

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ**

ESCUELA DE POSGRADO DE QUÍMICA



**“DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS, COMPUESTOS  
FENÓLICOS Y EFECTO GASTROPROTECTOR DE SEMILLAS  
DE UVA (*Vitis vinífera*) VARIEDAD MALBEC, SUB PRODUCTO  
DE LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA, ICA-PERÚ”**

Tesis para optar el Grado de Magíster en Química

Presenta:

**MIKI GONZALES USCAMAYTA**

Dirigido por:

**Dra. JUANA ROSA MARÍA ROBLES CAYCHO**

Lima, 2018

## RESUMEN

La uva (*Vitis vinífera*) es uno de los cultivos de gran importancia y mayor envergadura a nivel mundial para la industria vitivinícola. Su uso en la elaboración del vino y productos derivados en el Perú es una actividad a gran escala y como consecuencia surgen los subproductos, como la semilla, con altos contenidos de compuestos fenólicos y aceite.

En el presente trabajo se determina el perfil y contenido de compuestos fenólicos, mediante las técnicas UHPLC-ESI-MS/MS y UV-Vis; el contenido de aceite, mediante técnicas de extracción tradicional y CO<sub>2</sub> supercrítico; la composición de ácidos grasos mediante GC y, la evaluación del efecto gastroprotector in vivo del extracto de semillas de uva, que evidencia que conserva alto contenido de compuestos bioactivos, los cuales son responsables de diferentes actividades farmacológicas, que pueden ser aprovechados de mejor manera y así darle un valor agregado.

Entre los resultados se observa un alto contenido de aceite (extraído con Soxhlet) en semillas de uva con un valor máximo de 14 % con Soxhlet y un valor máximo de 25 % de ácidos grasos, compuesto principalmente de ácido linoleico (71 %). De la misma forma se identifican 27 compuestos fenólicos, donde los flavan-3-oles y procianidinas son los componentes mayoritarios, el alto contenido de fenólicos se corrobora con el método de Folin Ciocalteu, que alcanza un valor de 40,3 mg de ácido galico por g de semilla. Finalmente, los extractos alcohólicos de semillas de uva presentan efecto gastroprotector frente a la úlcera gástrica inducida por Naproxeno, el análisis estadístico sugiere que el tratamiento Ext. MeOH a una dosis de 600 mg/kg, posee un mayor efecto de entre todos los tratamientos aplicados, con un valor de inhibición de 80 % comparable con la Ranitidina. Estos resultados demuestran que la semilla, residuo de la industria vitivinícola, es fuente importante de compuestos bioactivos, moléculas con importantes aplicaciones.

**Palabras clave:** *Vitis Vinífera*, residuos de la industria vitivinícola, UHPLC-MS/MS y efecto gastroprotector.

## ABSTRAC

*Vitis vinifera* is one of the most important crops worldwide for the wine industry. Its use in the elaboration of wine and derived products in Peru is a large-scale activity and as a consequence, by-products arise, such as seed, with high contents of phenolic compounds and oil.

In the present work, the profile and content of phenolic compounds were determined by means of the UHPLC-ESI-MS / MS and UV-Vis techniques; oil content, using traditional extraction techniques and supercritical CO<sub>2</sub>; the formulation of fatty acids by GC and, the evaluation of the gastroprotective effect in vivo of the grape seed extract, which shows that it conserves the bioactive compounds content, those that are responsible for the different pharmacological activities, that can be exploited in a better way and so give it an added value.

Among the results, a high content of oil in grape seeds is observed with a maximum value of 14%, fatty acid with a maximum value of 25%, composed mainly of linoleic acid (71%). In the same way, 27 phenolic compounds are identified, where the flavan-3-ols and procyanidins are the major components, the high content of phenolic is corroborated with the Folin Ciocalteu method, which reaches a value of 40.3 mg of gallic acid per g of seed. Finally, the alcoholic extracts of grape seeds have a gastroprotective effect against gastric ulcer induced by Naproxen, the statistical analysis suggests that the treatment MeOH extract at a dose of 600 mg/kg, has a greater effect of all treatments applied, with an inhibition value of 80% compared with Ranitidine. These results show that the seed, the residue of the wine industry, is an important source of bioactive compounds, molecules with important applications.

**Keywords:** *Vitis Vinifera*, residues from the wine industry, UHPLC-MS/MS and gastroprotective effect.

## AGRADECIMIENTOS

A **CIENCIA ACTIVA** de **CONCYTEC**, Convenio 231-2015 FONDECYT, por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de maestría.

A la **PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL PERÚ** por darme la oportunidad de estudiar y desarrollar mis aptitudes profesionales apropiadamente.

A mi directora de tesis, **Dra. Juana Rosa María Robles Caycho** por todo el esfuerzo y dedicación, quien con su experiencia y motivación ha logrado en mí la conclusión satisfactoria de mi tesis.

Al **Dr. Jorge Bórquez Ramírez** y Rubén Muñoz Miranda por su colaboración en la parte analítica del desarrollo de mi tesis.

A la **Dra. Juana Elvira Chavez Flores** (Universidad Norbert Wiener) por su colaboración y compromiso con la parte de experimentación biológica de mi tesis y brindarme las facilidades del uso de su Laboratorio.

A **Moraima Molina Saenz** por su colaboración y orientación en la parte analítica del desarrollo de mi tesis.

A mi **familia**, en especial a mi madre por haber inculcado en mí buenos valores e incentivar mis ganas de querer ser mejor cada día.

Finalmente agradecer a mis amigos y compañeros de estudio, en especial a Miguel y Erika por sus consejos y hacer grata mi estadía en esta casa de estudios.

Son muchas las personas que forman parte de mi vida profesional a quienes debo mi gratitud por todo el apoyo brindado en todo momento.



### **Dedicatoria**

A mis familiares.

A mi tía Mary por ser un ejemplo de perseverancia y haber confiado en mis capacidades; a mi madre Victoria, por haber sido el soporte emocional e inspiración para ser mejor y a mis hermanos por ser participantes indirectamente en la elaboración de esta tesis.

¡Gracias a ustedes!

A mis profesores por ser el pilar fundamental durante toda mi formación profesional y por ser los responsables de cultivar en mí el interés por la investigación.

## CONTENIDO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....                            | 2         |
| 1.2. OBJETIVOS.....   | 5         |
| 1.2.1. <i>General:</i> .....  | 5         |
| 1.2.2. <i>Específicos:</i> .....  | 5         |
| <b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>  | <b>6</b>  |
| 2.1. COMPUESTOS FENÓLICOS.....  | 6         |
| 2.1.1. <i>Estructura de los compuestos fenólicos</i> .....                        | 6         |
| 2.1.2. <i>Fuentes naturales de compuestos fenólicos</i> .....                     | 8         |
| 2.1.3. <i>Subproductos agroindustriales, fuente de compuestos fenólicos</i> ..... | 9         |
| 2.1.4. <i>Actividad biológica</i> .....   | 9         |
| 2.2. FLAVONOIDES .....  | 10        |
| 2.2.1. <i>Biosíntesis</i> .....   | 11        |
| 2.2.2. <i>Clasificación y distribución</i> .....                                  | 13        |
| 2.2.3. <i>Flavonoides en los alimentos</i> .....                                  | 20        |
| 2.2.4. <i>Farmacocinética de flavonoides</i> .....                                | 22        |
| 2.3. ÁCIDOS GRASOS .....  | 25        |
| 2.3.1. <i>Tipos de ácidos grasos</i> .....  | 26        |
| 2.3.2. <i>Importancia biológica y efectos en la salud humana</i> .....            | 28        |
| 2.4. LA UVA .....   | 29        |
| 2.4.1. <i>Composición fenólica de la uva</i> .....                                | 31        |
| 2.4.2. <i>Residuos de la uva</i> .....  | 32        |
| 2.4.3. <i>Caracterización analítica de los compuestos fenólicos</i> .....         | 33        |
| 2.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....   | 33        |
| 2.5.1. <i>Métodos cuantitativos de determinación</i> .....                        | 33        |
| 2.6. ENFERMEDADES DEL ESTÓMAGO .....  | 35        |
| 2.6.1. <i>GASTRITIS</i> .....   | 35        |
| 2.6.2. <i>Úlcera péptica (UP)</i> .....   | 37        |
| <b>3. METODOLOGÍA .....</b>   | <b>43</b> |
| 3.1. REACTIVOS Y EQUIPOS.....   | 43        |
| 3.2. ORIGEN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA .....                               | 44        |
| 3.3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS .....                              | 45        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3.1. Extracción.....   | 45        |
| 3.3.2. Transesterificación .....   | 45        |
| 3.3.3. Análisis GC-FID .....   | 46        |
| 3.4. COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU CUANTIFICACIÓN .....  | 47        |
| 3.4.1. Extracción de compuestos fenólicos.....   | 47        |
| 3.4.2. Cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico .....                     | 48        |
| 3.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....                                       | 49        |
| 3.6. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE UHPLC-Q/ORBITRAP/MS/MS..... | 50        |
| 3.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR.....  | 50        |
| 3.7.1. Obtención de los extractos .....  | 51        |
| 3.7.2. Estudio farmacológico.....  | 52        |
| 3.7.3. Evaluación de la acción gastroprotectora .....                                      | 54        |
| 3.7.4. Análisis estadístico .....  | 55        |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>56</b> |
| 4.1. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS .....                                       | 56        |
| 4.1.1. Extracción.....   | 56        |
| 4.1.2. Transesterificación .....   | 56        |
| 4.1.3. Análisis de ácidos grasos por GC-FID.....   | 57        |
| 4.2. COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU CUANTIFICACIÓN .....  | 60        |
| 4.2.1. Extracción de compuestos fenólicos.....   | 60        |
| 4.2.2. Cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico .....                     | 61        |
| 4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....                                       | 62        |
| 4.4. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE FENÓLICOS MEDIANTE UHPLC-Q/ORBITRAP/MS/MS.....            | 66        |
| 4.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DE LOS EXTRACTOS .....                          | 77        |
| 4.5.1. Análisis estadístico .....  | 79        |
| <b>5. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>85</b> |
| <b>6. RECOMENDACIONES .....</b>  | <b>86</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>87</b> |
| <b>8. ANEXOS .....</b>   | <b>95</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos. ....   | 7  |
| Figura 2. Ruta biosintética simplificada de los flavonoides.....   | 12 |
| Figura 3. Estructura básica de los flavonoides (2-fenilbenzopirano).....                                     | 13 |
| Figura 4. Estructura básica y las diferentes subclases de flavonoides. ....                                  | 13 |
| Figura 5. Estructuras químicas de flavonoles (41). ....  | 14 |
| Figura 6. Estructuras químicas de glicósidos de quercetina.....  | 15 |
| Figura 7. Estructuras químicas de los principales flavan-3-oles.....   | 17 |
| Figura 8. Estructuras de a) chalcona y b) hidrochalcona .....  | 18 |
| Figura 9. Estructura de antocianidinas (agliconas).....  | 18 |
| Figura 10. Estructura química de antocianinas de la uva .....  | 19 |
| Figura 11. Estructura química de la genisteina.....  | 20 |
| Figura 12. Esquema general de la farmacocinética de los flavonoides.....                                     | 23 |
| Figura 13. Enzimas responsables del metabolismo de flavonoides.....  | 24 |
| Figura 14. Estructura del ácido linoleico y su nomenclatura en el sistema “Δ”, “ω” y “n” .....               | 25 |
| Figura 15. Cultivo de uva, Perú.....   | 29 |
| Figura 16. Productos primarios y subproductos de la uva, y sus efectos beneficiosos sobre el<br>cuerpo. .... | 30 |
| Figura 17. Estructura del radical DPPH● .....  | 34 |
| Figura 18. Posibles mecanismos para la reacción de quercetina con DPPH (87).....                             | 34 |
| Figura 19. Estructura de inhibidores de la bomba de protones. ....   | 41 |
| Figura 20. Estructura química de la claritromicina .....   | 42 |
| Figura 21. Orujo de uva de la variedad Malbec. ....  | 44 |
| Figura 22. Semillas de uva seca y molida.....  | 44 |
| Figura 23. Etapa de separación y purificación de los FAMES .....   | 46 |
| Figura 24. Procedimiento de extracción de compuestos fenólicos.....  | 47 |
| Figura 25. Proceso de obtención de los extractos alcohólicos de semillas de uva.....                         | 51 |
| Figura 26. Protocolo para la determinación de la úlcera gástrica .....                                       | 53 |
| Figura 27. Curva de calibración para el palmitato de metilo .....  | 58 |
| Figura 28. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.....               | 61 |
| Figura 29. Mecanismo de reacción del ácido ascórbico frente al radical DPPH●. ....                           | 63 |
| Figura 30. Curva de absorbancia del extracto metanólico de semillas de uva.....                              | 64 |
| Figura 31. Porcentaje de inhibición del extracto metanólico de semillas de uva .....                         | 64 |
| Figura 32. Curva de absorbancia de la vitamina C.....  | 64 |



|   |           |
|---|-----------|
| <i>Figura 33. Porcentaje de inhibición de la vitamina C.....</i>  | <i>65</i> |
| <i>Figura 34. Cromatograma del análisis UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS del extracto metanólico.....</i>                     | <i>66</i> |
| <i>Figura 35. Estructura química de compuestos identificados (tentativos) mediante UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS .....</i> | <i>70</i> |
| <i>Figura 36. Espectro MS<sup>2</sup> y fragmentación para el ácido glucónico.....</i>                              | <i>71</i> |
| <i>Figura 37. Espectro MS<sup>2</sup> y fragmentación para la glucogalina .....</i>                                 | <i>72</i> |
| <i>Figura 38. Espectro MS<sup>2</sup> y fragmentación de miricetina ramnósido, .....</i>                            | <i>73</i> |
| <i>Figura 39. Espectro MS del ion molecular de la epicatequina-3-galato.....</i>                                    | <i>74</i> |
| <i>Figura 40. Espectro MS<sup>2</sup> y fragmentación de epicatequina-3-galato.....</i>                             | <i>74</i> |
| <i>Figura 41. Patrón de fragmentación de las procianidinas.....</i>   | <i>75</i> |
| <i>Figura 42. Espectro MS<sup>2</sup> de procianidinas.....</i>   | <i>76</i> |
| <i>Figura 43. Estructura sugerida para el compuesto 2 .....</i>   | <i>76</i> |
| <i>Figura 44. Estómagos extraídos de ratas con los diferentes tratamientos.....</i>                                 | <i>78</i> |
| <i>Figura 45. Gráfico de Medias para los tratamientos aplicados.....</i>  | <i>80</i> |
| <i>Figura 46. Efecto inhibitorio de los tratamientos.....</i>   | <i>83</i> |
| <i>Figura 47. Cromatograma GC-FID del estándar FAMEs Mix 28 componentes.....</i>                                    | <i>95</i> |
| <i>Figura 48. Cromatograma GC-FID del aceite de semillas (Soxhlet).....</i>   | <i>95</i> |
| <i>Figura 49. Cromatograma GC-FID del aceite de semillas (CO<sub>2</sub> supercrítico).....</i>                     | <i>96</i> |
| <i>Figura 50. Curva de calibración para el estearato de metilo .....</i>  | <i>96</i> |
| <i>Figura 51. Curva de calibración para el oleato de metilo .....</i>   | <i>97</i> |
| <i>Figura 52. Curva de calibración para el linoleato de metilo.....</i>   | <i>97</i> |

## INDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Fuentes dietéticas naturales de compuestos fenólicos (31) .....                                     | 8  |
| Tabla 2. Abreviaturas de enzimas implicadas en la biosíntesis de flavonoides (42).....                       | 11 |
| Tabla 3. Principales flavonas de algunas verduras. ....  | 16 |
| Tabla 4. Principales flavan-3-oles presentes en algunas verduras y frutas. ....                              | 17 |
| Tabla 5. Flavonoides mayoritarios de algunas frutas y verduras. ....   | 21 |
| Tabla 6. Nomenclatura de algunos ácidos grasos según los diferentes sistemas. ....                           | 26 |
| Tabla 7. Distribución de los compuestos fenólicos mayoritarios en la baya .....                              | 31 |
| Tabla 8. Compuestos fenólicos de bajo peso molecular en semillas y cáscaras de uva.....                      | 32 |
| Tabla 9. Factores que contribuyen al desarrollo de la gastritis (91). ....                                   | 36 |
| Tabla 10. Clasificación de la gastritis y causas que conllevan a su desarrollo.....                          | 36 |
| Tabla 11. Principales antiácidos. ....   | 41 |
| Tabla 12. Reactivos utilizados en la determinación de fenoles totales. ....                                  | 48 |
| Tabla 13. Estándar y reactivos utilizados para la curva de calibración .....                                 | 48 |
| Tabla 14. Reactivos empleados en la determinación de la actividad antioxidante.....                          | 49 |
| Tabla 15. Tratamientos aplicados para la determinación del efecto gastroprotector .....                      | 52 |
| Tabla 16. Parámetros de la escala de Marhuenda .....   | 54 |
| Tabla 17. Porcentaje de extracción de aceite de semillas de uva .....  | 56 |
| Tabla 18. Porcentajes de transesterificación del método tradicional. ....                                    | 57 |
| Tabla 19. Porcentajes de transesterificación del método CO <sub>2</sub> supercrítico .....                   | 57 |
| Tabla 20. Metilésteres identificados en el aceite de semillas de uva .....                                   | 58 |
| Tabla 21. Ácidos grasos en aceites de semilla de uva (Malbec) de diferente origen.....                       | 59 |
| Tabla 22. Composición de ácidos grasos por gramo de aceite de semilla.....                                   | 60 |
| Tabla 23. Porcentajes de extracto metanólico en harina semillas con y sin desgrasado. ....                   | 60 |
| Tabla 24. Cuantificación de fenoles totales en los extractos metanólicos. ....                               | 61 |
| Tabla 25. Comparación del contenido de fenoles totales en diferentes variedades de uva .....                 | 62 |
| Tabla 26. Porcentaje de DPPH remanente después de la reacción .....  | 63 |
| Tabla 27. Concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) del extracto metanólico y estándar .....       | 65 |
| Tabla 28. Identificación de compuestos fenólicos en semilla de uva mediante UHPLC-<br>Q/Orbitrap/MS/MS ..... | 67 |
| Tabla 29. Análisis descriptivo del tratamiento con los extractos. ....                                       | 77 |
| Tabla 30. Estadísticos descriptivos del ensayo del efecto gastroprotector .....                              | 79 |
| Tabla 31. Prueba de homogeneidad de varianzas. ....  | 81 |
| Tabla 32. Prueba de Kruskal Wallis. ....   | 81 |
| Tabla 33. Comparaciones múltiples: Games-Howell.....   | 82 |

|   |            |
|---|------------|
| <i>Tabla 34. Porcentaje de Inhibición .....</i>                                   | <i>83</i>  |
| <i>Tabla 35. Tiempos de retención de los volúmenes de inyección de FAMES.....</i> | <i>98</i>  |
| <i>Tabla 36. Áreas bajo la curva de los componentes del estándar FAMES .....</i>  | <i>99</i>  |
| <i>Tabla 37. Puntuación de Marhuenda por cada individuo analizado.....</i>        | <i>100</i> |



## LISTA DE ABREVIATURAS

- **INEI:** Instituto Nacional de Estadística e Informática
- **FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- **FAO-STAT:** FAO estadístico.
- **UV:** Ultra violeta
- **MINAGRI:** Ministerio de Agricultura y Riego
- **ISA:** Informe de seguimiento agroeconómico
- **GC-FID:** Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
- **UHPLC ESI MS-MS:** cromatografía líquida ultra-alta performance, ionización de electroespray acoplado a un espectrofotómetro de masas
- **DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- **ERO (ROS):** Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species)
- **MS:** Espectrofotómetro de masas
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **CoA:** Co-enzima A
- **ATP:** Adenosintrifosfato
- **LA:** ácido linoleico
- **ALA:** Ácido alfa-linolénico
- **LDL:** Lipoproteína de baja densidad
- **PUFAs:** Ácidos grasos poliinsaturados
- **SET:** Single Electron Transfer
- **HAT:** Hidrogen Atom Transfer
- **ET:** Electron transfer (transferencia de electrón)
- **TEAC:** Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
- **ABTS:** Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
- **ROO•:** Radical peróxido
- **AINES:** Aintinflamatorios no esteroideos
- **H. P:** *Helicobacter pylori*
- **EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- **IRC:** Insuficiencia renal crónica
- **ISRS:** Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
- **UD:** Úlcera duodenal
- **UG:** Úlceras gástricas
- **PG:** Prostaglandinas

- **FAMEs:** Metilésteres de ácidos grasos
- **ITEPA:** Investigación en Tecnología de Procesos Agroindustriales
- **ES:** Extracción Soxhlet
- **SF:** Fluido Supercrítico
- **MeOH:** Metanol
- **BuOH:** Butanol
- **PDA:** Photodiode array
- **PTFE:** Polytetrafluoroethylene
- **U.G.I:** Ulcera gástrica inducida
- **EP:** Éter de petróleo
- **AG:** Ácido gálico
- **CI<sub>50</sub>:** Capacidad inhibitoria media
- **[M-H]<sup>-</sup>:** ión molecular
- **S:** desviación estándar
- **gl:** Grados de libertad
- **Sig.:** Significación
- **PGE2:** Prostaglandina E2.



