-Botanical Extraction System), los parámetros fueron temperatura de 40 °C, el tiempo de extracción de 40 min y etanol empleado como co-solvente (7%). El etanol se seleccionó como modificador debido a su baja toxicidad contra el metanol, además, el etanol es un disolvente polar permitido en la industria alimentaria, acidificado con ácido acético al 0.2%. La presión se mantuvo constante en 200 bar. La muestra seca (100 g), se mantuvo en el recipiente de extracción. Los caudales de CO₂ y el modificador se fijaron en 20 g/min, el extracto obtenido se recolectó y se midió el volumen extraído. El extracto se almacenó a -20 °C hasta su uso.

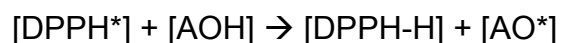
Análisis de los extractos por GC-MS

El etanol presente en la muestra se evaporó en Eppendorf Vacufuge plus y la muestra se derivatizó añadiendo 50 µl de piridina y 50 µl de BSTFA e incubando a 37 °C por 30 min (Ragab et al., 2006). El análisis GC-MS se realizó en el equipo Agilent Technologies 5977E MSD con una temperatura de inyección de 250 °C con una relación de división de 1:10. Cada muestra (1 µl) se inyectó en una columna (HP-5MS 250 µm x 0.25 µm × 30 m con una columna marca Agilent Technologies con un flujo de helio de 1 ml/min a 14.5 psi de presión. La temperatura de la columna se mantuvo inicialmente a 100 °C durante 1 min, seguido de un gradiente de temperatura de 20 °C/min, produciendo una temperatura máxima de 300 °C, que se mantuvo durante 1 min. La interfaz se ajustó a 300°C y la fuente de iones se ajustó a 230 °C. Los datos se adquirieron

en el modo de impacto electrónico (EI) a 70 eV con un rango de exploración de 50-500 (m/z).

Actividad de captación de radicales DPPH

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas una preferencial atención es la técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH. Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante.



Las actividades antioxidantes de los extractos de zarzamora se determinaron mediante el ensayo de captación de radicales libres 2,2-difenil-1-picrililhidracilo (DPPH) siguiendo el método de (Kim, 2018) con ligeras modificaciones. Se mezclaron 180 µl de solución etanólica DPPH 0.2 mM y se hicieron reaccionar con 12 µl de las muestras [3 mg/ml], Trolox (de 10 diluciones en serie diferentes, 100-1000 µM) y DPPH con etanol (blanco) por separado. Se incubaron en placa de 96 micropocillos durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. Luego, el valor de absorbancia para cada mezcla se leyó a 517 nm después de la incubación. La capacidad antioxidante de equivalencia de Trolox (TEAC) de cada muestra se calculó utilizando la ecuación y se expresó como µM Trolox equivalente/mg de muestra (µM TEAC/mg de muestra).

Viabilidad y diferenciación celular

Línea celular. Se utilizó la línea celular de fibroblastos (preadipocitos) de ratón 3T3-L1 proveniente de la colección de cultivo tipo americano (ATCC - CL113).

Cultivo celular. Se realizó el cultivo de líneas celulares 3T3-L1 (preadipocitos de ratón) en Medio Dulbeco Modificado (DMEM), Suero Bovino Fetal (FBS) al 10% y Penicilina/Estreptomicina al 1%; se incuban durante 48 horas a una temperatura de 37° C, atmósfera con 95% de aire y 5% de CO₂, formándose una monocapa.

Posteriormente, se realizaron subcultivos mediante una digestión enzimática con tripsina 10% durante 10 minutos en incubadora de CO₂ y se sembraron 3 cajas de cultivo celular por unas 48 h para formar nuevamente una monocapa de células hasta alcanzar dos días postconfluencia.

Viabilidad celular. Una vez que las células alcanzan el 70-80% de confluencia, se recolectaron con tripsinación, se contaron en cámara de Neubauer y se cultivaron en placas de 96 pozos (5x10³ células/pozo) con medio de expansión por 7 días hasta alcanzar 100% de confluencia para posteriormente aplicar los tratamientos como se muestra a continuación:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Zf1	Zf1	Zf1	Zm1	Zm1	Zm1	Ctrl	Ctrl	Ctrl			
B	Zf2	Zf2	Zf2	Zm2	Zm2	Zm2	C+V	C+V	C+V			
C	Zf3	Zf3	Zf3	Zm3	Zm3	Zm3						
D	Zf4	Zf4	Zf4	Zm4	Zm4	Zm4						
E	Zf5	Zf5	Zf5	Zm5	Zm5	Zm5						
F	Zf6	Zf6	Zf6	Zm6	Zm6	Zm6						
G	Zf7	Zf7	Zf7	Zm7	Zm7	Zm7						
H	Zf8	Zf8	Zf8	Zm8	Zm8	Zm8						

Ctrl= Control (medio DMEM completo)

C+V= Control + Vehículo (medio DMEM completo+ PBS)

Zf= Extracto de zarzamora por FSC

Zm= Extracto de zarzamora por maceración

1-8=Concentraciones de la solución de aceite esencial y PBS

1=1; 2= 5,; 3=10; 4=120; 5=250; 6=500, 7=750 µg/ml y 8=1 mg/ml

En relación a la cantidad de fenoles totales cuantificados. Teniendo un solución stock de 10mg/ml para ambos extractos.