## 1. INTRODUCCIÓN

La uva (*Vitis vinifera* L.), destinada principalmente para la producción del vino y propósitos dietarios, posee semillas oleaginosas que conjuntamente con las hojas, tienen aplicaciones en medicina herbaria y suplementos (1). Durante los últimos años la industria de vinos y piscos en el Perú ha tenido un crecimiento constante (INNEI, 2017) debido principalmente al crecimiento de las exportaciones, en consecuencia, la generación de residuos por la industria vitivinícola también experimentó un incremento, conduciendo a la contaminación del ambiente de las regiones productoras por falta del aprovechamiento adecuado de estos insumos para otros productos alternativos.

A lo largo de los años, el vasto cultivo de uvas alcanzó una producción global de alrededor de 69 millones de toneladas en el 2006 (FAO-STAT, 2007). Dado que el 80 % se usa para la preparación del vino, surgen alrededor de 10 millones de toneladas de orujo u hollejo de uva (residuo del proceso de vinificación constituido por las semillas, cáscara y tallos), producto del procesamiento de la materia prima. Las semillas constituyen una porción considerable del orujo, que asciende al 38 – 52 % en una base de materia seca. Además contienen entre 8 – 20 % (w/w) de aceite (2) y 10 a 20 % (w/w) de compuestos fenólicos en base seca. Por otra parte el aceite de semillas de uva es rico en ácidos grasos insaturados, en particular el ácido linoleico (2–4), el cual es producido principalmente en países europeos como Italia, Francia y España.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los parámetros de calidad más importantes de las uvas y vinos, ya que contribuyen a las características organolépticas como el color, la astringencia y la amargura; también son activos en procesos bioquímicos y tienen efectos nutraceuticos, incluyendo propiedades antimicrobianas, anticancerígenas y antioxidantes (5,6). La presencia de los compuestos fenólicos en las cáscaras y semillas dependen principalmente de factores genéticos, del suelo, del clima y de la viticultura, entre otros (7,8). Debido a estas características y a su gran disponibilidad como importante subproducto de la industria del vino, este se convierte en una materia prima atractiva para diferentes aplicaciones.

Los flavonoides, una de las subfamilias de los compuestos fenólicos, han cobrado más atención en los últimos años en la investigación biomédica, debido en gran medida, a las múltiples propiedades biológicas observadas experimentalmente y su amplia distribución en la dieta, así mismo en numerosos remedios de la medicina tradicional. Muchos estudios determinaron que estos compuestos presentan actividades interesantes frente a diversas enfermedades crónicas tan comunes y dañinas, entre las que destacan las cardiovasculares y cancerígenas.

## 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Un alimento se define como funcional si este posee efectos beneficiosos en una o más funciones fisiológicas del ser humano, incrementa su bienestar o disminuye el riesgo de padecer ciertas enfermedades. Habitualmente la funcionalidad de un alimento está relacionada con alguno o algunos de los tantos compuestos bioactivos que contiene. Entre estos destacan los compuestos fenólicos, por ser en gran parte los responsables de las características organolépticas de los alimentos que proceden de las plantas, así mismo porque la ingesta de estos alimentos está asociada con efectos beneficiosos para la salud. Por ello el conocimiento detallado de la presencia de estos compuestos en los alimentos contribuirá, tanto a la caracterización metabólica del producto alimenticio que lo contiene, como a entender de mejor manera sus efectos sobre la salud (9).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grandes grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, el cual lo convierte parte importante de la dieta tanto humana como animal. Químicamente los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo e incluye derivados funcionales; el término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos con una gran diversidad estructural que existen en la naturaleza (10). La distribución y el contenido de compuestos fenólicos en una planta depende de diversos factores como la especie o variedad, técnica y condiciones de cultivo, estado de maduración, condiciones de procesado y almacenamiento, entre otras. Así mismo su distribución en los tejidos de las plantas a nivel celular, no es uniforme (11). Estos compuestos cumplen una serie de funciones metabólicas en las plantas como en el crecimiento, la reproducción, en la protección contra patógenos externos, el estrés, la radiación UV y los depredadores; además influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos. Los compuestos fenólicos se encuentran casi en todos los alimentos de origen vegetal como es el caso de la uva, cebolla, té, cacao, aceite de oliva virgen, etc.

Las plantas medicinales y los alimentos funcionales han constituido desde tiempos remotos, un recurso de gran importancia para cubrir las necesidades terapéuticas. Es así desde que las vitaminas y los compuestos fenólicos se consideraron importantes antioxidantes en la dieta, el consumo de estos se fue incrementando en la población para prevenir, retrasar y mejorar ciertas enfermedades. Estos hechos permitieron que los compuestos fenólicos fueran ganando interés en los consumidores y los fabricantes de alimentos, por sus propiedades beneficiosas para la salud. Estudios realizados sugirieron que el consumo de alimentos y bebidas ricas en polifenoles impiden muchas enfermedades. Por ejemplo, algunas frutas y verduras pueden prevenir el

cáncer y los accidentes cerebrovasculares, mientras que las bebidas como el vino y el té puede prevenir las enfermedades coronarias y el cáncer (12).

De todos los compuestos fenólicos, el grupo de los flavonoides es el más extendido en los alimentos funcionales. Los flavonoides son un tipo particular de los polifenoles presentes en plantas y son los responsables del color de las flores y frutas; además estudios epidemiológicos demostraron que la ingestión rica en flavonoides se correlaciona con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular (13). Entre los flavonoides, los flavonoles, compuestos de baja toxicidad, son los que poseen mayor actividad antioxidante y presentan numerosas actividades biológicas, entre las que destacan sus efectos antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiagregante plaquetario, antiespasmódico, inmunomodulador, hepatoprotector y ansiolítico. De igual manera han sido investigados por sus efectos antiproliferativos y antiinflamatorios (14). Además se reportaron algunos flavonoles con actividad gastroprotectora, entre ellos el kaempferol y la quercetina (14,15).

Las frutas y verduras se encuentran entre las principales fuentes de flavonoides y nuestro país es uno de los tantos en el mundo con una gran biodiversidad, actualmente cerca del 60 % de la economía nacional depende ella, tanto en lo referente a la producción agrícola, pesquera, ganadera y forestal, como en lo industrial (16). Por otra parte, según los informes de 2016 del Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), la producción agropecuaria en nuestro país se incrementó durante la última década, donde la producción agrícola es un claro ejemplo (17), así durante el cuarto trimestre se evidenció un crecimiento del 1,9 %, sustentado principalmente por la mayor producción de uva, arroz cáscara, papa, entre los de mayor importancia (18).

Cabe destacar la producción de uva como una importante actividad agraria en el Perú, el desarrollo de la industria vitivinícola también se vio favorecida, consecuentemente la elaboración del vino, pisco y productos derivados de la uva. Tal es el caso que en el cuarto trimestre de 2016 la producción de uva a nivel nacional fue de 387 mil toneladas, según el informe de seguimiento agroeconómico (ISA) (19).

En el caso de la industria vitivinícola, durante la elaboración del vino, una bebida con un alto contenido de flavonoides poliméricos, se generan distintos residuos como el orujo u hollejo con un alto contenido en compuestos fenólicos. Dentro de los cuales la semilla es una de las más atractivas, debido a que son ricas en ácidos grasos y compuestos fenólicos que tienen importantes propiedades farmacológicas (20). Toda esta fuente de compuestos químicos, obtenida a partir del orujo generado en la elaboración del vino, puesta en valor tiene un impacto económico positivo. La cantidad de residuos orgánicos generados por la industria vitivinícola



que no son aprovechados adecuadamente todavía es muy alta en la actualidad. Sin duda hoy en día es un hecho que reciclar y aprovechar los subproductos de la fabricación del vino, aporta beneficios tanto económicos como ambientales. Por ejemplo se estima que en España sólo un 3 % de la producción nacional de orujo se destina a la alimentación animal (21), además de otros países como Argentina y Chile, mientras que el resto es desechado.

Desde la restricción del uso medicinal del vino por el contenido de alcohol y azúcar, se optó por examinar los subproductos de la industria vitivinícola, como son las cáscaras y semillas de uva (20), estas últimas contienen lípidos, proteínas, carbohidratos y compuestos polifenólicos, cuya proporción depende de la variedad. Debido al alto contenido de compuestos de gran interés, proyectos como "Haprowine" (España), encargado de realizar los estudios pertinentes como la caracterización de los flujos de residuos del sector vitivinícola, en zonas de mayor producción de uva, desarrolla investigación sobre diferentes alternativas para la obtención de nuevos productos con mayor valor añadido (22). Otro ejemplo, es el programa LIFE de la Unión Europea, quien financió el proyecto "*LIFE TANNINS - Preventing the exploitation of forests by obtaining tannin extract from grape pips through recovery of a waste product of the wine industry*". Este proyecto mostró con éxito la viabilidad de dicha recuperación (23). Este tipo de proyectos pone en evidencia la gran cantidad de investigaciones que se realizan en esta línea de los residuos de la industria vitivinícola; en este sentido nuestro país, no cuenta con información bibliográfica suficiente referente a la composición química de las uvas que se producen en nuestro país y sus derivados. Hasta la fecha se han contabilizado 30 variedades de uva entre las que destacan Sauvignon Blanc, Chardonnay, Syrah y Malbec para la producción de vino y pisco; sin embargo existen pocos trabajos de investigación realizados en esta línea.

Muchas investigaciones referentes a la composición química de las semillas y sus propiedades han sido estudiadas con mayor profundidad como:

- (i) En la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, tales como las enfermedades cardiovasculares (24,25).
- (ii) Capacidad de estos compuestos para modular la actividad enzimática, propiedad gastroprotectora de los flavonoides (14).
- (iii) Capacidad de ciertos flavonoides a enlazarse con las proteínas. Como por ejemplo la unión flavonol-proteína, el cual envuelve mecanismos que no están directamente relacionados con su actividad antioxidante.
- (iv) La estabilización de los aceites comestibles y de su sabor, así como la protección contra la formación de malos sabores.

(v) La preparación de complementos alimenticios (26).

Por tanto un conocimiento detallado acerca de la cantidad de compuestos fenólicos, en el caso específico de las semillas de uva en nuestro país, es importante debido a las propiedades de dichos compuestos. ¿La actividad del extracto se debe a todos sus componentes? No solo los compuestos mayoritarios son los responsables de sus características, sino que también influyen los minoritarios, o las interacciones sinérgicas entre ellos (27).

A partir de lo señalado, es importante realizar un estudio de los componentes de mayor interés como son el aceite y los compuestos fenólicos (flavonoides) de la semilla de uva, que permita conocer las condiciones óptimas de manejo de estos componentes para su posterior aplicación, del mismo modo en un futuro sacar el mayor provecho de los residuos que generan la industria vitivinícola en bien de una mejora económica y ambiental.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. General:

Determinar el contenido de ácidos grasos, el perfil de compuestos fenólicos y el efecto gastroprotector de semillas de uva (*Vitis vinifera*) variedad Malbec, procedente de una industria vitivinícola de la ciudad de Ica, Perú.

### 1.2.2. Específicos:

1. Extraer el aceite, determinar el perfil de ácidos grasos por GC-FID del aceite de semilla de uva.
2. Extraer los compuestos fenólicos de las semillas de uva y cuantificar el contenido de fenoles totales.
3. Determinar el perfil de compuestos fenólicos del extracto metanólico mediante cromatografía UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS.
4. Determinar la actividad antioxidante del extracto metanólico de semillas de uva por el método del DPPH in vitro.
5. Evaluar el efecto gastroprotector in vivo de los extractos metanólico y butanólico de las semillas de uva.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. COMPUESTOS FENÓLICOS

El término compuesto fenólico abarca una amplia gama de sustancias que poseen en común un anillo aromático que lleva uno o más sustituyentes hidroxilo. Las sustancias fenólicas son mayormente solubles en agua, ya que con mayor frecuencia están unidos a glucósidos de azúcar y generalmente se encuentran en la vacuola celular (28). Debido a que las plantas son sésiles, han desarrollado muchas estrategias de supervivencia, incluyendo la capacidad de producir más de 200 000 metabolitos muy variados pero especializados (29). Su biogénesis se remonta relativamente a pocos metabolitos primarios iniciadores tales como acetato, mevalonato y shikimato (30). Estructuralmente hablando, los productos del metabolismo secundario de las plantas son altamente variados, de los 200 000 compuestos antes mencionados, más de 25 000 se clasifican como terpenoides, 12 000 como alcaloides y 8 000 como compuestos fenólicos (29). Entre los compuestos fenólicos naturales, los flavonoides forman el grupo más grande, pero los fenoles monocíclicos simples, los fenilpropanoides y las quinonas fenólicas existen en número considerable. Varios grupos importantes de materiales poliméricos en las plantas, las ligninas, las melaninas y los taninos son polifenólicos y algunas unidades fenólicas se encuentran en las proteínas, los alcaloides y entre los terpenoides (28).

Los compuestos fenólicos son de gran importancia fisiológica y morfológica para las plantas, ya que actúan como fitoalexinas, antialimentarios, contribuyentes a la pigmentación y reproducción de las plantas, protectores contra la luz UV y antioxidantes. Del mismo modo son determinantes en el color, la sensibilidad y la calidad nutricional de las frutas, vegetales y otras plantas; se ha informado que poseen excelentes propiedades como conservantes de alimentos, así como tener un papel primordial en la protección contra una serie de trastornos patológicos y degenerativos (31).

#### 2.1.1. Estructura de los compuestos fenólicos

Estos compuestos comprenden una amplia variedad de moléculas que presentan una estructura de polifenol (anillos aromáticos con varios grupos hidroxilo), así mismo de moléculas con un anillo fenol (ácidos fenólicos y alcoholes fenólicos). La clasificación de los compuestos fenólicos radica principalmente en la cantidad de anillos fenólicos que contienen y los tipos de enlaces que unen estos anillos entre sí. Los grupos principales de compuestos fenólicos se muestran en

la Figura 1, entre los que destacan los flavonoides, ácidos fenólicos (fenoles más sencillos), estilbenos (resveratrol, piceatanol), taninos (hidrolizables y condensados), y lignanos (31,32).

“Los flavonoides son los polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas, los compuestos que tienen 3 o más se denominan taninos”. Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados y todos catalogados como derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados del 2-fenil benzo-[ $\alpha$ ]-pirano (33).