24 h después de aplicar los tratamientos se retiraron 100 µl de medio y se agregaron 10 µl del reactivo 1 del kit de proliferación MTT, se incubaron por 4h y posteriormente se agregaron 100 µl del reactivo 2 y se dejaron incubando toda la

noche. Al día siguiente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a longitudes de onda de 580 y 670 nm. Esto se realizó a las 24, 48, 72 y 96 h.

Diferenciación celular.

Cuando las células cultivadas alcanzaron una confluencia del 70-80%, se recolectaron las células mediante tripsinización. Las células se sembraron en cajas de 24 pozos con el medio de expansión de preadipocitos (medio DMEM+ 1% antibiótico + 10% suero de ternera). Se dejaron crecer durante 48 horas, o hasta que el cultivo alcanzara el 100% de confluencia, se retiró el medio de crecimiento de cada pocillo y se agregó un volumen idéntico del medio de diferenciación (medio DMEM+ 1% antibiótico + 10% suero de ternera + 1 µg/ml insulina + 0.5mM Metilisobutilxantina (IBMX) + 1 µM Dexametasona), se incubaron en medio de diferenciación durante 48 h y después de 48 h, se reemplazó el medio de diferenciación con medio de mantenimiento de adipocitos (medio DMEM+ 1% antibiótico + 10% suero de ternera + 1 µg/ml insulina). El medio de mantenimiento de adipocitos se reemplazó cada 48 h.

Las células se diferenciaron completamente a los 14 días después de la inducción, como lo demuestra la observación de la formación de gotas de lípidos. Las células se tiñen con rojo oleoso y se mide la absorbancia a 510 nm. Los tratamientos se añadieron durante todo el proceso de diferenciación y una vez finalizada la diferenciación. Se evaluó la diferencia entre los extractos de zarzamora por maceración y por fluidos supercríticos; a tres concentraciones diferentes 10, 250 y 500 µg/ml.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de fenoles totales y flavonoides

Los frutos rojos son una fuente rica de fitoquímicos, en particular antocianinas y flavonoides (Beattie et al., 2005).

En la Tabla 5 se muestra el promedio de fenoles totales y flavonoides de la zarzamora. los cuales pueden ser caracterizables y extraíbles para evaluar su actividad nutracéutica. reportan valores de 8.22 mg eqAG/g de zarzamora fresca.

Tabla 5. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides en extractos de zarzamora

Muestra	Fenoles Totales*	Flavonoides**
Extracto Maceración	131 ± 0.07	9 ± 0.01
Extracto FSC	185 ± 0.09	11 ± 0.04

*mg eq AG/g de muestra seca

**mg eq QE/g de muestra seca

Los estudios sobre zarzamoras revelan que su composición y concentración fenólica están influenciadas por muchos factores, incluyendo la variedad, la ubicación del cultivo y la maduración (Kaume *et al.*, 2012).

La densidad del CO₂ aumenta con la presión y disminuye con la temperatura, y el poder de solvatación del CO₂ aumenta con la densidad. Así, a densidades más altas, se podrían haber extraído otros compuestos, dando como resultado una ligera reducción de la concentración de fenólicos en los extractos (Pasquel Reátegui *et al.*, 2014)

Análisis de extractos por GC-MS

En la **Tabla 6** se muestran los principales compuestos fenólicos encontrados en el aceite esencial extraído por FSC.

Tabla 6. Compuestos fenólicos presentes en el extracto de zarzamora

Nombre del Compuesto	Tiempo retención (min)	Identidad (%)
Mirtenol	8.6437	29
Farnesol	11.2492	78
Vainillina	11.5818	70
Resveratrol	11.5818	70
L-Ácido ascórbico	8.5865	22
Alfa-Ocimeno	8.5352	29
Alfa-Santalol	9.057	18
Vitamina E	11.8784	8.2
Ácido salicílico	10.0374	71

En la **Figura 17** podemos observar una comparación de los cromatogramas obtenidos de la cromatografía de gases; donde podemos notar que en la extracción por FSC (cromatograma azul) se obtienen en mayor abundancia los compuestos fenólicos además de extraer más que en el extracto por maceración. Esto se debe a que el CO₂ en estado crítico compartiendo la viscosidad de un líquido y la difusividad de un gas, es capaz de extraer mayor cantidad de compuestos y también de concentrarlos. Por lo que se convierte en una tecnología con rendimientos altos que fácilmente recupera el costo de inversión del equipo; teniendo así aceites esenciales grado alimenticio, pues los solventes como el etanol se pueden evaporar a temperatura ambiente.

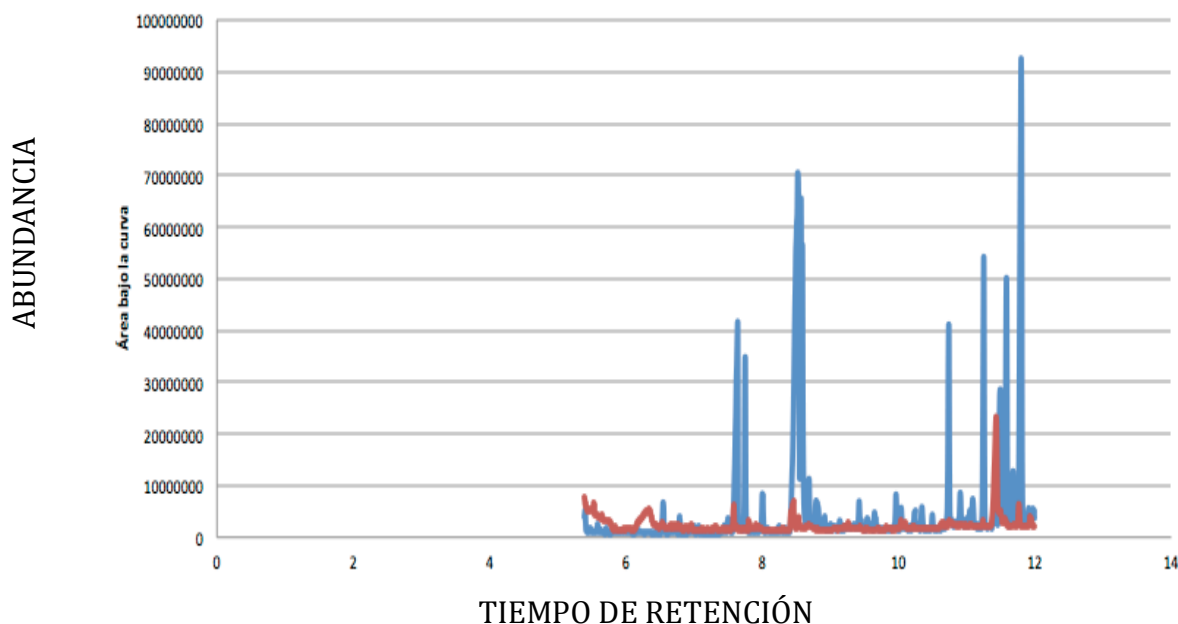


Figura 15. Cromatogramas obtenidos por GC-MS de los aceites esenciales de zarzamora. En la línea azul se muestra el cromatograma del extracto por FSC y la línea roja el cromatograma del extracto por maceración.

Actividad de captación de radicales DPPH

Ambos extractos son ricos en compuestos fenólicos que tienen actividad antioxidante, es decir que son capaces de captar el radical libre DPPH. En la **Figura 18** podemos observar que el extracto obtenido por FSC presenta una actividad antioxidante mayor al extracto obtenido por maceración. Estudios previos sobre la zarzamora y su actividad antioxidante realizados por (Pasquel Reátegui *et al.*, 2014) reportan valores de 70-96 μM TEAC/g de muestra. (Manrriquez-Torres *et al.*, 2016) trabajaron con el jugo de zarzamora y reportan valores de 1146-2655 μM TEAC/L de jugo. Estos extractos contienen compuestos fenólicos, entre los que se encuentran flavonoides, estilbenos y terpenos que son responsables de otorgarle la capacidad antioxidante; distintos análisis deben realizarse para determinar si es un solo compuesto el que brinda la capacidad antioxidante o la sinergia de los mismos.