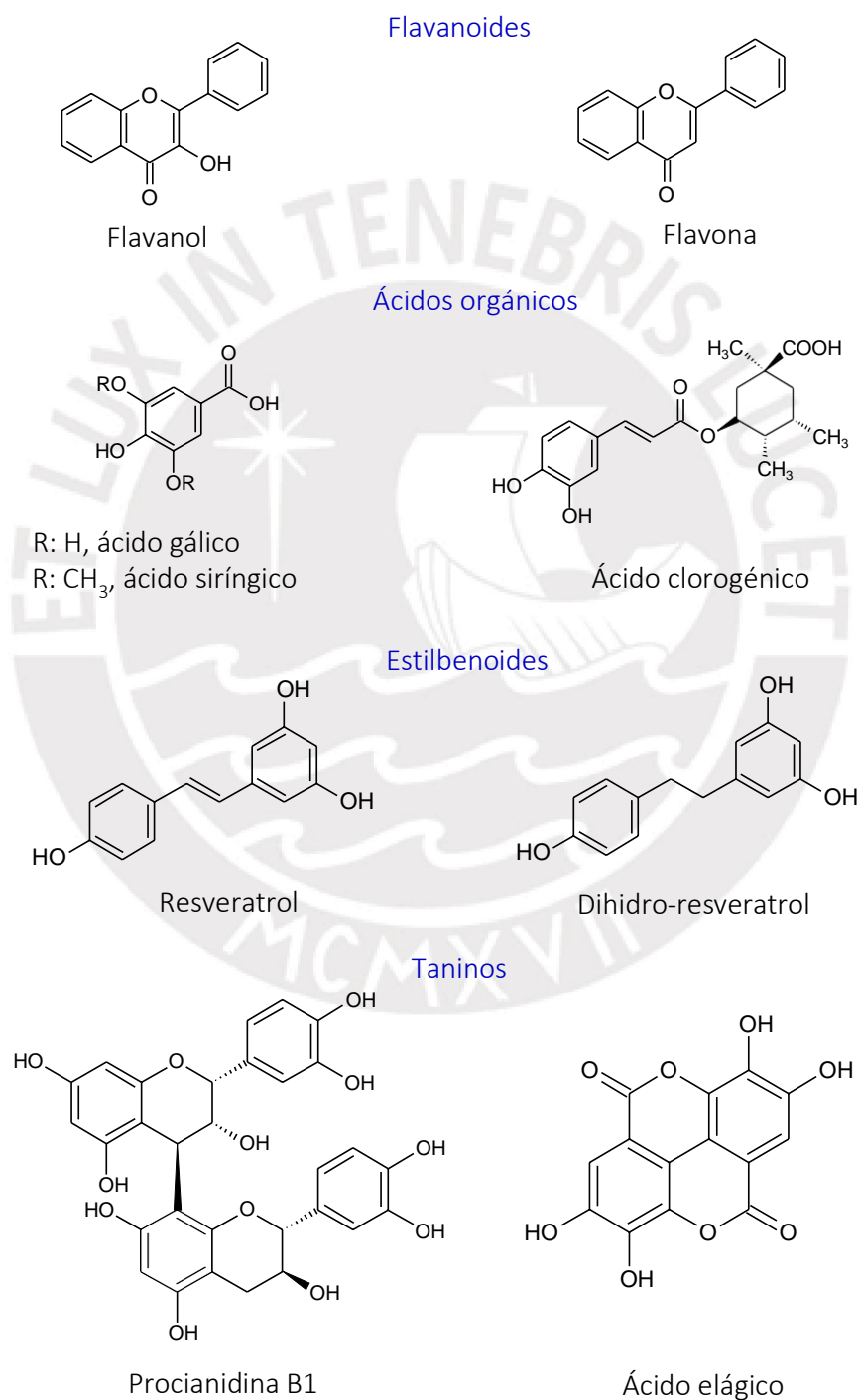


Figura 1. Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos.

## 2.1.2. Fuentes naturales de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente en productos como frutas, verduras, tabaco y otros. El reino vegetal ofrece una amplia gama de compuestos antioxidantes naturales, los cuales se han convertido en parte esencial de la tecnología de preservación y la atención médica contemporánea. La investigación constante en el descubrimiento y aplicación de algunos antioxidantes naturales se debe en gran medida a la potencial toxicidad que presentan algunos antioxidantes sintéticos (31). En la Tabla 1 se muestran algunas fuentes comunes de compuestos fenólicos.

Tabla 1. Fuentes dietéticas naturales de compuestos fenólicos (31).

|                         | Compuestos fenólicos | Fuentes dietéticas  |
|-------------------------|----------------------|---|
| <b>Ácidos fenólicos</b> | Hidroxicinámicos     | Albaricoques, arándanos, zanahorias, cereales, peras, cerezas, cítricos, oleaginosas, melocotones, ciruelas, espinacas, tomates, berenjenas |
|                         | Hidroxi benzoicos    | Arándano rojo y azul, cereales, semillas oleaginosas.   |
| <b>Flavonoides</b>      | Antocianinas         | Arándanos rojos y azules, grosellas negras, cerezas uvas y fresas.  |
|                         | Chalconas            | Manzanas.   |
|                         | Flavanoles           | Manzanas, arándanos, uvas, cebollas y lechuga.  |
|                         | Flavonoles           | Uvas.   |
|                         | Flavanonas           | Frutas cítricas.  |
|                         | Flavonoles           | Manzanas, frijoles, arándanos, trigo, escarola, puerro, lechuga, cebolla, oliva, pimienta y tomate.   |
|                         | Flavonas             | Cítricos, apio, perejil y espinaca.   |
|                         | Isoflavonas          | Soya.   |
|                         | Xantonas             | Mango y mangostán.  |
| <b>Taninos</b>          | Condensados          | Manzanas, uvas, duraznos, ciruelas, mangostanes, peras.   |
|                         | Hidrolizable         | Granada, frambuesas.  |

### 2.1.3. Subproductos agroindustriales, fuente de compuestos fenólicos

Entre las frutas, verduras y diferentes hierbas, los residuos agrícolas e industriales se han convertido en fuentes atractivas de compuestos antioxidantes naturales. Desde hace años atrás hasta la fecha se presta especial atención al aprovechamiento de los residuales de las industrias agrícolas con un fin económico; debido a que estos residuos o subproductos, todavía contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos de importancia.

Muchos estudios realizados demostraron que los subproductos son fuentes potenciales de antioxidantes. A continuación se mencionan algunos ejemplos:

- Subproductos de la elaboración del vino y jugo de uva, orujo de uva, son fuentes ricas en antioxidantes pero generalmente se convierten en compost sin mayor tratamiento.
- Extracción de aceite de oliva, también son una importante fuente potencial de fenoles (entre ellas hidroxitirosol, tirosol, oleuropeína y una variedad de ácidos hidroxicinámicos).
- La industria de los cítricos, produce grandes cantidades de residuos de cáscaras y semillas, que pueden representar hasta el 50 % del peso total de la fruta.
- Procesamiento de la alcachofa, la coliflor, la zanahoria, el apio y la cebolla.
- Industrias de jugos de frutas, se determinó que las cáscaras de muchas frutas contienen cantidades más altas de compuestos fenólicos que las partes carnosas comestibles, como es el caso del orujo de manzana y las semillas de los tomates (34,35).

### 2.1.4. Actividad biológica

Hoy en día, la relevancia e implicancia que tiene la nutrición en nuestra vida diaria, se debe a los componentes de los alimentos, entre ellas los compuestos fenólicos actúan positiva o negativamente en nuestra salud. Uno de los ejemplos más representativo viene a ser el papel de los compuestos fenólicos en procesos oxidativos de nuestro organismo (36).

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO o ROS de sus siglas en inglés), especies químicas radicales y no radicales, se comportan como agentes oxidantes debido a su gran inestabilidad. Pueden ser de origen endógeno o exógeno (tabaco, contaminación, medicamentos, entre otros). Aquellas que son endógenas están relacionadas con el proceso metabólico del oxígeno y con diversas reacciones de defensa de nuestro organismo (36). A continuación se muestran las consecuencias propiciadas por la formación de radicales libres:

- Uniones covalentes a macromoléculas celulares.
- Escisión o ruptura de las cadenas de ADN.

- Formación de especies radicales de oxígeno: producidos por procesos sucesivos de reducción monoeléctrica del oxígeno molecular.
- Procesos de peroxidación lipídica: la presencia de radicales libres con el oxígeno en un medio lipídico ocasiona la sustracción de un átomo de hidrógeno de una molécula lipídica, el cual conduce a la formación de hidroxiperóxidos lipídicos y con ello la alteración de las membranas celulares (36).

Todos estos mecanismos de oxidación en su conjunto desarrolladas en nuestro organismo, mantienen una relación directa con el envejecimiento celular y ciertas patologías como obesidad, hipercolesterolemia, diabetes, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer, osteoporosis e hipertensión. Numerosos estudios relacionan el papel antioxidante de los polifenoles de la uva y otras fuentes con la prevención o mejora de dichas alteraciones (37–40).

## 2.2. FLAVONOIDES

Del latín flavus, amarillo, es el término genérico con el que se refiere a un conjunto de metabolitos secundarios presentes en las plantas, los cuales son responsables del color de las flores, frutos y en ocasiones de hojas. La síntesis de estos compuestos se da a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA, a través de "la ruta biosintética de los flavonoides" (33).

Inicialmente los flavonoides fueron considerados vitaminas, nombrados vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2 (por la similitud a las propiedades de la vitamina C). Posteriormente el interés en estos compuestos disminuyó tras poner en evidencia que no son esenciales para la salud, a diferencia de los micronutrientes que si son indispensables. Sin embargo, tiempo después hasta el día de hoy, después de la publicación de numerosos estudios epidemiológicos que asocian la ingesta de alimentos ricos en flavonoides con una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer, el interés en estas moléculas retornó con mayor fuerza. Así mismo se puso en evidencia que la importancia de la absorción, biodisponibilidad y la actividad de los flavonoides radican principalmente en las propiedades que les confiere su estructura química. Hasta hace unos años atrás se publicaron alrededor de 50 000 trabajos respecto a flavonoides y más de 10 000 respecto a la quercetina (33,41).

Los flavonoides al ser compuestos fenólicos también cambian de color cuando se tratan con base o con amoníaco, facilitando su detección. Además contienen sistemas aromáticos conjugados y bandas de absorción intensas en las regiones UV y visible del espectro (28).

### 2.2.1. Biosíntesis

Los flavonoides se sintetizan a través de la vía fenilpropanoide, en el que la fenilalanina se transforma en 4-cumaroil-CoA, el cual finalmente ingresa en la ruta de la biosíntesis de flavonoides como se muestra en la Figura 2. El primer paso está catalizado por la chalcona sintasa (CHS), que utiliza tres moléculas de malonil-CoA y una de 4-cumaroil-CoA como sustratos.

Las reacciones son catalizadas por enzimas (Ver tabla 2), las cuales emplean ésteres de coenzima A y tienen un solo sitio activo para realizar las reacciones necesarias, como el de extensión de cadena, condensación y ciclación (42–44).

La chalcona sintasa, la primera enzima específica para la vía flavonoide, produce la estructura base de chalcona, de los que derivan todos los flavonoides. Por último, las transferasas modifican la estructura del flavonoide con azúcares, grupos metilo y/o restos acilo, modulando la actividad fisiológica del flavonoide resultante al alterar su solubilidad, reactividad e interacción con los objetivos celulares (44).

Tabla 2. Abreviaturas de enzimas implicadas en la biosíntesis de flavonoides (42).

| ENZIMAS/ P450 HIDROXILASAS                             |  |
|--|--|
| CHI: chalcona isomerasa                                | PAL: fenilalanina amonio-liasa             |
| CHR: chalcona reductasa                                | RT: ramnosil transferasa                   |
| CHS: chalcona sintasa                                  | STS: estilbeno sintasa                     |
| 4CL: 4-cumaroil-CoA-ligasa                             | UFGT: UDPG flavonoide glucosil transferasa |
| DRF: dihidroflavonol 4-reductasa                       | VR: vestitona reductasa                    |
| F3H: flavanona 3-hidroxilasa                           | DFR: dihidroflavonol 4-reductasa           |
| FSI: flavona sintasa I                                 | C4H: cinamato-4-hidroxilasa                |
| IOMT: isoflavona O-metiltransferasa                    | F3'H: flavona-3'-hidroxilasa               |
| IFR: isoflavona reductasa                              | F3'5'H: flavona-3'5'-hidroxilasa           |
| LDOX: leucoantoclanidina dioxigenasa                   | IFS: isoflavona sintasa                    |
| LCR: leucoantocianidina reductasa                      | FSII: flavona sintasa II                   |
| OMT: O-metiltransferasa                                | I2'H: isoflavona 2'-hidroxilasa            |
| DMID: 7,2'-dihidroxi, 4'metoxiisoflavanol deshidratasa |  |





## 2.2.2. Clasificación y distribución

La distribución de los flavonoides en el reino vegetal (en diferentes tejidos celulares como el de flores, frutas, raíces, tallos, semillas y hojas) es muy amplia y por consiguiente forman parte importante de nuestra dieta. La estructura base (Figura 3), “es un esqueleto 2-fenilcromano C6-C3-C6 que está formado por un anillo bencénico (A) unido a un anillo heterocíclico piránico (C) y un segundo anillo fenilo (anillo B) que se une en posición 2”, el cual da lugar al grupo de los flavonoides propiamente dichos (12,41,46,47). Finalmente la estructura básica es susceptible a diversas modificaciones posteriores y adiciones de grupos funcionales (12).

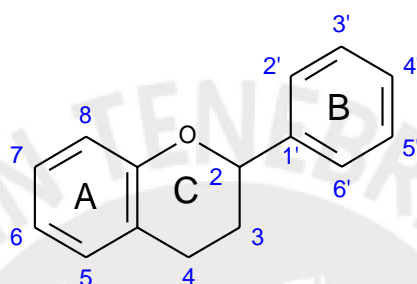


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides (2-fenilbenzopirano).

Los flavonoides se diferencian de otras sustancias fenólicas en el grado de oxidación de su anillo de pirano central (anillo C) y su clasificación depende de las modificaciones que este experimente. La Figura 4 muestra el origen de las diversas clases estructurales de flavonoides a partir de su precursor.

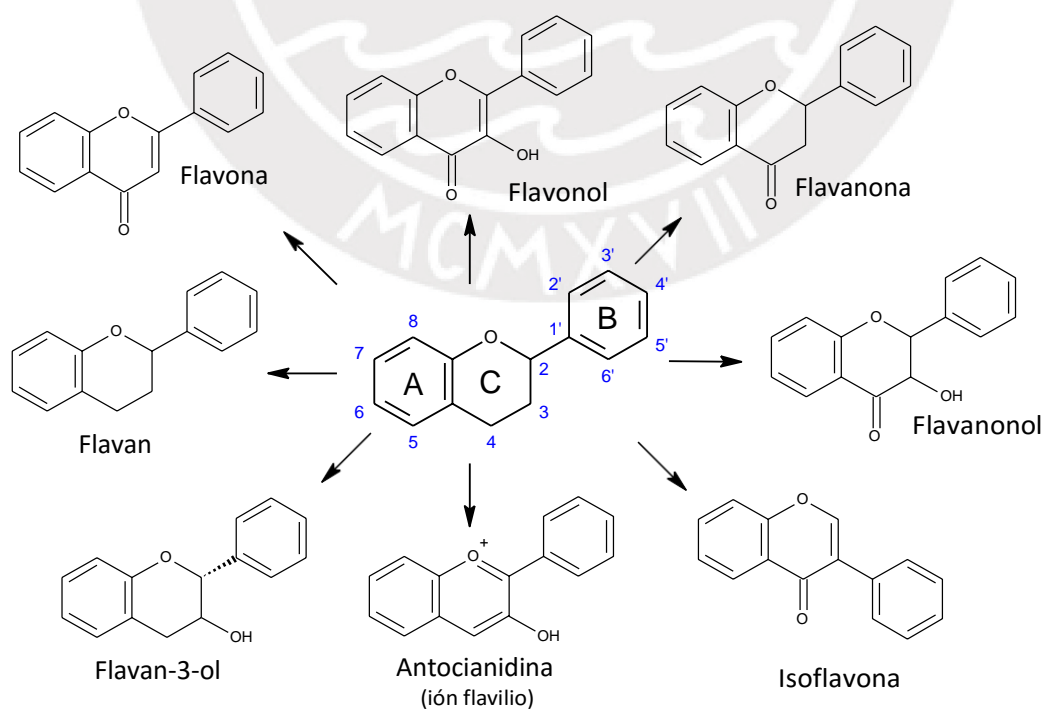
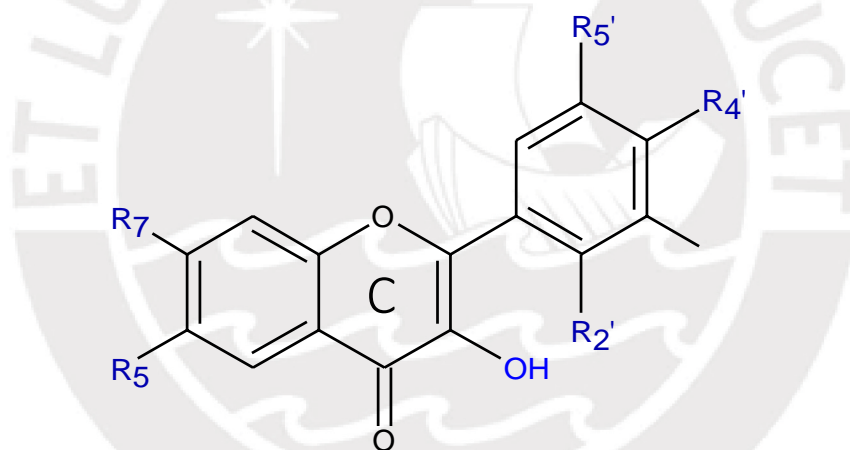


Figura 4. Estructura básica y las diferentes subclases de flavonoides.

Los compuestos al estar unidos a una o más moléculas azúcar y se denominan glicósidos, de los contrario son agliconas. Un mismo flavonoide, en una planta puede estar en varias combinaciones glicosídicas, por tal motivo al analizar los flavonoides, suele ser mejor examinar las agliconas presentes en los extractos hidrolizados antes de considerar la complejidad de los glicósidos que pueden estar presentes en el extracto original (28).

### 2.2.2.1. Los flavonoles

Estos compuestos están extensamente distribuidos en plantas que forman parte de nuestra dieta. Consideradas como subunidades de las proantocianidinas, tiene como característica principal la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 3, además de un grupo carbonilo y un doble enlace en el anillo C de la estructura base, tal como se muestra en la Figura 5. En cuanto al color, varían desde un tono blanco hasta amarillo. La quercetina, el kaempferol y la miricetina son los principales representantes, al igual que la isorramnetina, un derivado metilado de la quercetina (12,41).



| Flavonol             | R <sub>2</sub> ' | R <sub>3</sub> ' | R <sub>4</sub> ' | R <sub>5</sub> ' | R <sub>5</sub> | R <sub>7</sub> |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| <b>3-OH-flavona</b>  | H                | H                | H                | H                | H              | H              |
| <b>quercetina</b>    | H                | OH               | OH               | H                | OH             | OH             |
| <b>kaempferol</b>    | H                | H                | OH               | H                | OH             | OH             |
| <b>miricetina</b>    | H                | OH               | OH               | OH               | OH             | OH             |
| <b>isorhamnetina</b> | H                | OCH <sub>3</sub> | OH               | H                | OH             | OH             |
| <b>tamarixetina</b>  | H                | OH               | OCH <sub>3</sub> | H                | OH             | OH             |
| <b>morina</b>        | OH               | H                | OH               | H                | OH             | OH             |
| <b>fisetina</b>      | H                | OH               | OH               | H                | H              | OH             |

Figura 5. Estructuras químicas de flavonoles (41).

La quercetina es el compuesto más ampliamente distribuido entre los flavonoles y está presente en diversas frutas, verduras y muchas plantas medicinales, como en cebollas (*Alium cepa*), moringa (*Moringa oleífera*; planta medicinal), fresa (*Fragaria spp.*), las espinacas (*Spinaceae oleraceae*), la coliflor (*Brassica oleraceae*), entre otras (41).