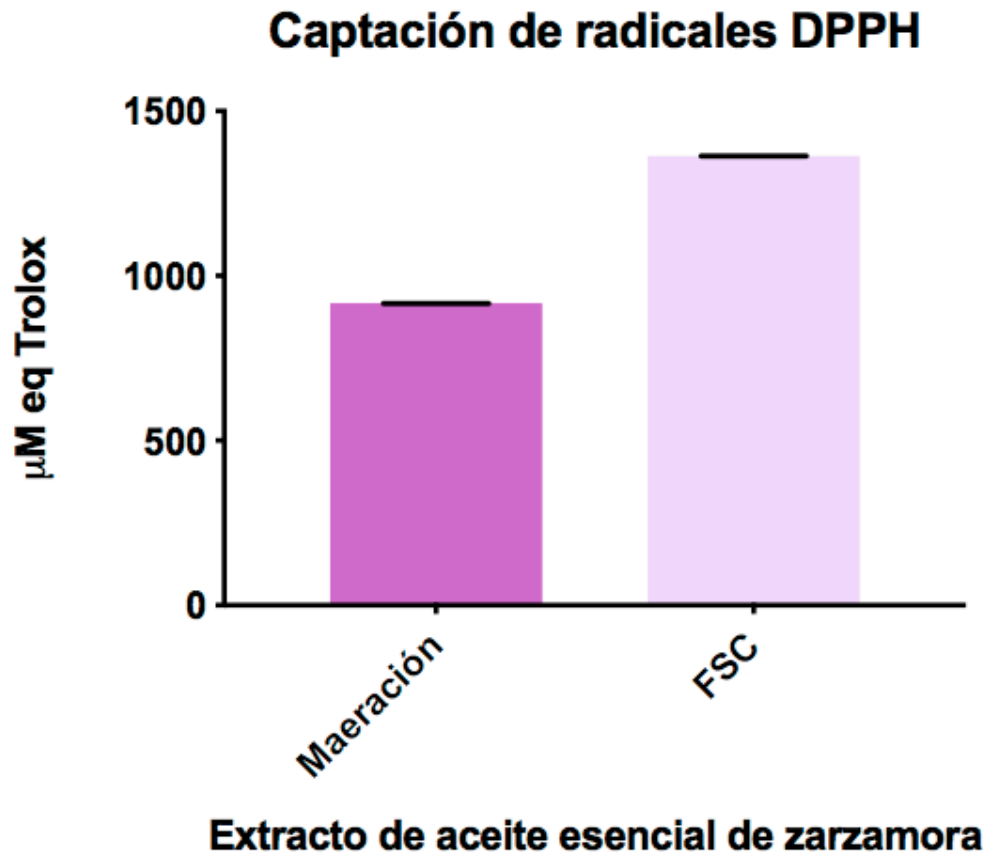


Figura 16. Actividad antioxidante del aceite esencial de zarzamora. Actividad antioxidante del aceite esencial de zarzamora con distintos métodos de extracción.

Cultivo de células 3T3 y experimento de viabilidad

El porcentaje de células viables en cada pocillo se calculó en relación con las células de control establecidas al 100%. Las respuestas de citotoxicidad se clasificaron como graves (30%), moderadas (30-60%), leves (60-90%) o no citotóxicas (> 90%) (Silva *et al.*, 2013).

En la Figura 19 que se muestra a continuación podemos observar la citotoxicidad de los compuestos probados (extracto de zarzamora por FSC y extracto de zarzamora por maceración).

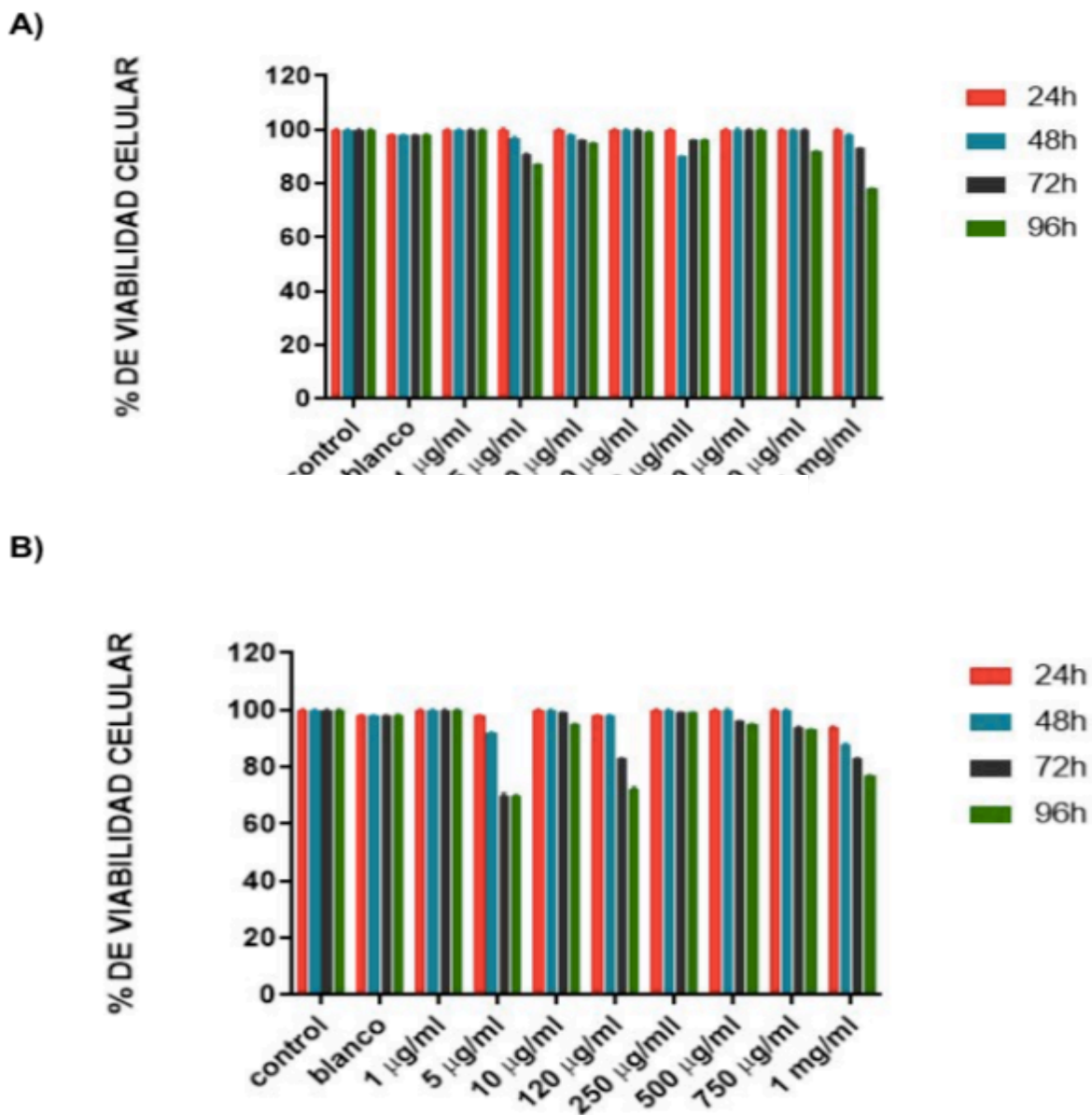


Figura 17. Citotoxicidad de células 3T3-L1 con tratamiento de aceite esencial de zarzamora. Citotoxicidad de células 3T3-L1 con distintas concentraciones de aceite esencial de zarzamora. A) Aceite extraído por Fluidos Supercríticos, B) aceite extraído por maceración.

En cuanto al extracto de zarzamora por FSC solo la concentración de 5 mg/ml presenta una citotoxicidad leve a las 96 h. Para el extracto por maceración, las concentraciones de 5 y 120 µg/ml las células presentan una citotoxicidad

moderada y en la concentración de 100 una citotoxicidad leve. Después de observar la viabilidad celular con las diferentes concentraciones de extractos se decidió utilizar 3 de estas (10, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$) para llevar a cabo el experimento de diferenciación celular y observar si estos compuestos tienen un efecto antilipogénico probando su acción en células 3T3-L1.

Diferenciación de células 3T3-L1

Los extractos de mora también han ejercido efectos antimutagénicos *in vitro* e *in vivo* modificando las vías de señalización celular y suprimiendo los factores de promoción tumoral. Sin embargo, las propiedades antiobesidad, antidiabéticas, antimicrobianas y antiinflamatorias de los compuestos fenólicos de mora necesitan investigación (Kaume, Howard y Devareddy, 2012). En la Figura 20 podemos observar el efecto antilipogénico de los extractos de zarzamora por maceración y FSC. Aplicando los tratamientos durante el proceso de diferenciación la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ presenta el mayor efecto (C). Para el caso de los tratamientos aplicados una vez alcanzada la diferenciación los efectos son menores para las tres concentraciones probadas (D-F).