La presencia de los flavonoles en las plantas frecuentemente se da en forma de glicósidos, donde la glucosa, galactosa y ramosa son los azúcares más frecuentes (48), tal como se muestra en la Figura 6. Por ejemplo la quercetina-4'-O-glucósido, quercetina-3,4'-O-diglucósido y la isorramnetina-4'-O-glucósido son los principales flavonoles de la cebolla; así mismo en la manzana (*Malus domestica*) podemos encontrar la quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-ramnósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-rutinósido, quercetina-3-O-arabinofuranósido y quercetina-3-O-arabinopiranósido (49).

En el caso de las uvas (*Vitis vinífera*) y sus productos derivados, contienen un gran número de flavonoles en forma de agliconas y glicósidos tales como quercetina, miricetina, kaempferol, isorramnetina, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-galactósido, kaempferol-3-O-glucósido y kaempferol-3-O-rutinósido (50–52).

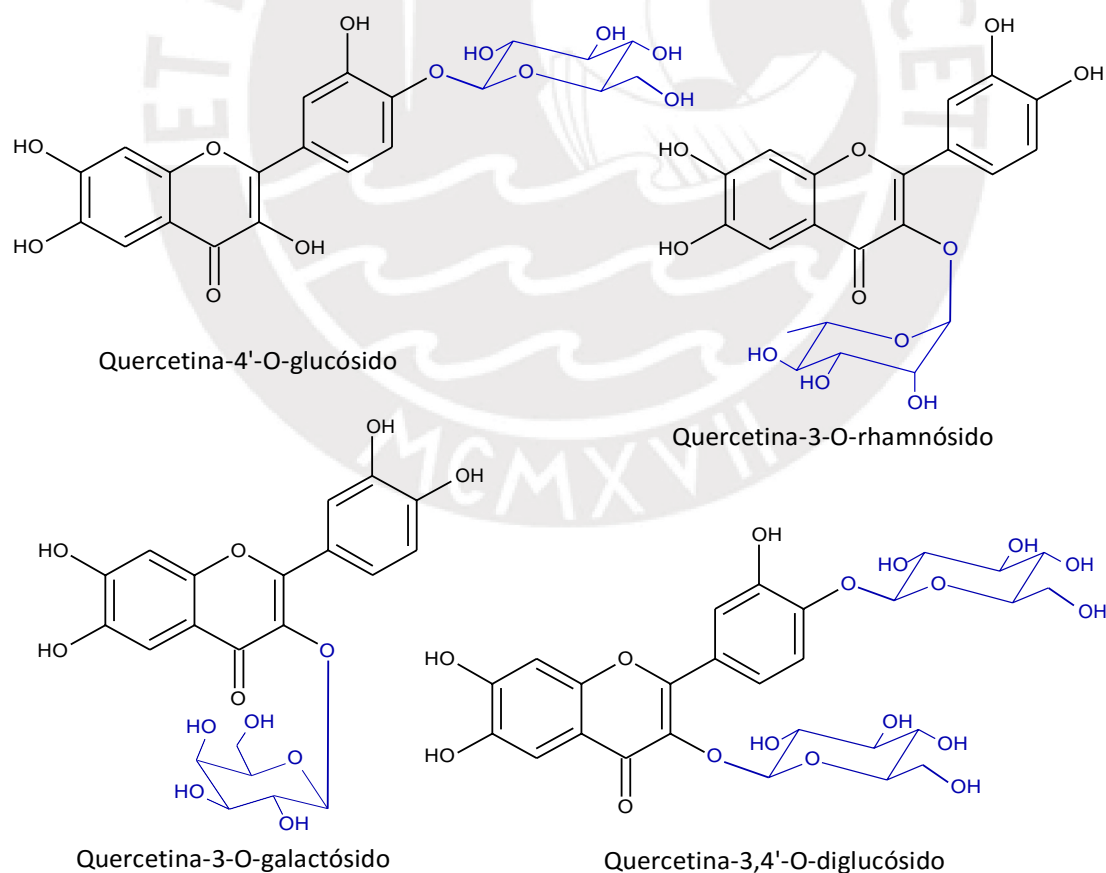


Figura 6. Estructuras químicas de glicósidos de quercetina.

### 2.2.2.2. Las flavonas

Se caracterizan por tener una estructura muy parecida al de los flavonoles pero con una pequeña diferencia, las flavonas no presentan el grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C y se consideran productos de oxidación de los flavonoles. Su distribución no es tan amplia como sus precursores y por consiguiente su concentración en los componentes de la dieta no es tan significativa. Sin embargo algunos reportes sugieren que plantas de las familias Asteraceae, Lamiaceae y Rutaceae son fuentes importantes de estos compuestos, como por ejemplo la alcachofa (*Cynara scolymus*) y la lechuga (*Lactuca sativa*) presentan concentraciones altas de flavonas (12,41,53). En la Tabla 3 se muestran algunos productos y sus principales flavonas.

Tabla 3. Principales flavonas de algunas verduras.

| Alimento  | Nombre científico       | Flavona  |
|-----------|-------------------------|--|
| apio      | <i>Apium graveolens</i> | apigenina<br>luteolina   |
| alcachofa | <i>Cynara scolymus</i>  | luteolina-7-O-glucósido<br>luteolina-7-O-rutinósido<br>apigenina-7-O-rutinósido  |
| lechuga   | <i>Lactuca sativa</i>   | luteolina-7-O-glucurónido<br>luteolina-7-O-glucósido<br>luteolina-7-O-rutinósido |

Estudios demostraron que las flavonas metoxiladas mejoran la estabilidad metabólica y aumentan su transporte a través de la membrana intestinal y hepática, y por tanto la mejora de la biodisponibilidad. “Además muestran un aumento de las propiedades de quimio-prevención del cáncer en comparación con la flavonas más comunes no metiladas” (41,54).

### 2.2.2.3. Los flavan-3-oles

Esta clase de flavonoides carecen del grupo carbonilo en el C4, se caracterizan por la ausencia del doble enlace entre el C2 y C3, lo que da lugar a la formación de un carbono quiral y la aparición de hidroxilo en el C3 (41,48). Los flavan-3-oles son considerados como ingredientes funcionales y está presente en diversas bebidas, plantas medicinales, alimentos integrales y procesados, su importancia en los alimentos se debe a su influencia sobre diferentes parámetros de calidad como la astringencia, amargura, acidez, dulzor, entre otros (55).

Estructuralmente estos compuestos son más complejos, en el caso de la uva incluyen desde monómeros simples como (+)-catequina, (-)-epicatequina (ver Figura 7) y (-)-epicatequina 3-galato, hasta proantocianidinas oligoméricas, también conocidos como taninos condensados (53).

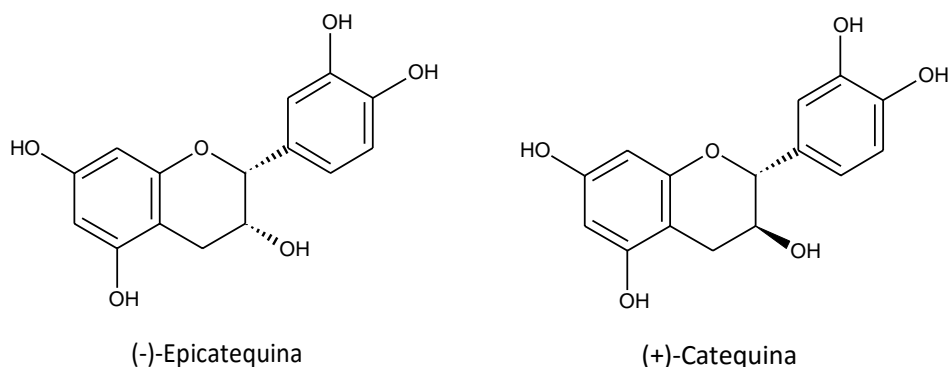


Figura 7. Estructuras químicas de los principales flavan-3-oles.

Los flavan-3-oles se encuentran en gran cantidad en diversas frutas como el albaricoque, las guindas, las uvas, las moras (Tabla 4) y la cebada, cereal que presenta además alto contenido de proantocianidinas. Por otra parte, algunas bebidas como la cerveza y el vino tinto también son ricas en flavan-3-oles, que provienen principalmente de los granos de cebada y semillas de uva respectivamente (41).

Tabla 4. Principales flavan-3-oles presentes en algunas verduras y frutas.

| Alimento                      | Nombre científico                                   | Flavan-3-oles                      |
|-------------------------------|---|------------------------------------|
| albaricoque<br>cebada         | <i>Prunus armeniaca</i><br><i>Hordeum vulgare</i>   | (+)-catequina<br>prodelfinidina B3 |
| avellanas<br>nueces de pecana | <i>Corylus avellana</i><br><i>Carya illinoensis</i> | proantocianidinas                  |

#### 2.2.2.4. Las flavanonas y las chalconas

Las diferencias estructurales que poseen las flavanonas respecto a las flavonas son dos, la ausencia de un doble enlace entre el C2 y la presencia de un centro quiral en dicho carbono (48). En la mayoría de las flavanonas, el anillo C está unido al anillo B en configuración  $\alpha$ , esta estructura les confiere alta reactividad. Por otra parte las reacciones más comunes de estos compuestos son la hidroxilación, la glicosilación y la *O*-metilación. Una de las fuentes más importantes son los cítricos y están en forma de glicosidos, por ejemplo el zumo de pomelo (naringenina-7-O-neohesperidósido) y zumo de naranja (naringenina-7-O-rutinósido) (56).

Por otra parte las chalconas o 1,3-difenilpropenonas son básicamente una cetona aromática al igual que las hidrochalconas (Figura 8) y tienen una cadena lineal de 3 carbonos que conecta los dos anillos, en el caso de las chalconas presenta un doble enlace, mientras que en las hidrochalconas está saturada (57). Además la chalcona es el precursor biosintético de los flavonoides.

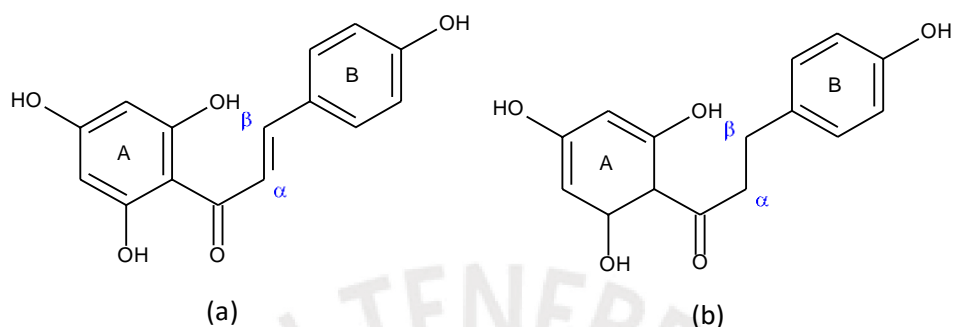


Figura 8. Estructuras de a) chalcona y b) hidrochalcona.

#### 2.2.2.5. Antocianidinas / antocianinas

En las antocianidinas el heterociclo es un catión pirilio, aunque en la naturaleza no se encuentran como cationes libres y generan compuestos coloreados ampliamente distribuidos como la pelargonidina (naranja-roja), cianidina (roja), peonidina (rosa-roja), delphinidina (azul-violeta), petunidina (azul-púrpura) y malvidina (púrpura) (Figura 9).

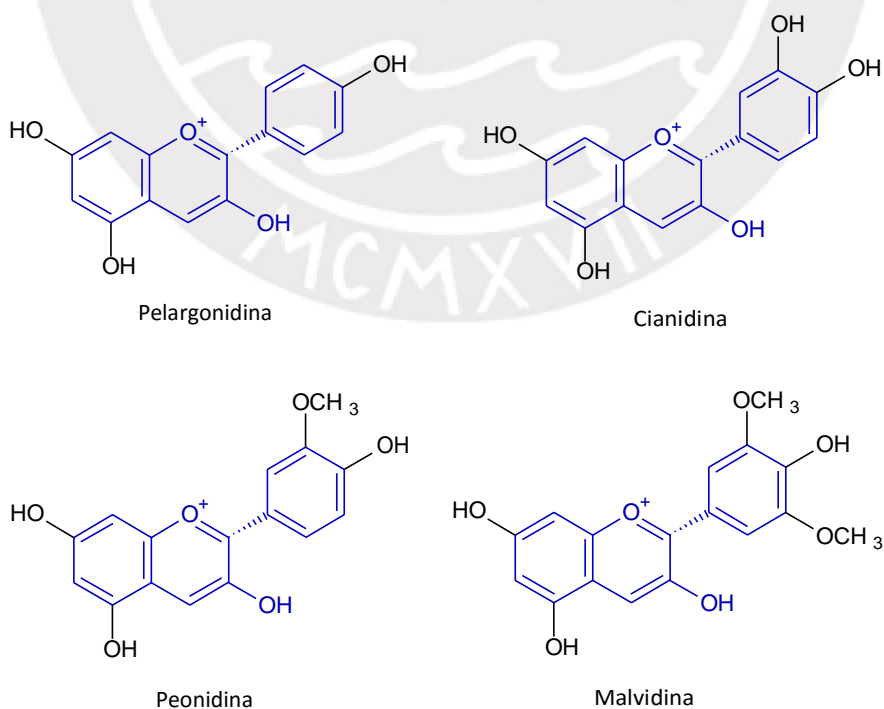
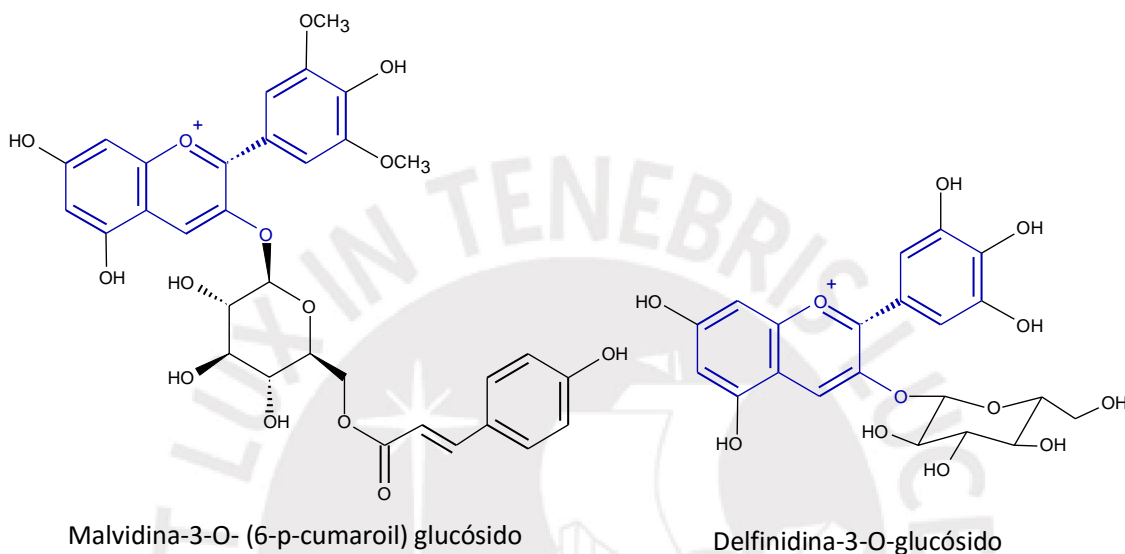


Figura 9. Estructura de antocianidinas (agliconas).

Por su parte, las antocianinas vienen a ser los glicósidos de las antocianidinas, donde el azúcar más común es el 3-glucósido, el cual puede estar unido al anillo C mediante la posición 3 o al anillo A mediante la posición 5. Por ejemplo, el color rojo característico de las uvas y sus productos derivados se debe a la presencia de glicósidos de malvidina (58,59). Así mismo, la petunidina-3-O-glucósido, malvidina 3-O-(6'-O-p-cumaroil)-glucósido, malvidina-3-O-(6'-O-acetil)-glucósido, delphinidina-3-O-glucósido y malvidina-3,5-O-diglucósido (Figura 10) son otras antocianinas que podemos encontrar en la uva (41).



*Figura 10. Estructura química de antocianinas de la uva.*

Estos compuestos están presentes en las vacuolas de tejidos vegetales coloreados como hojas o pétalos de flores. El color del pigmento depende del pH, de los iones metálicos presentes y de la combinación de azúcares sustituyentes y acilésteres. Los diferentes colores también pueden resultar de la presencia de combinaciones de varias antocianidinas. Estos compuestos protegen a las plantas contra el exceso de luz, del mismo modo cumplen un rol importante en la atracción de insectos polinizadores (57).

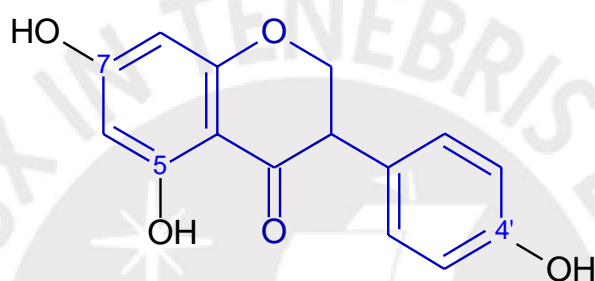
El color de las antocianinas depende del pH de la solución en la que se encuentre, esto se debe a la naturaleza de su estructura molecular (iónica). La gran variedad de colores se debe a diferentes factores como:

- La cantidad y posición de los grupos hidroxilo y metoxilo en la estructura base de las antocianidinas.
- El tipo, la cantidad y las posiciones en las que se unen las moléculas de azúcar.
- El grado y el agente de acilación del azúcar (41,59).



### 2.2.2.6. Las isoflavonas

Esta subclase se caracteriza por tener el anillo B unido al carbono C3 del anillo C en lugar de al C2 (por ejemplo, la Figura 11). Su distribución es muy limitada en el reino vegetal y se encuentran en cantidades importantes en algunas subfamilias de las leguminosas, ocasionalmente se encuentran en otras familias de angiospermas, musgos y gimnospermas. Otra característica sorprendente de las isoflavonas es su gran presencia en extractos de plantas lipófilas en estado libre y la relativa rareza de los derivados glicosídicos. Una de las características principales de la isoflavonas es su actividad estrogénica, debido a su capacidad de unirse a los receptores de estrógenos. Por otra parte su posible papel en la prevención del cáncer de mama y la osteoporosis son foco de atención de muchos investigadores (41,60,61).



(4',5,7-trihidroxiisoflavona)

Figura 11. Estructura química de la genisteína.

### 2.2.3. Flavonoides en los alimentos

A lo largo de los últimos años en el estudio de la medicina, se pudo evidenciar que una dieta pobre en nutrientes contribuye a la etiología de enfermedades de corazón y cáncer. Sin embargo, definir una dieta saludable es complicada debido a la complejidad de la composición de los alimentos que consumimos (53).