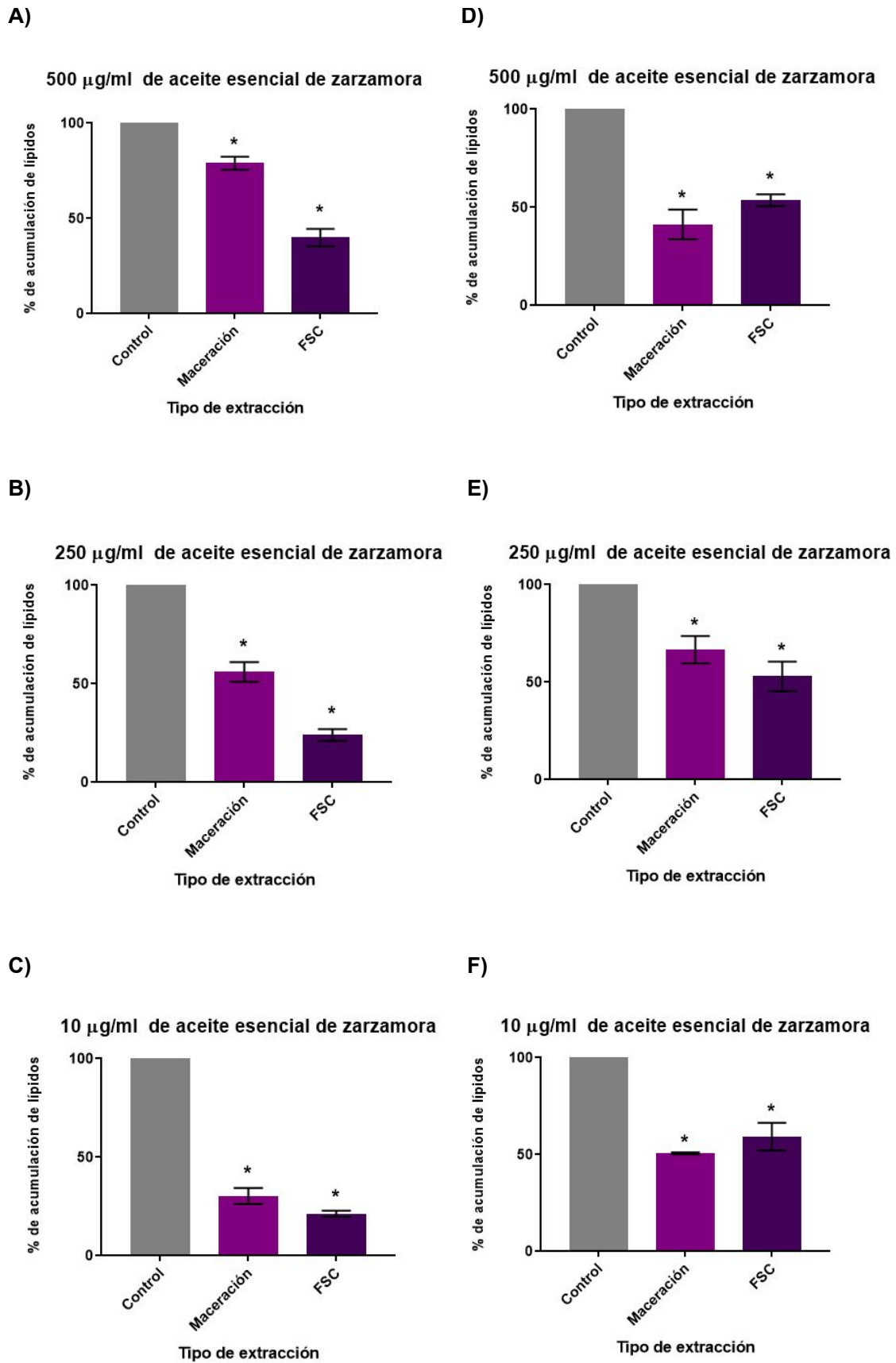


Figura 20. Acumulación de lípidos en células 3T3-L1 con tratamientos de aceite esencial de zarzamora. La densidad de absorbancia del colorante rojo oleoso extraído de adipocitos diferenciados con los tratamientos de extracto de zarzamora aplicados durante el proceso de diferenciación (A-C) y aplicados terminando la diferenciación (D-F). Los resultados se expresan como media \pm SD de tres experimentos separados.

Para los tratamientos añadidos durante el proceso de diferenciación la extracción por FSC presenta un efecto mayor a la extracción por maceración, esto puede deberse a la mayor cantidad y concentración de compuestos fenólicos que logran extraerse por esta tecnología.

En la Figura 21 podemos observar el efecto de los extractos de zarzamoras comparado con el control (A), el extracto por FSC presenta menor acumulación de lípidos, al observarse una menor coloración rojiza.

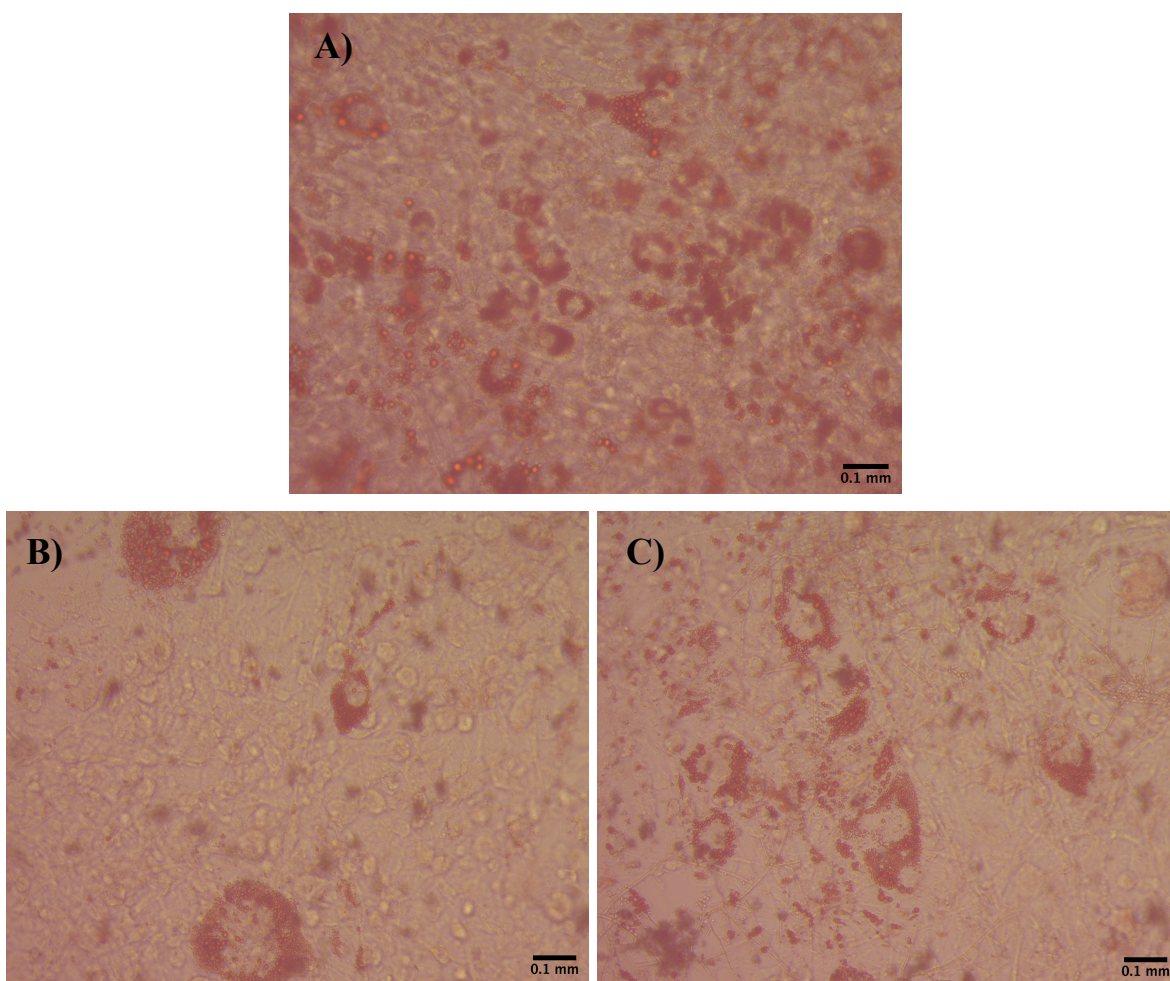


Figura 18 Acumulación de lípidos en células 3T3-L1 con tratamientos de aceite esencial de zarzamora. Efecto de los extractos de zarzamora en la acumulación de lípidos en los adipocitos. Extracto de zarzamora por FSC (B) y extracto de zarzamora por maceración (C) en comparación con el control (A). Las concentraciones fueron 10, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Los adipocitos 3T3-L1 diferenciados se establecieron por inducción durante 10 días. Los adipocitos fueron detectados por tinción con aceite rojo oleoso. Objetivo 50X.

En términos de beneficios para la salud, estos compuestos fenólicos han mostrado efectos protectores en enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad y pérdida ósea *in vivo* e inhiben la LDL y la oxidación liposomal *in vitro*. Los extractos de zarzamora también han ejercido efectos antimutagénicos al modificar las vías de señalización celular y suprimir los factores de promoción de tumores *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, es necesario investigar las propiedades antiobesidad, antidiabéticos, antimicrobianos y antiinflamatorios de los compuestos fenólicos de zarzamora (Kaume et al., 2012).

CONCLUSIONES

Los aceites esenciales de residuos de zarzamora de baja calidad, extraídos por FSC y maceración contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos que le otorgan valor agregado como una nueva materia prima. Analizando los dos extractos, se observó que el aceite esencial extraído por tecnología emergente como lo son los FSC, presenta una actividad antioxidante más alta, así como una menor acumulación de lípidos en células 3T3-L1, comparado con el aceite extraído por maceración.

Es de suma importancia continuar estudios del extracto para caracterizarlo y de igual forma comprobar cuál de los compuestos fenólicos presentes tiene propiedades nutricionales o si es la sinergia de los compuestos y de esta manera sea comercializable.

BIBLIOGRAFÍA

- Ávalos, A. y Elena, G. (2009) 'Metabolismo secundario de plantas', *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), pp. 119–145.
- Bakkali, F. y Idaomar, M. (2008) 'Biological effects of essential oils – A review', *Elsevier*, 46, pp. 446–475.
- Bandar, H., Hijazi, A., Ramma, I. H., Hachem, A., Saad, Z. y Badran, B. (2013) 'Techniques for the Extraction of Bioactive Compounds from Lebanese *Urtica dioica*', *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 1(6), pp. 507–513.
- Beattie, J., Crozier, A. y Duthie, G. (2005) 'Potential Health Benefits of Berries', *Current Nutrition & Food Science*, 1(1), pp. 71–86.
- Bennett, R. y Wallsgrove, R. (1994) 'Secondary metabolites in plant defence mechanisms', *New Phytologist*, 127(4), pp. 617–633.
- Casas, E., Faraldi, M. y Bildstein, M. (2008) 'Manual de compuestos bioactivo a partir de residuos del procesado de la uva', *Bioactive-Net*, pp. 1–48.
- Celis, L. G., Roza, C. y Garay, J. (2008) 'Efecto lipolítico del Resveratrol en células 3T3-L1 Lipolitic effect of Resveratrol in cells 3T3-L1'. *Salud Uninorte*, 24(2), pp. 165–171.
- Cuzzola, F., Ciurleo, R., Giacoppo S., Marino, S. y Bramanti, P. (2011) 'Role of resveratrol and its analogues in the treatment of neurodegenerative diseases: focus on recent discoveries.', *CNS & neurological disorders drug targets*, 10(7), pp. 849–62.
- Dixon, R. A. y Paiva, N. L. (1995) 'Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism', *The Plant Cell*, 7(7), p. 1085.
- Domínguez, L. (1978) 'Tecnologías para la industria alimentaria fluidos supercríticos', *Alimentos Argentinos*, pp. 1–12.
- Gambini, J., López, R., Olaso, G., Inglés, M., Abdelazid, K., Alami, M., Bonet V., Borrás C. y Viña, J. (2013) 'Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas', *Revista Española de Geriátría y Gerontología*, 48(2), pp. 79–88.

Guo, S., Liao, H. y Liu J. (2018) 'Resveratrol Activated Sonic Hedgehog Signaling to Enhance Viability of NIH3T3 Cells *in vitro* via Regulation of Sirt1', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 50(4), pp. 1346–1360.