Hasta la fecha numerosas investigaciones pusieron en evidencia que el consumo adecuado de frutas y vegetales cumplen un papel importante en la protección y prevención de enfermedades, la mayoría de estas debidas o asociadas a los flavonoides. Por ejemplo, investigaciones in vitro han demostrado efectos potentes de flavonoides en sistemas de mamíferos que son potencialmente anticancerígenos y antiaterogénicos; además de la protección antioxidante del ADN y la lipoproteína de baja densidad, la modulación de la inflamación, la inhibición de la agregación plaquetaria, los efectos estrogénicos y la modulación de la expresión del receptor de adhesión (53).

### 2.2.3.1. Frutas y vegetales

Dentro de este grupo de alimentos los más abundantes son catequinas, flavonoles y proantocianidinas. En el caso de las frutas cítricas como naranja y limón, la presencia de flavanonas y flavonas son limitadas. Las catequinas son las más comunes dentro de las frutas, seguida de epicatequinas, ésteres de ácido gálico y procianidinas tipo B. Así mismo la quercetina es el flavonol más común y tiene como fuentes principales las bayas de sauco y arándanos. Por ejemplo, la mayoría de las variedades de fruta que se cultivan en el continente europeo contienen casi exclusivamente glicósidos de flavonol, principalmente de quercetina, seguida de kaempferol, que se encuentra en cantidades menores. Así mismo la isorhamnetina se produce principalmente en las peras y bayas de espino amarillo y la miricetina (grosellas negras, uvas negras, arándanos cultivados y silvestres). Sin embargo al presencia de flavonas solo se ha detectado en raras ocasiones y en cantidades pequeñas (53,62).

Por otra parte al igual que las frutas, debido a la variedad de vegetales, la cantidad de flavonoides también es variable, donde la quercetina y el kaempferol son los más frecuentes. Sin embargo, la presencia de procianidinas tipo B, glicósidos de flavona y flavonol, es muy poco común y en algunos casos nula. En la Tabla 5 se muestran los flavonoides mayoritarios de algunas frutas y vegetales (53,62).

Tabla 5. Flavonoides mayoritarios de algunas frutas y verduras.

| Clasificación | Producto   | Flavonoides mayoritarios  |
|---------------|--|---|
| Frutas        | uva negra, manzana, ciruelos azules                            | (-)-epicatequina  |
|               | pera, membrillo  | quercetina y kaempferol   |
|               | fresas   | (+)-catequina, (-)-galato de epicatequina, (-)-epigalocatequina y (+)-galocatequina |
|               | sauco, arándanos rojos   | quercetina  |
|               | grosellas y bayas  | kaempferol y miricetina   |
| Vegetales     | especies de <i>Allium</i> (ajo, cebolla, puerros y cebolletas) | quercetina  |
|               | <i>Brassicaceae</i> (brócoli, col, col rizada y repollo)       | quercetina, glicósidos de kaempferol y miricetina                                   |
|               | vainas verdes alargadas  | (-)-epicatequina, (+)-catequina y (-)-galocatequina                                 |
|               | rábano   | quercetina  |
|               | ají verde  | quercetina y luteolina  |

#### 2.2.4. Farmacocinética de flavonoides

El conocimiento sobre la farmacocinética de compuestos bioactivos es de gran importancia para la “interpretación de su actividad biológica in vivo a partir de los resultados obtenidos in vitro”. A pesar de muchas investigaciones científicas en este campo durante los últimos años, temas como el metabolismo, la distribución y el efecto de la actividad biológica de los flavonoides actualmente son objetos de interés y debate entre investigadores (41).

En la actualidad la ingesta de flavonoides se da de manera regular en la dieta, en base a mezclas complejas de diferentes compuestos tipo flavonoide junto a otras sustancias bioactivas. Después de la ingestión, los flavonoides están sujetos a modificación química dentro del tracto gastrointestinal por enzimas, para luego ser metabolizadas en la pared intestinal, el hígado y los tejidos periféricos, previa absorción. Las concentraciones de estas sustancias encontradas están por debajo del rango micromolar, lo que no implica que a bajas concentraciones no exista actividad biológica (63).

A la fecha se conoce que los flavonoles son reconocidos por el organismo como compuestos xenobióticos, los cuales se convierten en compuestos no tóxicos por medio de reacciones metabólicas, en este caso mediante reacciones enzimáticas de fase II, para finalmente liberarlos al torrente sanguíneo (41), todo este proceso se ilustra en la Figura 12.

“La transformación de los flavonoides es muy intensa” y se lleva a cabo en dos sitios:

1. En el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I, en las que se adicionan y/o exponen grupos polares.
2. En el colon, mediante la fase II de la biotransformación, donde la microbiota intestinal degrada los flavonoides no absorbidos, además de ser conjugados con glicina, ácido glucurónico y sulfatados para mejorar su solubilidad (64).

Finalmente la excreción ocurre por dos vías, las sustancias hidrofóbicas que se excretan junto con la bilis al duodeno y las hidrofílicas a las vías urinarias con la orina (41,64,65).

La evaluación de los efectos biológicos de los flavonoides, al igual que cualquier fármaco o componente alimenticio, está sujeta principalmente a su biodisponibilidad, donde la estructura química y los procesos de absorción, distribución y eliminación son factores que también influyen en este proceso (64). Los flavonoides presentan vías comunes de absorción y metabolismo, cada tipo de flavonoide con distinto grado de absorción debido a diferencias estructurales, propiedades como la estabilidad y conjugación, además de otros factores biológicos como la especificidad de los transportadores y la actividad de enzimas implicadas(41).

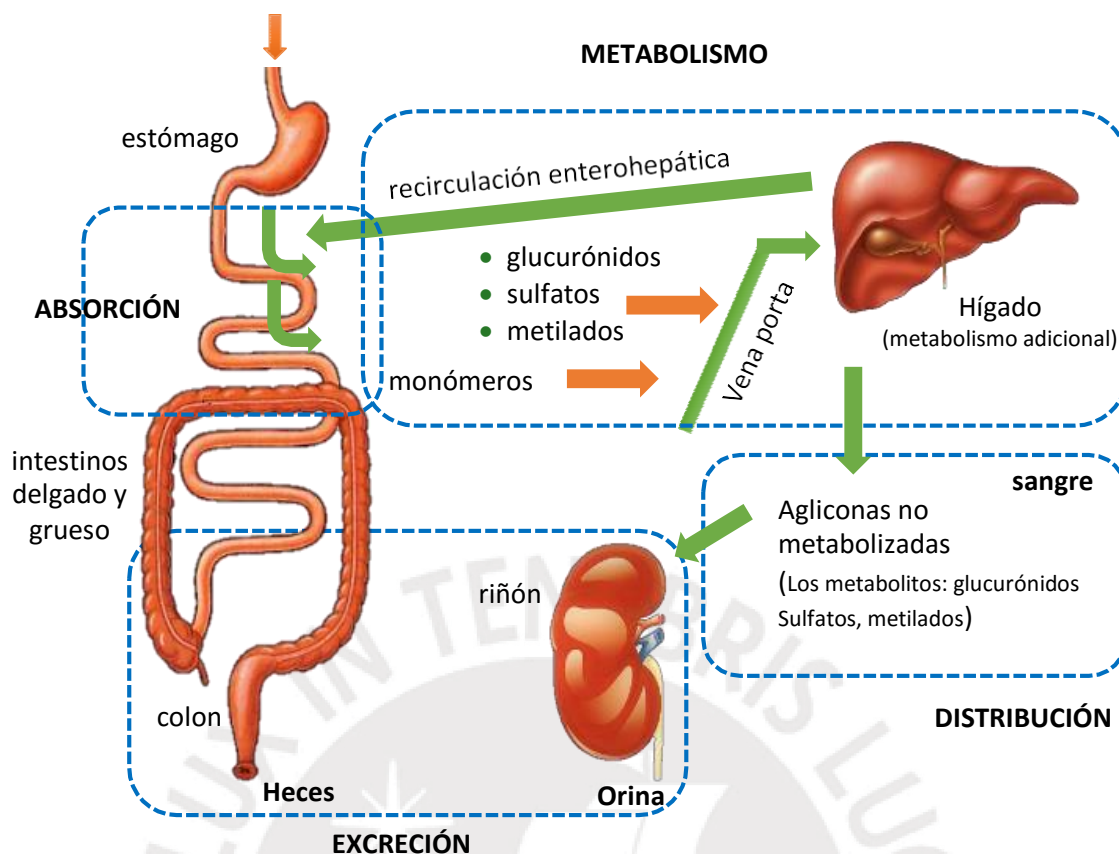


Figura 12. Esquema general de la farmacocinética de los flavonoides. Adaptado de Menéndez Soriano (41) y Heiss et al. (66).

### 2.2.4.1. Absorción

Debido a la relativa estabilidad de los flavonoides, estos resisten sin problema las condiciones de cocción, procesado de los alimentos y las transformaciones que se llevan a cabo en el estómago e intestino delgado durante el proceso de la digestión (41). La saliva, según muchos estudios realizados, tiene la capacidad de hidrolizar casi todos los glicósidos en pocos minutos; pero otros autores sostienen que los glicósidos de flavonoides llegan intactos al intestino delgado, donde son hidrolizados fácilmente por la flora fecal (67).

Los flavonoides en su forma glicósidica son más solubles que las agliconas (las que pueden ser transportadas a través de las membranas por difusión pasiva), en consecuencia su metabolismo será más rápido, por tanto se propuso la hidrólisis como primer paso del metabolismo. Los glicósidos son hidrolizados en su respectivo azúcar y aglicona por la lactasa/floridizina hidrolasa (situada en los vellos de la membrana del intestino delgado), por lo que el tipo de azúcar ligado a los flavonoides, es un determinante principal en su absorción y biodisponibilidad. Por otra parte, las agliconas tardan más tiempo en ser metabolizadas y muchas veces es en el colon donde finalmente llegan a ser absorbidas (41,65).

### 2.2.4.2. Metabolismo

Durante la absorción de los flavonoides a nivel intestinal, estos penetran en los enterocitos (células epiteliales encargadas de realizar la absorción de diversos nutrientes esenciales), donde el intestino delgado es el lugar principal donde se lleva a cabo la conjugación inicial de los flavonoides, además del intestino grueso (41).

Una vez que los metabolitos se encuentran en el hígado, estos son metabolizados mediante reacciones hepato-enzimáticas de fase II, donde se producen varios metabolitos conjugados (68). Las reacciones de conjugación (ayudan a preservar a los flavonoides en fluidos biológicos) que se llevan a cabo en el hígado son la hidrólisis, glucuronidación, *O*-metilación y sulfoconjugación, dichas reacciones se logran con la participación de catalizadores como la uridina 5'-difosfato glucuronosil transferasa, fenol-sulfotransferasa y catecol-*O*-metiltransferasa (41,67–69), los cuales se ilustran en la Figura 13.

Determinar el sitio primario del metabolismo de los flavonoides es muy importante, este hecho es posible gracias al empleo de diferentes dosis de flavonoides. Por ejemplo, en el caso de dosis elevadas de quercetina, su metabolismo se lleva a cabo principalmente en el hígado, de manera contraria a dosis inferiores lo hace en la mucosa intestinal. Así mismo, se llegó a determinar que la vida media de la quercetina en un medio de cultivo, es de 1 a 2 horas y la quercetina conjugada en la sangre humana in vivo, es de 10 a 22 horas aproximadamente (41).

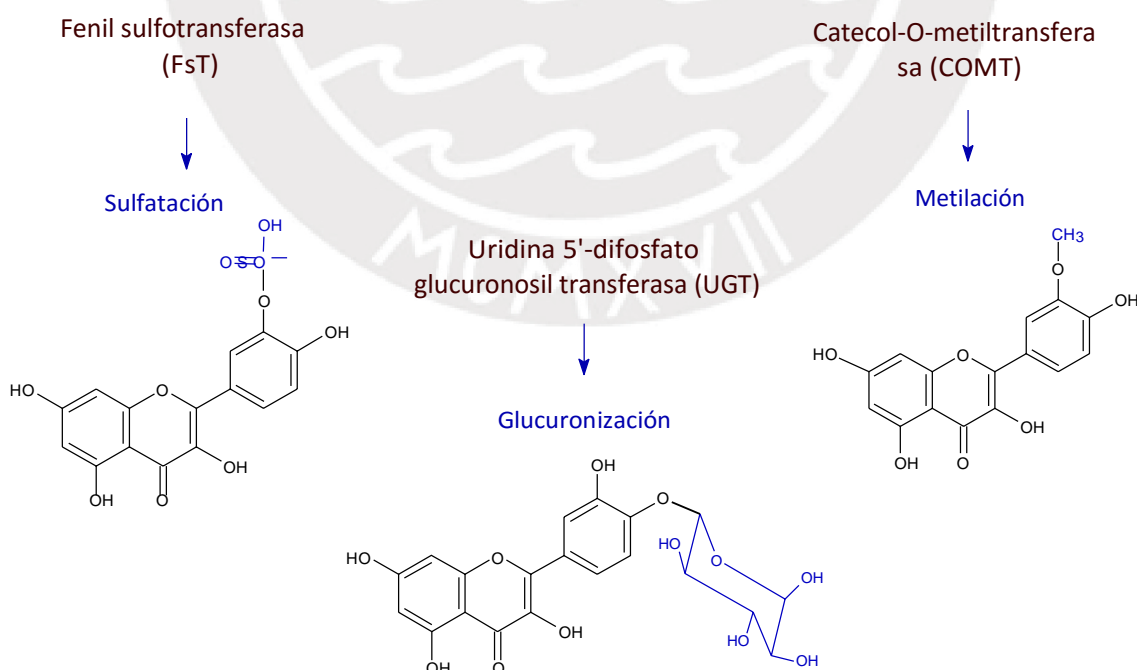


Figura 13. Enzimas responsables del metabolismo de flavonoides.

### 2.2.4.3. Distribución

La sangre es la encargada de proporcionar flavonoides a todos los tejidos bajo diferentes mecanismos de difusión, donde la velocidad de difusión dependerá de la estructura del flavonoide (forma de aglicona o glicósido) y la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica (41).

### 2.2.4.4. Excreción

Las vías principales de eliminación de los metabolitos en general son la vía renal y urinaria, dicho proceso se da aproximadamente entre las 17 - 25 horas después de su ingesta, tiempo suficiente para que lleguen al plasma y puedan acumularse, siempre que la ingesta sea continua (41).

## 2.3. ÁCIDOS GRASOS

Son cadenas hidrocarbonadas que presentan un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo, la longitud de la cadena es variable al igual que el grado de insaturación. Se encuentran ampliamente distribuidos en células animales y vegetales, mayormente formando parte de lípidos complejos, aunque también se hallan de forma libre. A nivel celular son una importante fuente de energía, debido a que las células son capaces de oxidarlos para obtener ATP, además de ser componentes indispensables de la membrana celular (70).

La manera de nombrar a los ácidos grasos se presenta en la Tabla 6, en el que cada uno tiene un nombre sistemático y una abreviatura, además algunos cuentan con un nombre común. La información del número total de átomos de carbono y dobles enlaces está contenida en el nombre sistemático. Por otra parte la abreviatura de la posición de los dobles enlaces en la cadena puede ser indicada de distintas formas (70), tal como se observa en la Figura 14.

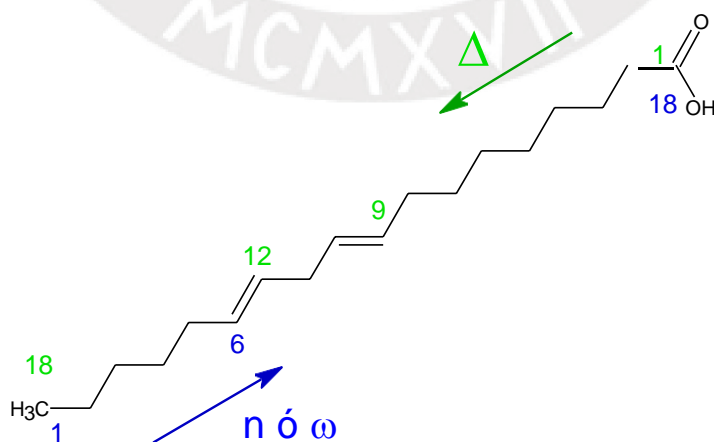


Figura 14. Estructura del ácido linoleico y su nomenclatura en el sistema "Δ", "ω" y "n".

- **Nomenclatura  $\Delta^x$ :** la numeración de los carbonos se empieza por el extremo -COOH y la posición de los dobles enlaces se indica con " $\Delta$ ".
- **Nomenclatura n-x o  $\omega$ -x:** la numeración se empieza por el extremo -CH<sub>3</sub> y la posición de los dobles enlaces se indica con " $\omega$ " o "n". Los dobles enlaces de los ácidos grasos polinsaturados están separados conjugados, solamente se especifica la posición del primer doble enlace (70).

Tabla 6. Nomenclatura de algunos ácidos grasos según los diferentes sistemas.  
Adaptado de Palou (70)

| NOMBRES                         |   | ABREVIATURAS                    |                  |
|---------------------------------|---|---------------------------------|------------------|
| Común                           | IUPAC   | Delta $\Delta$                  | $\omega$ o n     |
| Ácido palmítico                 | Ácido hexadecanoico                               | 16:0                            | 16:0             |
| Ácido esteárico                 | Ácido octadecanoico                               | 18:0                            | 18:0             |
| Ácido oleico                    | Ácido cis-9-octadecenoico                         | 18:1 $\Delta^9$                 | 18:1 $\omega$ -9 |
| Ácido linoleico, AL             | Ácido cis,cis-9,12-octadecadienoico               | 18:2 $\Delta^{9,12}$            | 18:2 $\omega$ -6 |
| Ácido $\alpha$ -linolénico, ALA | Ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico       | 18:3 $\Delta^{9,12,15}$         | 18:3 $\omega$ -3 |
| Ácido araquidónico              | Ácido cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico | 20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$       | 20:4 $\omega$ -6 |
| EPA                             | Ácido todo cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico     | 20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$    | 20:5 $\omega$ -3 |
| DHA                             | Ácido todo cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico   | 22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ | 22:6 $\omega$ -3 |

### 2.3.1. Tipos de ácidos grasos

Los ácidos grasos se clasifican en dos tipos principales, el cual se basa en el número de dobles enlaces presentes en la cadena alifática.

### 2.3.1.1. Ácidos grasos saturados (AGS)

Se caracterizan por no contener dobles enlaces en su estructura (cadena alifática), están presentes mayormente en grasas animales, entre los más comunes en la dieta son el butírico, láurico, mirístico, el palmítico y el esteárico (70).