Hincapié Avila, S. (2013) *Extracción de cafeína del café (Coffea arabica) por fluidos súper críticos*. Trabajo para obtener el título de Ingeniero de alimentos. Corporación Universitaria Lasallista. Antioquía

Hsieh, T. y Wu, J. M. (1999) 'Differential Effects on Growth, Cell Cycle Arrest, and Induction of Apoptosis by Resveratrol in Human Prostate Cancer Cell Lines', *Experimental Cell Research*, 249(1), pp. 109–115.

Kaume, L., Howard, L. R. y Devareddy, L. (2012) 'The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), pp. 5716–5727.

Kim, H. M. (1999) 'Action of Resveratrol', *Plant Med.*, 65, pp. 268–270.

Kim, J.-S. (2018) 'Antioxidant Activities of Selected Berries and Their Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acid Contents', *Preventive Nutrition and Food Science*, 23(1), pp. 35–45.

Manríquez, J., Sánchez, J., Ramírez, J., Cruz, N., Ariza, J. y Torres, J. (2016) 'Effect of Thermoultrasound on the Antioxidant Compounds and Fatty Acid Profile of Blackberry (*Rubus fruticosus* spp.) Juice', *Molecules*, 21(12), p. 1624.

Martínez, N., Camacho, M. y Martínez, J. (2008) 'Actividad Dietética Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud', *Actividad Dietética*. Elsevier, 12(2), pp. 64–68.

Parhi, R. y Suresh, P. (2013) 'SUPERCRITICAL FLUID TECHNOLOGY: A REVIEW', *Journal of Advanced Pharmaceutical Science And Technology*. Edited by R. Ghan, 1(1), pp. 13–36.

Pasquel, J., Da Fonseca, A., Barbero, G. Rezende, C. y Martínez, J. (2014) 'Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound', *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, pp. 223–233.

Pengelly, A. (2004) 'The Constituents of Medicinal Plants (2nd Edn)', Chapter 2: Phenols, Ed. Allen & Unwin p. 15.

- Pérez, J. (2014) 'Proyecto Fin de Grado Terminado: Estudio de la capacidad antioxidante de los polifenoles del vino y sus aplicaciones biológico-preventivas, Universidad Europea'.
- Pinelo, M., Ruiz, A., Sineiro, J., Señoráns, F., Reglero, G. y Núñez, M. (2007) 'Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study', *European Food Research and Technology*, 226(1-2), pp. 199-205.
- Da Porto, C., Natolino, A. y Decorti, D. (2014) 'Extraction of proanthocyanidins from grape marc by supercritical fluid extraction using CO₂ as solvent and ethanol-water mixture as co-solvent', *The Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier B.V., 87(September 2012), pp. 59-64.
- Ragab, A., Van Fleet, J., Jankowski, B., Park, J. y Bobzin, S. (2006) 'Detection and Quantitation of Resveratrol in Tomato Fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.)'. *J. Agric. Food Chem*, pp. 7175-7179.
- Rayalam, S., Yang, J., Ambati, S., Della, M. y Baile, C. (2008) 'Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes', *Phytotherapy Research*, 22(10), pp. 1367-1371.
- Rodríguez, R., Romero, R., Chacón, J., Martínez, J. y García, E. (2006) 'Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate', *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), pp. 687-693.
- Seigler, D. S. (1998) 'Shikimic Acid Pathway', in *Chemistry of Plant Natural Products*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 625-678.
- Silva, E., Rosa, T., Herrera, D., Jacinto, R., Gomes, B y Zaia, A. (2013) 'Evaluation of Cytotoxicity and Physicochemical Properties of Calcium Silicate-based Endodontic Sealer MTA Fillapex', *Journal of Endodontics*, 39(2), pp. 274-277.
- da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P. y Duarte, A. C. (2016) 'Supercritical fluid extraction of bioactive compounds', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, pp. 40-51.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D. y Agati, G. (2004) 'Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress', *New Phytologist*, 163(3),

pp. 547–561.

Trejo, M., Vargas, M., Sánchez, M., Lara, A., Pascual, S., Granados, L. y Villavicencio, A. (2015) 'Redalyc.Extracción de compuestos bioactivos de plantas del desierto mexicano para su aplicación en envases activos para zarzamora'. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1) pp. 101-107.

Tseng, P., Mou, S., Jien, R., Wen, H., Fen, C., Liang, M., y Luh, M. (2011) 'Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis', *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(10), pp. 2552–2563.

del Valle, J. M., Mena, C. y Budinich, M. (2008) 'Extraction of garlic with supercritical CO₂ and conventional organic solvents', *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25(3), pp. 532–542.

Walker, J. M. (2005) *Natural Products Isolation*. "Extraction of plant secondary metabolites", Second Edi. Edited by S. D. Sarker, Z. Latif, and A. I. Gray. New Jersey: Humana Press, pp. 323-353.

Yang, J., Della, M., Rayalam, S., Hartzell, D., Park, H. y Baile, C. (2008) 'Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin', *Life Sciences*, 82(19–20), pp. 1032–1039.