La síntesis de ácidos grasos saturados en nuestro organismo se lleva a cabo principalmente en el hígado a partir de acetil-CoA, esta última proviene del metabolismo del exceso de carbohidratos consumidos. Por otra parte la enzima sintasa es la responsable de la producción del ácido palmítico, a partir del cual se derivan otros ácidos grasos mediante mecanismos de acortamiento, alargamiento o introducción de dobles enlaces en la cadena (70).

### 2.3.1.2. Ácidos grasos monoinsaturados (AGM)

Contienen un único doble enlace en la cadena alifática, que por lo general adopta la configuración *cis*. Por lo general se encuentran en grandes cantidades en aceites vegetales. Por ejemplo, el ácido oleico (18:1 o n-9) es el más importante en nuestra dieta debido a sus propiedades beneficiosas para la salud y su fuente principal es el aceite de oliva. Afortunadamente el ser humano es capaz de sintetizar ácidos grasos monoinsaturados y por consiguiente su incorporación en la dieta no es imprescindible (70).

### 2.3.1.3. Ácidos grasos poliinsaturados (AGP)

Presentan de 2 a 6 dobles enlaces, separados entre sí por un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-), es decir que se encuentran conjugados, todos en la configuración *cis*. Los ácidos AGP más frecuentes pertenecen a las series n-6 y n-3, más conocidas como omega 6 y omega 3, donde la posición del primer doble enlace se encuentra en el C-6 y C-3 respectivamente. Dentro de esta serie, el ácido linoleico (AL, 18:2n-6) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3n-3) son considerados como ácidos grasos esenciales para nuestro organismo, debido a que carecemos de enzimas capaces de catalizar la formación de dobles enlaces en las posiciones C-6 o C-3. Sin embargo cumplen funciones biológicas importantes, por tanto su consumo en la dieta es imprescindible (70).

El LA y el ALA están distribuidas casi en todas las grasas que forman parte de la dieta, sin embargo se encuentran en cantidades elevadas en los aceites vegetales. Las semillas de algunos frutos secos y de plantas en general albergan altas concentraciones de ALA (71).



El consumo de ácido linoleico y derivados demostró tener efectos positivos para la salud, como reducir la colesterolemia total y por consiguiente el colesterol ligado a las lipoproteínas de baja densidad LDL o comúnmente denominado colesterol malo (70).

En cuanto a la oxidación de los ácidos grasos en general, los AGP se oxidan con más facilidad que los saturados. Por otra parte se evidenció que los ácidos grasos que contienen dobles enlaces en configuración *trans* no presentan actividad biológica (70).

### 2.3.2. Importancia biológica y efectos en la salud humana

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en general cumplen diversas funciones biológicas de gran importancia tanto estructural como funcional, además de ser importantes en la dieta humana para la prevención y tratamientos de diferentes patologías. La importancia de los PUFAs en nuestro organismo se debe a dos aspectos, la primera por ser componente crítico de la célula y membrana de orgánulos y la segunda, por ser proveedores de precursores únicos que conducen a la producción de importantes metabolitos que regulan funciones biológicas críticas (72,73).

A la fecha se han evidenciado diversos posibles efectos positivos de los PUFAs en nuestro organismo, a continuación mencionamos algunos de ellos:

- Los ácidos grasos omega-3 en la prevención de enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide y las arritmias post infarto, además de prevenir la aparición de tumores hormonales como el cáncer de mama y de próstata (73). Así mismo inducen resistencia a la insulina en el músculo esquelético (factor importante en la patogénesis de la diabetes tipo 2) cuando estos se encuentran en mayor concentración en el plasma (74).
- Los ácidos grasos libres presentan actividades antibacteriales, antifúngicas, antivirales y antimicrobianas. Este amplio espectro los hacen atractivos para diversas aplicaciones como medicina, agricultura, conservación de alimentos y formulación de cosméticos o nutracéuticos. Además cabe recalcar que estos compuestos son abundantes en fuentes naturales y no tóxicos, en consecuencia son considerados seguros (75).
- La aplicación tópica de los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico en piel hiperpigmentada, estimulada por UV, presenta efecto de aclarado eficiente. Dicho efecto se le atribuye a la capacidad de los ácidos grasos en la inhibición de la producción de melanina por los melanocitos activos (76).

## 2.4. LA UVA

Es uno de los cultivos frutales (Figura 15) más antiguos domesticados por los seres humanos. Posee numerosos usos como en la elaboración de vinos, bebidas, jaleas y otros productos, que la han convertido en una de las plantas más importantes desde el punto de vista económico. Se cultiva en todos los continentes, en las regiones templadas donde la lluvia es suficiente, los veranos cálidos y secos, así como los inviernos relativamente suaves son patrones climáticos normales (77).



*Figura 15. Cultivo de uva, Perú.*

La fitoquímica compleja de la uva (fruto) se caracteriza por una amplia variedad de compuestos, la mayoría de los cuales han demostrado tener propiedades terapéuticas o promotoras de la salud. Entre ellos los flavonoides representan un amplio y común grupo de polifenoles naturales producidos por la vía de los fenilpropanoides; además de ser los más abundantes y ampliamente estudiados, han gozado de mayor atención entre los investigadores de uva en el último siglo.

Estudios recientes han demostrado que los efectos benéficos sobre la salud promovida por el consumo de uva y sus productos, se atribuyen a la mezcla única de compuestos polifenólicos. Los flavonoides, como el grupo más grande de polifenoles de uva, son los principales candidatos que se considera que tienen propiedades biológicas, como actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, antivirales, cardioprotectoras, neuroprotectoras y hepatoprotectoras (14,77), considerados además como los nutraceuticos más potentes en alimentos y productos fitofarmacéuticos (78–80).

Debido a las ventajas de la biotecnología moderna, que está basada en células vegetales como un método alternativo para la producción de nutracéuticos a partir de la uva y, el conocimiento de efectos benéficos en la salud (Figura 16), el estudio de uva se mantiene hasta la fecha.

Recientemente debido al alto impacto beneficioso para la salud, de los flavonoides de la uva, se la ha relacionado directamente a la llamada "Paradoja Francesa", término que se refiere a la "observación epidemiológica de la incidencia comparativamente baja de enfermedad coronaria en la población de la región mediterránea, a pesar de su dieta local rica en grasas saturadas". La tradición del consumo frecuente de vino tinto, que reduce el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, se informó como el principal factor contribuyente. Los flavonoides en el vino tinto son los fitoquímicos más factibles a ser los responsables de este fenómeno (81).

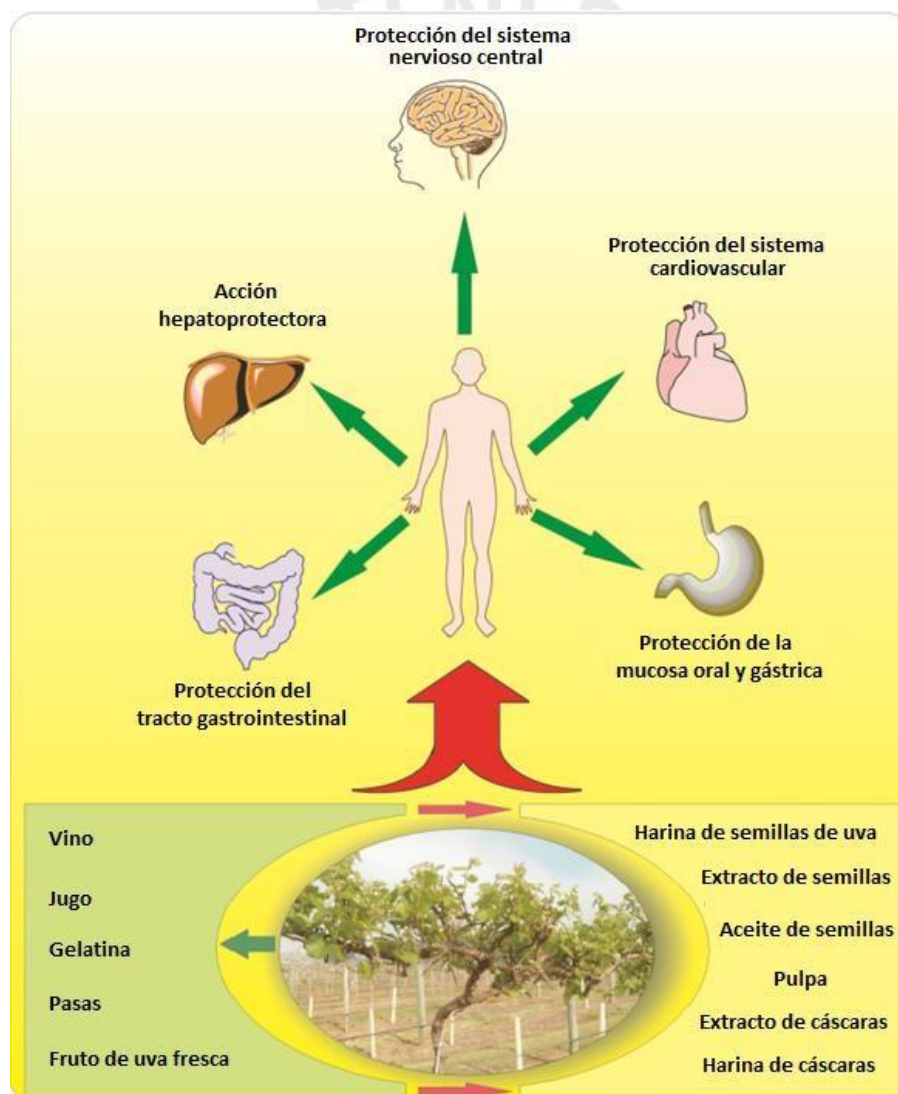


Figura 16. Productos primarios y subproductos de la uva, y sus efectos beneficiosos sobre el cuerpo. Tomado y adaptado de Georgiev et al. (77).

### 2.4.1. Composición fenólica de la uva

Los compuestos fenólicos (Tabla 7), en especial los flavonoides, se encuentran distribuidos principalmente en la capa epidérmica de la piel de la baya y las semillas, además de ser los principales grupos de compuestos fenólicos solubles en las uvas, así como los principales contribuyentes de las actividades biológicas en los productos derivados (37,77).

La gran cantidad de fenoles presentes en los vinos blancos son aquellos que proceden de la pulpa, mientras que en los tintos, se liberan además los presentes en la cáscara y las semillas. Los compuestos fenólicos no coloreados presentes en la piel, más abundantes, son flavan-3-oles en forma monomérica, tales como la catequina y epicatequina, mientras que los oligómeros o formas poliméricas, también llamados proantocianidinas o taninos condensados, están presentes principalmente en las semillas de uva. Estos compuestos pueden contener subunidades de ácido gálico (37).

Tabla 7. Distribución de los compuestos fenólicos mayoritarios en la baya.

| Partes de la uva | Compuestos fenólicos   |
|------------------|--|
| pulpa            | ácidos fenólicos y derivados   |
| cáscara          | flavonoles<br>antocianos (solo en uva tinta)   |
| semillas         | flavonoles<br>flavan-3-oles (monómeros como catequina y epicatequina)<br>taninos (oligómeros de flavan-3-oles) |

Los pigmentos responsables del color de las uvas rojas se denominan antocianinas, se localizan generalmente en la piel y aparecen durante el proceso maduración. Las antocianinas son las responsables del color del vino tinto, se derivan de cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina. Por lo general se producen como glicósidos y acilglicósidos, donde la más abundante es malvidina-3-O-glucósido (37,38).

La distribución de los polifenoles en el fruto de la uva (baya) no es del todo homogénea, sino que se concentran principalmente en las semillas (60 %), la piel (30 %) y en menor grado en la pulpa y tallos (menos de 10 %) (82). En la Tabla 8 se muestra algunos de los componentes fenólicos de bajo peso molecular presentes en la cáscara y semillas de uva durante el proceso de cosecha.

Tabla 8. Compuestos fenólicos de bajo peso molecular en semillas y cáscaras de uva.  
Fuente Fanzone et al. (83).

| Semillas de uva                  | Cáscaras de uva                                     |
|----------------------------------|---|
| Ácido gálico                     | Delfinidina-3-glucosido                             |
| (+)-catequina                    | Cianidina-3-glucósido                               |
| (-)-epicatequina                 | Petunidina-3-glucósido                              |
| Epicatequina-3-galato            | Peonidina-3-glucósido                               |
| Procianidina B                   | Malvidina-3-glucósido                               |
| Procianidina B2                  | Delfidina-3-(6''-acetil)glucósido                   |
| Procianidina B3                  | Cianidina-3-(6''-acetil)glucósido                   |
| Procianidina B4                  | Petunidina-3-(6''-acetil)glucósido                  |
| Procianidina B6                  | Peonidina-3-(6''-acetil)glucósido                   |
| Procianidina C1                  | Malvidina-3-(6''-acetil)glucósido                   |
| Tetrámero                        | Cianidina-3-(6''-p-cafeoil)glucósido                |
| Dímero de procianidina galato 1  | <i>cis</i> -Petunidina-3-(6''-p-cumaroil)glucósido  |
| Dímero de procianidina galato 2  | Malvidina-3-(6''-p-cumaroil)glucósido               |
| Trímero de procianidina galato 1 | Peonidina-3-(6''-p-cumaroil)glucósido               |
| Trímero de procianidina galato 2 | <i>Trans</i> -malvidina-3-(6''-p-cumaroil)glucósido |
|                                  | Ácidos hidroxibenzoico y derivados                  |
|                                  | Ácidos hidroxicinámico                              |
|                                  | Dihidroquercetina-3-gucósido                        |
|                                  | Dihidroquercetina-3-ramnósido                       |
|                                  | Dihidrokaempferol-3-gucósido                        |

#### 2.4.2. Residuos de la uva

Los tipos de residuos de uva producidos están estrechamente relacionados con los procedimientos llevados a cabo en el proceso de vinificación. El mayor porcentaje corresponde a los residuos orgánicos, donde los principales son el orujo (u hollejos) formados por la piel, pulpa y semilla de uva, que se obtienen después de prensar el mosto; el raspón que contiene los tallos y hojas que se separan previamente de las uvas en una etapa de despalillado y por último las lías de fermentación, precipitado que aparece en el vino formado por las levaduras, que se depositan al terminar el proceso de fermentación junto con otros compuestos insolubles en alcohol (tartratos, etc.) (84).

### 2.4.3. Caracterización analítica de los compuestos fenólicos

La caracterización química de compuestos fenólicos varían desde métodos tradicionales como los espectrofotométricos (ej. Folin Ciocalteu, el más usado), que permite cuantificar los polifenoles totales, hasta métodos que permiten realizar estudios más específicos a nivel estructural y/o molecular. Las técnicas instrumentales más empleadas para la separación, cuantificación e identificación de compuestos fenólicos son la Cromatografía de Gases (GC), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC) acoplados a espectrometría de masa (MS).

## 2.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos en general, viene a ser el resultado de la combinación de muchas de sus propiedades como su capacidad quelante de hierro, sequestradora de radicales libres y la inhibición de las oxidasas lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa, que en conjunto evitan “la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos” in vivo (65,85).

### 2.5.1. Métodos cuantitativos de determinación

Estos métodos se basan en la medida del daño oxidativo causado a un sustrato susceptible a ser oxidado, inducido por agente oxidante, de manera que la presencia de un antioxidante inhibe o reduce el daño. En consecuencia, los métodos miden la proporcionalidad de esta inhibición a la actividad antioxidante del compuesto. Los métodos establecidos difieren en muchos factores como el agente oxidante, tipo de sustrato, la técnica instrumental, medida del punto final y posibles reacciones que puedan ocurrir el medio de reacción (37). Existen dos metodologías para determinar este parámetro, in vitro e in vivo.

#### 2.5.1.1. Metodología in vitro

Pese a que no lograr reproducir completamente las condiciones fisiológicas de nuestro organismo y excluir la capacidad que tiene el proceso metabólico de un ser vivo de modificar la actividad de los compuestos antioxidantes, esta metodología permite diferenciar la acción antioxidante. Sin embargo muchos de los ensayos, con el fin de aproximarse a las condiciones fisiológicas, incluyen radicales propios de los sistemas biológicos (ej. ROO• y •OH) pero no siempre es posible alcanzar una completa reproducibilidad (86).

## Métodos directos

a. **Reacciones SET y HAT:** Ambas reacciones de transferencia de electrón (Single Electron Transfer, SET) y de un átomo de hidrógeno respectivamente (Hydrogen Atom Transfer, HAT), están basadas en la capacidad de detener el proceso de oxidación lipídica en cadena por medio de la reacción directa con los radicales libres (37,86).

b. **Oxidación de radicales:**

**DPPH:** el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Figura 17), en presencia del antioxidante logra ser capturado, hecho que conduce a una disminución de su absorbancia (37), la Figura 18 muestra un posible mecanismo de la reacción de un flavonoide con DPPH.

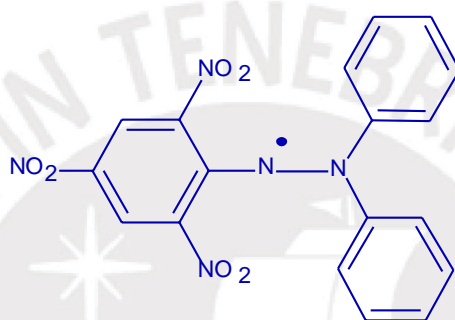


Figura 17. Estructura del radical DPPH•.

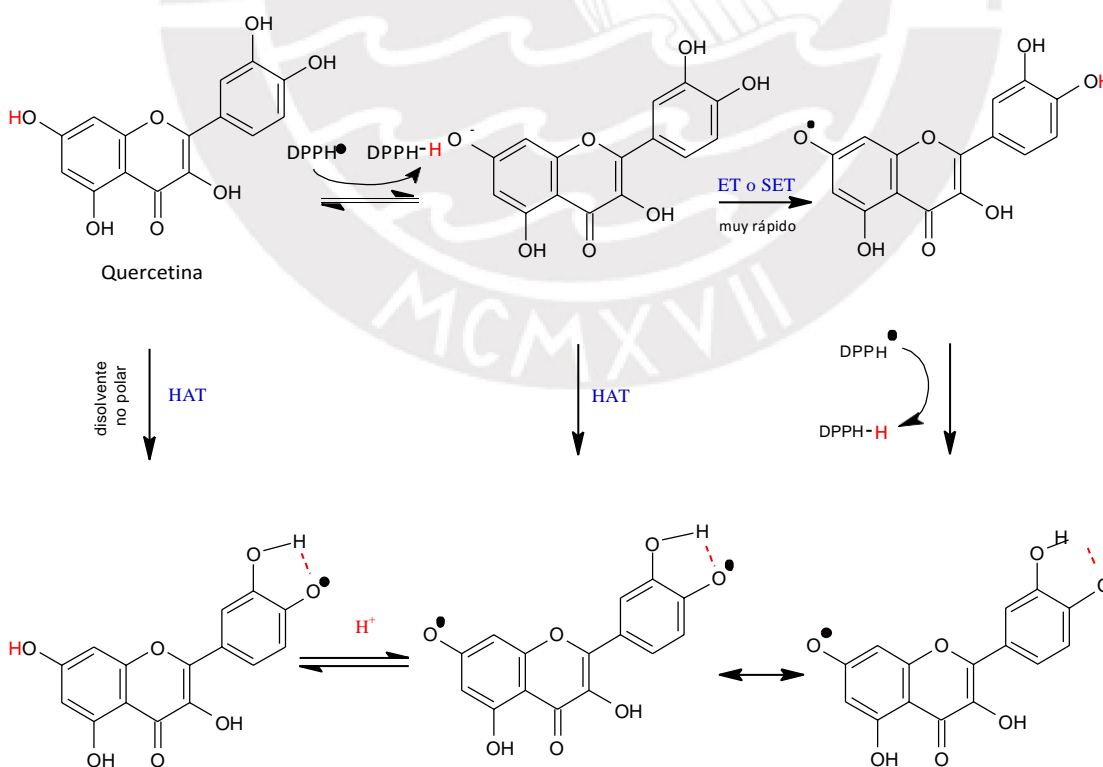


Figura 18. Posibles mecanismos para la reacción de quercetina con DPPH (87).

**TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)):** En este método se produce una reacción de tipo SET, que consiste en la captura del radical catiónico  $ABTS^{\bullet+}$  por el antioxidante, lo que genera una disminución de la absorbancia (el radical catiónico es coloreado), el cual se mide (37,86).

**ORAC (oxygen radical absorbance capacity):** Técnica basada en la medición de la pérdida de fluorescencia de una molécula con dicha propiedad, causada por la acción de radicales peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ) (37,86).

El método ORAC emplea radicales peróxido o hidroxilo que son especies reactivas de oxígeno (ROS) importantes fisiológicamente y por tanto de gran significancia. Por el contrario, los métodos de DPPH y TEAC (ABTS) emplean radicales libres que son extraños al organismo (37,86).

### Método indirecto - cuantificación de polifenoles

**Folin Ciocalteu:** Método colorimétrico que se usa para medir el contenido de fenoles totales, en el que se emplea el reactivo de Folin Ciocalteu (que contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico), carbonato de sodio y el estándar (ácido gálico). La reacción se lleva a cabo en medio básico, en el que se da un cambio en la coloración de la solución, de amarillo a un azul. Su determinación se realiza por espectrofotometría UV-Vis y la medida de la absorbancia del producto de reacción se lleva a cabo a 765 nm (88).(37).

## 2.6. ENFERMEDADES DEL ESTÓMAGO

### 2.6.1. GASTRITIS

Se define como una enfermedad inflamatoria aguda o crónica de la mucosa gástrica, producida por factores exógenos y endógenos (ver Tabla 9) que afectan al estómago (89,90). El término gastritis, al ser un concepto netamente histológico, no se trata de un proceso patológico homogéneo, sino de un grupo heterogéneo de enfermedades de etiología y mecanismo patogénico multifactorial (91).

La gastritis es una de las enfermedades (digestiva) más conocida a nivel mundial, su incidencia es variable a lo largo de las diferentes regiones y países. La frecuencia de esta enfermedad en el Perú es muy alta en sus tres regiones costa, sierra y selva. Según los reportes realizados por Valdivia (2011) y Ramírez et al. (2002), muestran que en nuestro país, la úlcera gástrica es de mayor incidencia que la úlcera duodenal, hecho que conlleva a la prevalencia del cáncer gástrico en la población (90,92).



Tabla 9. Factores que contribuyen al desarrollo de la gastritis (91).

| FACTORES EXÓGENOS   | FACTORES ENDÓGENOS  |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Helicobacter pylori</i></li> <li>• Antiinflamatorios no esteroideos, AINEs</li> <li>• Irritantes gástricos</li> <li>• Drogas (tabaco)</li> <li>• Alcohol</li> <li>• Cáusticos</li> <li>• Radiación</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido gástrico y pepsina</li> <li>• Bilis</li> <li>• Jugo pancreático</li> <li>• Urea (Uremia)</li> <li>• Inmunes</li> </ul> |

### 2.6.1.1. Clasificación

Las características de los diferentes tipos de gastritis, “basadas en criterios clínicos, factores etiológicos, endoscópicos o patológicos”, se muestran en la Tabla 10 (89,90,93).

Tabla 10. Clasificación de la gastritis y causas que conllevan a su desarrollo.

| Tipo                              | Características   | Causas   |
|-----------------------------------|---|--|
| <b>Gastritis aguda</b>            | Inflamación transitoria de la mucosa gástrica acompañada de múltiples erosiones.  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Consumo de alcohol, cigarro y uso de AINEs.</li> </ul>  |
| <b>Gastritis hemorrágicas</b>     | Inflamación frecuente de la mucosa gástrica con erosiones y múltiples úlceras superficiales agudas (en ocasiones con pequeñas petequias). | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ingesta de fármacos y AINEs.</li> <li>• Tratamientos radioterapéuticos, consumo de alcohol y drogas.</li> <li>• Hipoperfusión de la mucosa gástrica y reflujo biliar.</li> </ul>  |
| <b>Gastritis crónica</b>          | Inflamación de la mucosa, se presenta gradualmente durante un tiempo prolongado. Las lesiones son de carácter irreversible.               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Consumo reiterado de sustancias irritantes, alcohol, nicotina, AINES.</li> <li>• Reflujo biliar desde el duodeno.</li> <li>• Infección por <i>Helicobacter pylori</i>.</li> </ul> |
| <b>Gastritis tipo A o fúndica</b> | Tipo de gastritis muy poco frecuente. Causante de la anemia perniciosa. Predispone a desarrollar un cáncer de estómago.                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Deficiencia de la vitamina B12.</li> <li>• Debilitamiento de la pared del estómago.</li> </ul>  |
| <b>Gastritis tipo B</b>           | Más común que el tipo A. Afecta a la porción inferior del estómago cercano al píloro. Predispone a desarrollar un cáncer de estómago.     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infección crónica por la bacteria <i>Helicobacter pylori</i>.</li> </ul>  |

### 2.6.1.2. Tratamiento

#### Medidas terapéuticas generales

- Prescripción de dieta sin sustancias irritantes (ej. café, tabaco, alcohol y ají) y uso de medicamentos que contrarresten la agresión de la barrera gástrica.
- Citoprotectores de la mucosa gástrica (ej. sucralfato, bismuto y misoprostol).
- Antagonistas de receptores H<sub>2</sub>.
- Inhibidores de la bomba de protones (89,94).

#### Medidas de tratamiento específico

**Gastritis por AINEs:** El retiro y reducción de los medicamentos o la administración de la misma con algunos alimentos, pueden mejorar los síntomas. En el caso de síntomas persistentes se realiza un estudio histológico por medio de una endoscopia y en base a ello se trata sintomáticamente mediante el uso de:

- Sucralfato
- Misoprostol (análogo de prostaglandina),
- Antagonistas de receptores H<sub>2</sub> (Ranitidina)
- Inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, rabeprazol, pantoprazol, lansoprazol y esomeprazol) (89,90,94).

### 2.6.2. Úlcera péptica (UP)

Se trata de una enfermedad relativamente frecuente, de origen multifactorial, que actúa de forma aislada o combinada. Produce un desequilibrio entre los elementos agresivos y defensivos de la mucosa gastroduodenal, que se caracteriza por la presencia una lesión localizada o general de la mucosa gastroduodenal. Esta lesión penetra la capa de la mucosa o algunas veces la capa muscular del estómago y como resultado se forma una cavidad con inflamación aguda y crónica a su alrededor (95–97).

#### 2.6.2.1. Patogenia (causas)

Las variaciones en la producción de ácido (un aumento relativo o absoluto) o disminución de las defensas de la mucosa, producción de mucosa, bicarbonato, prostaglandinas y microflora colónica normal, predisponen a la enfermedad de úlcera péptica. Hace algún tiempo atrás, la producción excesiva de ácido clorhídrico era considerada la principal responsable de esta enfermedad, hasta el descubrimiento de un agente infeccioso denominado *Helicobacter pylori*.

Dentro del conjunto de los factores agresivos o citotóxicos están la pepsina, medicamentos como la aspirina, los antiinflamatorios no esteroideos y los ácidos biliares y aquellos mencionados en la Tabla 9 (98).

### **2.6.2.2. Epidemiología**

El uso de AINES (principalmente inhibidores COX-1), la infección por *Helicobacter pylori* y el estrés son los principales factores de riesgo para el desarrollo de úlcera péptica, entre los cuales el uso de AINES viene a ser la causa principal de esta enfermedad. Por otra parte, cabe mencionar otros factores no menos importantes como son la historia previa de enfermedades del paciente (enfermedad pulmonar obstructiva crónica EPOC, insuficiencia renal crónica IRC, enfermedad coronaria), personas mayores de 50 años, problemas de tabaquismo, consumo de bebidas alcohólicas, uso de antiagregantes plaquetarios como la aspirina, inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (las denominadas ISRS), vitamina K oral y glucocorticoides. Estos factores en conjunto con los AINEs incrementan la probabilidad de desarrollar una úlcera péptica (96).

### **2.6.2.3. Fisiopatología**

Son diversos los factores que contribuyen al desarrollo de la úlcera péptica, que tiene como consecuencia final la lesión de la mucosa gástrica o duodenal (96), y las formas más frecuentes de úlceras pépticas son inducidas por:

#### ***Helicobacter pylori***

Un bacilo espiral flagelado Gram-negativo, productor de ureasa, que habitualmente se adquiere en la infancia. Se encuentra cerca del 90 – 95 % en el estómago de pacientes con úlcera duodenal (UD) y del 60 - 80 % en aquellos que tienen úlceras gástricas (UG). Con la evidencia de la acción de *Helicobacter pylori* en pacientes infectados, la cual consistía en la modificación de la secreción de ácido en el estómago, se sabe que preferentemente coloniza el epitelio del tipo gástrico, este hecho conduce a una reducción de la población de células D (productoras de somatostatina) y como consecuencia, el aumento de la secreción ácida. La capacidad de adhesión de *Helicobacter pylori* a la superficie del epitelio celular permite su localización por debajo de la capa de moco; además, tiene la capacidad de crear un micro-entorno alcalino debida a la presencia del amonio, producto de la transformación de la urea gracias a la actividad de la ureasa (92,95,97).

## Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Estas lesiones se desarrollan como resultado de la administración de estos fármacos, que independientemente de la dosis, sean estas relativamente bajas, de consumo a corto, medio o largo plazo, pueden presentarse con diferentes intensidades. Estas variaciones guardan relación con la composición, características químicas del fármaco y la condición médica del paciente (95).

Los AINEs, fármacos ampliamente utilizados, de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, tienen la capacidad de inhibir las isoenzimas de ciclooxigenasa COX-1 y COX-2, responsables de la producción o síntesis de prostaglandinas (PG). Estas isoenzimas ejercen una función protectora de la mucosa gástrica, por medio del aumento tanto de la secreción de mucus como del bicarbonato, el flujo sanguíneo y la restauración epitelial. Por consiguiente, la inhibición de las isoenzimas altera los mecanismos de protección, lo que conlleva al ataque de la mucosa por los ácidos biliares, la pepsina y el ácido clorhídrico. A la fecha se ha determinado que los usuarios de AINEs desarrollan ambos tipos de úlcera tanto duodenal como gástrica (95–97)

## Estrés

A diferencia de las anteriores, este tipo de lesiones son indistinguibles y de menor incidencia. Usualmente se presenta en pacientes politraumatizados, con sepsis, enfermos con hipertensión endocraneal, pacientes que han sufrido shock hemorrágico, aquellos que han sido sometidos a ventilación mecánica o cirugía mutilante, en general aquellos intervenidos en unidades de cuidados intensivos (95).

### 2.6.2.4. Terapéutica de la Úlcera Péptica

Debido a que la úlcera se produce por un desequilibrio entre los factores agresivos y factores defensivos de la mucosa gastroduodenal, el tratamiento farmacológico se basa estrictamente en la restauración de este equilibrio y para ello se cuentan con tratamientos conocidos como farmacológicos y no farmacológicos (95).

## Tratamiento no farmacológico

Consiste en tomar las siguientes medidas higiénico-dietéticas.

- Abstención al consumo de bebidas alcohólicas, que ocasionan gastritis tras lesionar la barrera de la mucosa y a su vez retarda su cicatrización.
- Disminución del consumo de tabaco: factor causal (etiología) de la úlcera duodenal, retarda la cicatrización y aumenta la recurrencia.

- Disminución de la ingesta de leche y derivados: las proteínas lácteas y el calcio estimulan la secreción de ácido.
- Abstención del consumo de fármacos ulcerogénicos como el ácido acetilsalicílico, antiinflamatorios, corticoides, entre otros.
- Fijación de una dieta fraccionada, que conste de cinco o seis comidas al día, debidamente variadas y equilibradas (95).

### Tratamiento farmacológico

A la fecha existe una gran cantidad de medicamentos que contribuyen al tratamiento de la úlcera, en la búsqueda de dos objetivos que son conseguir el alivio sintomático y la cicatrización.

- Antihistamínicos  $H_2$  (antagonistas de los receptores  $H_2$ ): su mecanismo de acción consiste en inhibir de una forma específica y reversible, la acción de la histamina sobre el receptor  $H_2$  (encargado de la producción de HCl) de las células parietales. Debido al efecto sinérgico que ejerce la histamina sobre la secreción ácida, los antagonistas  $H_2$  disminuyen parcialmente la producción de HCl (originadas por acetilcolina y pentagastrina), reducen el volumen total de secreción y la concentración de  $H^+$ , lo que acelera la cicatrización de las úlceras. Entre los más comunes se tiene a la Ranitidina (la más utilizada), famotidina, cimetidina, nizatidina y finalmente la roxatidina (95,97).
- Inhibidores de la bomba de protones, IBP: son antisecretores más potentes que los bloqueadores  $H_2$ , debido a que son más rápidos y eficaces en lograr alivio sintomático y cicatrizar las lesiones gastroduodenales. Estos compuestos actúan de manera selectiva en la etapa final del proceso de secreción ácida, donde se encuentra la enzima  $H^+K^+ATPasa$  o bomba de protones, la cual expulsa iones  $H^+$  al medio gástrico para formar el HCl al encontrarse con el respectivo anión. Los inhibidores de la bomba de protones inhiben de manera irreversible a la  $H^+K^+ATPasa$  y conducen a una reducción continua de la secreción ácida, hasta la síntesis de nuevas enzimas. En la Figura 19 se ilustran estructuras de algunos inhibidores (95,97).
- Neutralizantes de la secreción ácida (antiácidos): este grupo farmacológico se compone de compuestos inorgánicos, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 11 (99), cuya característica común es neutralizar el HCl del estómago, lo que disminuye la acidez e inactiva las sales biliares y pepsinas. Se caracterizan por lograr un alivio sintomático inmediato y solamente se utilizan como medida de apoyo. Estas sustancias están compuestas de óxidos e hidróxidos de metales di- y tri-valentes, como el  $Ca^{2+}$  y  $Al^{3+}$  y otras sales (95,97).

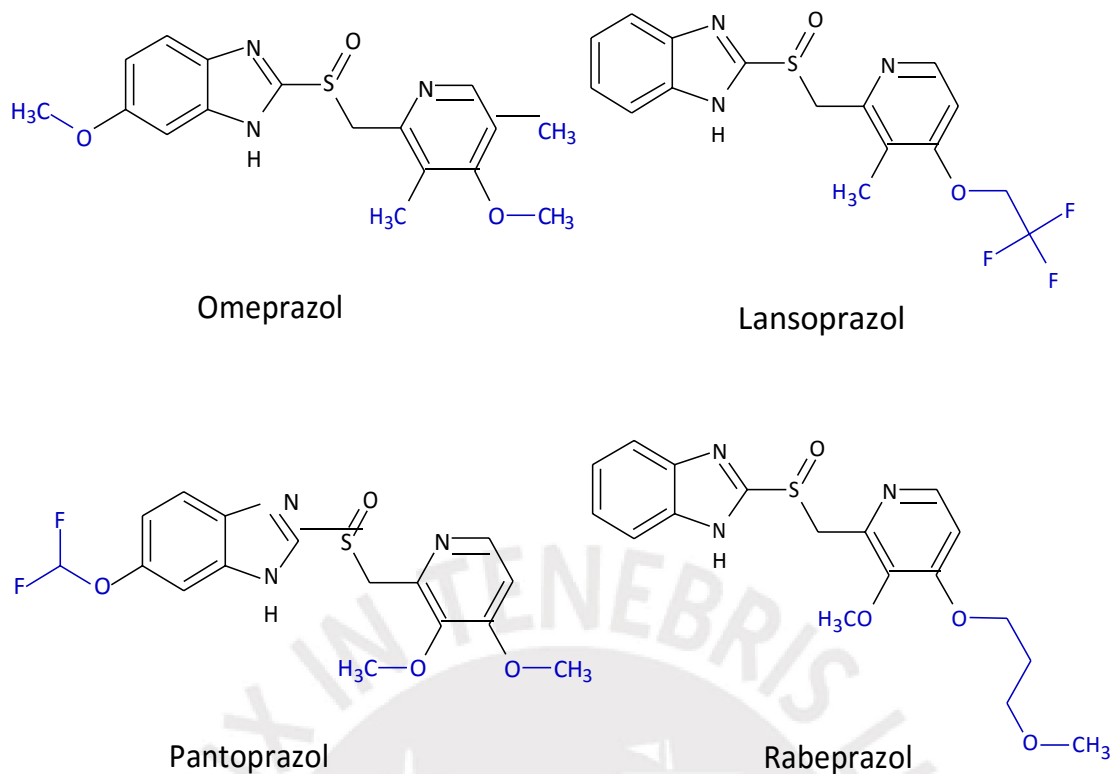


Figura 19. Estructura de inhibidores de la bomba de protones.

Tabla 11. Principales antiácidos.

| Antiácido           | Propiedad neutralizante | Sal formada en el estómago | Solubilidad de la sal |
|---------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|
| NaHCO <sub>3</sub>  | alta                    | NaCl                       | alta                  |
| CaCO <sub>3</sub>   | moderada                | CaCl <sub>2</sub>          | moderada              |
| Al(OH) <sub>3</sub> | alta                    | AlCl <sub>3</sub>          | baja                  |
| Mg(OH) <sub>2</sub> | alta                    | MgCl <sub>2</sub>          | baja                  |

- d. Protectores de la mucosa: este tipo de fármacos son apropiados para la cicatrización de las lesiones gastroduodenales sin inhibir la secreción ácida y ayudan a la protección de la mucosa. Sin embargo, debido a una baja eficacia para el control de la sintomatología y bajo poder cicatrizante, respecto a los antihistamínicos e inhibidores de la bomba de protones, actualmente su uso es mínimo o nulo (99).

- e. Erradicadores de *Helicobacter pylori*: el principal objetivo de este tratamiento es alcanzar la erradicación total del microorganismo, mas no la eliminación o aclaramiento (100). Dentro de este grupo de compuestos se encuentran claritromicina (Figura 20), amoxicilina, nitroimidazoles, tetraciclinas, sales de bismuto coloidal y la combinación de claritromicina y amoxicilina con los inhibidores de bomba de protones.

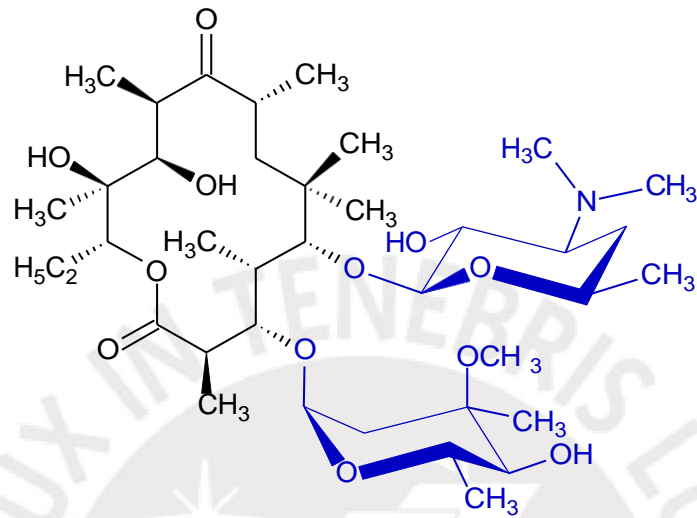


Figura 20. Estructura química de la claritromicina.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Reactivos y equipos

##### Reactivos

- Sulfato de sodio anhidro,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$
- Hidróxido de potasio, KOH
- Estándar FAMES (Resteck)
- Ácido sulfúrico,  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- Ácido acético glacial
- Carbonato de sodio,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- Folin Ciocalteu
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)
- Ranitidina (Farmindustria)
- Naproxeno (Farmindustria)
- Halatal-Sanivet
- Hexano
- Metanol
- Metanol HPLC
- Etanol
- Butanol
- Acetato de etilo
- Cloroformo
- Éter de petróleo

##### Equipos

- Molinillo eléctrico, BOSCH
- Estufa
- Baño con Ultrasonido
- Espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda850 , laboratorio de Instrumentación, Sección Química-PUCP
- Cromatógrafo de gases, GC FID 7890A, laboratorio de instrumentación Sección Química-PUCP
- Reactor de fluidos supercríticos, Supercritical Fluid Inc, Laboratorio de Procesos Industriales - ITEPA
- UHPLC ESI MS-MS\*
- Balanza analítica\*\*, Mettler (precisión de 0,001 g)
- Equipo de disección\*\*, Accumax

\*Ultra cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un espectrofotómetro ESI- MS/MS Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate RSLC 3000, Universidad de Antofagasta, Chile.

\*\* Materiales utilizados en el laboratorio de Productos naturales de la Universidad Privada Norbert Wiener



### 3.2. Origen y acondicionamiento de la muestra

El orujo de uva (Figura 21), se obtuvo de una empresa vitivinícola, ubicada en la ciudad de Ica. Las muestras se recibieron en bolsas de polietileno y mantuvieron a una temperatura aproximada de 4 °C durante su transporte y almacenamiento y en todo momento se evitó el contacto con la luz.



*Figura 21. Orujo de uva de la variedad Malbec.*

La selección de las semillas del orujo se realizó manualmente con ayuda de pinzas y mallas; posteriormente se procedió con el secado en una estufa a una temperatura de 45 °C, por aproximadamente 48 horas hasta alcanzar peso constante.

Las semillas previamente secadas, se sometieron a un proceso de molienda en un molinillo eléctrico para obtener un tamaño de partícula aproximando de 0,5 mm (Figura 22), para facilitar el proceso de extracción.



*Figura 22. Semillas de uva seca y molida.*

### 3.3. Determinación del perfil de ácidos grasos

#### 3.3.1. Extracción.

A la semillas de uva, previamente secada y molida, se le extrajo el aceite por dos métodos, el tradicional por Soxhlet (ES), siguiendo la metodología propuesta por Da Porto et al. (4) y lo propio con fluidos supercríticos (FS), se basó en el método desarrollado por Fiori et al. (101).

La extracción por el método Soxhlet se llevó a cabo haciendo uso de n-hexano como solvente, la relación muestra-solvente fue de 1:6 y el tiempo de extracción de 3 a 4 horas, se enfrió y se concentró en un rotavapor, a la temperatura de 45 °C. Posteriormente se calculó el rendimiento de extracción y el aceite (ES) se almacenó en refrigeración a 4 °C para su análisis posterior. El rendimiento se obtuvo en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Cantidad de aceite obtenido}}{\text{Cantidad de muestrainicial}} \times 100 \%$$

En la extracción por el método de fluidos supercríticos, fue empleado el equipo Supercritical Fluid Extractor STF-150 (Supercritical Fluid Technology, USA), el cual incluye una bomba neumática, un extractor de 100 cm<sup>3</sup> con sistema de calentamiento hasta 100°C, válvulas de control y bloqueo de CO<sub>2</sub> supercrítico, así como un medidor de flujo de CO<sub>2</sub>. En cada extracción se utilizaron 30 g de semillas con diámetro medio de partícula de 388.14 μm, flujo de salida de CO<sub>2</sub> de 5 pies<sup>3</sup>/h y tiempo estático de extracción de 30 min. Las muestras fueron obtenidas bajo diferentes condiciones definidas de presión, temperatura, flujo y tiempo dinámico de extracción.

Las muestras fueron obtenidas bajo las siguientes condiciones:

1. Muestra 20: P = 6615 bar, T = 50°C, Flujo = 5 pies<sup>3</sup>/h, t. dinámico de extracción = 30 min
2. Muestra 28: P = 7655 bar, T = 68°C, Flujo = 5 pies<sup>3</sup>/h, t. dinámico de extracción = 180 min.

#### 3.3.2. Transesterificación

La obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Fiori et al. (101) con algunas modificaciones, en el que se usó hidróxido de potasio (catalizador), metanol (MeOH) y el aceite de semilla de uva obtenido. Este proceso se llevó a cabo en dos etapas:

- a. **Reacción de transesterificación:** se llevó a cabo en un equipo que consta de un balón de 50 mL con su respectivo sistema de refrigeración y plancha con agitación.
- Se preparó una disolución del catalizador en metanol (KOH 0,5 M).
  - Se cargó el aceite en el balón (aproximadamente 0,5 g).
  - Se añadieron 10 mL de la disolución del catalizador.
  - La temperatura se mantuvo entre 65 y 70 °C, bajo agitación durante 3 horas.
- b. **Separación y purificación:** se llevó a cabo mediante el proceso de partición líquido-líquido (l-l), decantación y evaporación (Figura 23).

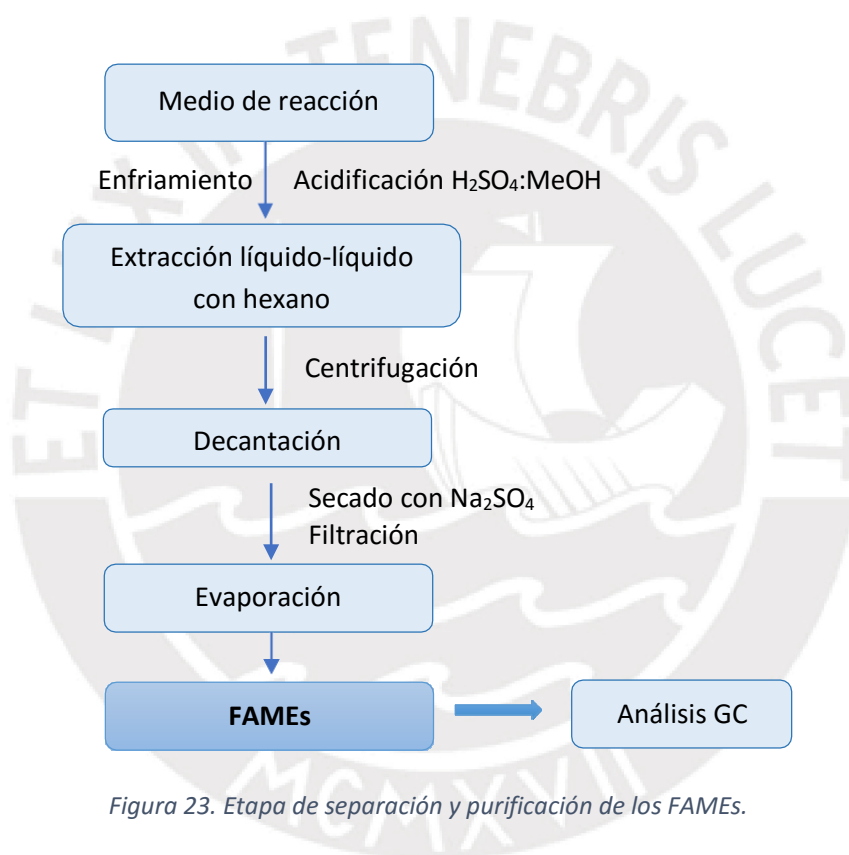


Figura 23. Etapa de separación y purificación de los FAMES.

### 3.3.3. Análisis GC-FID

Después de la transesterificación, los FAMES obtenidos fueron analizados en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). La identificación de los ácidos grasos, se realizó por comparación de los tiempos de retención de un estándar de ésteres metílicos de 28 componentes FAMES (NLEA Mix 28 componentes) y una curva de calibración construida tomando 6 concentraciones diferentes. Las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de las muestras y la curva de calibración fueron:

| Equipo                   | Cromatógrafo Agilent   |
|--------------------------|--|
| Detector                 | FID  |
| Columna                  | DB-26 (Cianopropilo al 50 %, dimetilpolisiloxano al 50 %)                                      |
| Temperatura de columna   | 50 – 100 °C (12 min) a 5°/min; 100 – 150 °C (5 min) a 10°/min; 150 – 230 °C (18 min) a 20°/min |
| Temperatura de inyector  | 250 °C   |
| Temperatura de detector  | 300 °C   |
| Gas portador             | He   |
| Flujo del H <sub>2</sub> | 30 mL/min  |
| Volumen de inyección     | 1 µL   |
| Split                    | 1:10   |

### 3.4. Compuestos fenólicos y su cuantificación

#### 3.4.1. Extracción de compuestos fenólicos.

Se realizó por maceración de las semillas de uva, previamente desgrasadas, con metanol de forma exhaustiva a temperatura ambiente, bajo oscuridad. Para ello se pesaron aproximadamente 100 g de semillas desgrasadas, se trasvasó a un matraz de 500 mL y se extrajo con metanol, con agitación constante. Se juntaron los extractos, se filtraron y posteriormente fueron concentrados a sequedad con la ayuda de un rotavapor, según se muestra en la Figura 24. Finalmente, los extractos secos se almacenaron bajo refrigeración para su uso posterior.

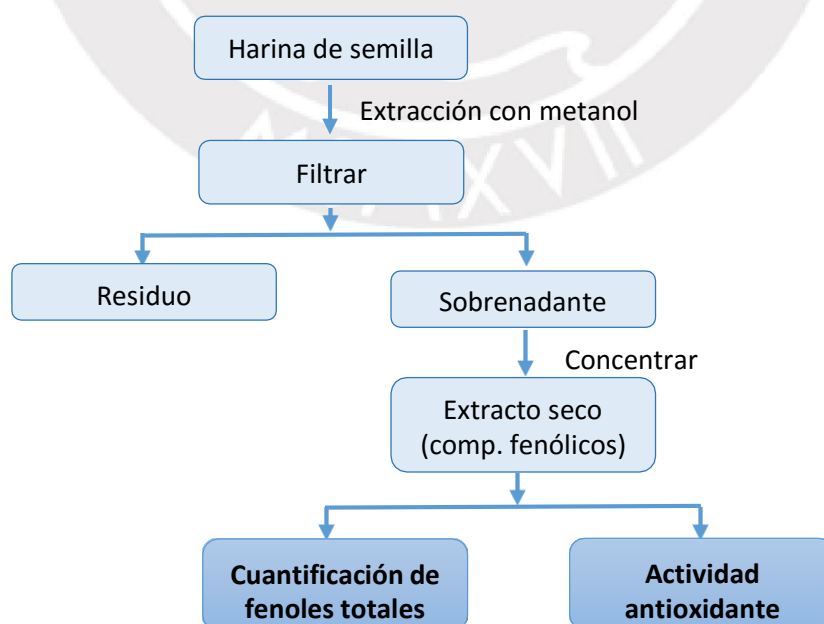


Figura 24. Procedimiento de extracción de compuestos fenólicos.

### 3.4.2. Cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico

Para la determinación cuantitativa de compuestos fenólicos totales del extracto, se usó el reactivo de Folin Ciocalteu, de acuerdo con el método desarrollado por Yu et al. (102) con algunas modificaciones. Se mezcló un volumen determinado de extracto metanólico, a una concentración 1 mg/mL (M10, M20 y M40) con reactivo de Folin Ciocalteu, carbonato de sodio al 7,5 % y agua destilada. Después de 1 hora de reacción a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro (ver Tabla 12).

Tabla 12. Reactivos utilizados en la determinación de fenoles totales.

| Reactivos                                 | Blanco | Muestras |        |        |
|---|--------|----------|--------|--------|
|   |        | M10      | M20    | M40    |
| <b>Volumen</b>                            | ---    | 10 µL    | 20 µL  | 40 µL  |
| <b>Folin Ciocalteu</b>                    | 450 µL | 450 µL   | 450 µL | 450 µL |
| <b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5 %</b> | 4 mL   | 4 mL     | 4 mL   | 4 mL   |
| <b>Aforar (H<sub>2</sub>O) a:</b>         | 10 mL  | 10 mL    | 10 mL  | 10 mL  |

Para el cálculo correspondiente se usó ácido gálico como estándar, con el cual se procedió a realizar una curva de calibración de 6 puntos, en un rango de concentración entre 1 a 16 ppm a partir de una solución de ácido gálico de 1 mg/mL (ver Tabla 13). Se tomaron mediciones por triplicado y los resultados se expresaron en mg de ácido gálico (AG) por gramo harina de semillas de uva.

Tabla 13. Estándar y reactivos utilizados para la curva de calibración.

| Reactivos                                 | Blanco | Estándares |        |        |        |        |        |
|---|--------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|   |        | 1 ppm      | 3 ppm  | 6 ppm  | 9 ppm  | 12 ppm | 16 ppm |
| <b>Volumen</b>                            | ---    | 10 µL      | 30 µL  | 60 µL  | 90 µL  | 120 µL | 160 µL |
| <b>Folin Ciocalteu</b>                    | 450 µL | 450 µL     | 450 µL | 450 µL | 450 µL | 450 µL | 450 µL |
| <b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5 %</b> | 4 mL   | 4 mL       | 4 mL   | 4 mL   | 4 mL   | 4 mL   | 4 mL   |
| <b>Aforar (H<sub>2</sub>O) a:</b>         | 10 mL  | 10 mL      | 10 mL  | 10 mL  | 10 mL  | 10 mL  | 10 L   |

### 3.5. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante del extracto metanólico se evaluó por el método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) in vitro, propuesto por Barrón y colaboradores (103) con algunas modificaciones, el cual consiste en la variación de la concentración de radicales libres DPPH• inicial y final de la reacción, a condiciones adecuadas de temperatura y en oscuridad, donde se produce la estabilización del radical por los diferentes compuestos antioxidantes presentes en las soluciones del extracto, preparado a distintas concentraciones y posteriormente, se mide la absorbancia del DPPH a 515 nm.

Se preparó una solución metanólica del extracto seco, obtenido en la etapa previa, a una concentración de 1 mg/mL, a partir de la cual se obtuvieron diferentes diluciones y seguidamente se les añadió una solución de DPPH• a una concentración de 20 ppm en metanol. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas, luego se procedió a la lectura de la absorbancia. El mismo proceso se repitió con una solución estándar de ácido ascórbico (vitamina C), a una concentración de 1 mg/mL. Las proporciones de los reactivos utilizados tanto para el extracto metanólico como para el ácido ascórbico fueron las mismas, las cuales se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Reactivos empleados en la determinación de la actividad antioxidante.

| [Extracto / estándar] µg/mL | Volumen (µL) extracto | Volumen (µL) MeOH | Volumen (mL) DPPH |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Blanco                      | ---                   | 3                 | ---               |
| 0                           | 0                     | 1                 | 3                 |
| 10                          | 10                    | 990               | 3                 |
| 15                          | 15                    | 995               | 3                 |
| 20                          | 20                    | 980               | 3                 |
| 25                          | 25                    | 975               | 3                 |
| 30                          | 30                    | 970               | 3                 |
| 35                          | 35                    | 965               | 3                 |
| 40                          | 40                    | 960               | 3                 |
| 50                          | 50                    | 950               | 3                 |
| 60                          | 60                    | 940               | 3                 |

### 3.6. Determinación del perfil de compuestos fenólicos mediante UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS

El análisis se realizó gracias a la colaboración del Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad de Antofagasta (Chile), en un equipo UHPLC con detector PDA (arreglo de diodos) acoplado con un ESI-Orbitrap-MS (con una ionización por electrospray).

La determinación se realizó según la metodología propuesta por Simirgiotis et al. (104), para ello se pesó 5 mg de extracto metanólico seco, se disolvió con 5 mL de metanol frío con la ayuda de un baño de ultrasonido. Una vez obtenida la solución, esta se procedió a filtrar a través de una membrana microporosa de 0,45  $\mu\text{m}$  (PTFE) y finalmente se trasvasó a un vial. Las condiciones de trabajo de la cromatografía líquida se describen a continuación (104):

| <b>Condiciones de ultracromatografía líquida</b> |   |
|--|---|
| Columna  | UHPLC C18 (Acclaim, 150 mm, 4,6 mm ID, 5 $\mu\text{m}$ )  |
| Temperatura de columna                           | 25 °C   |
| Fase móvil A                                     | 1 % de solución acuosa fórmica  |
| Fase móvil B                                     | acetonitrilo  |
| Gradiente  | 5 % B (0 – 5 min), 5 – 30 % B (5 min), 30 % B (5 min), 30 – 70 % B (5 min), 70 % B (5 min) y 70 – 5% B (10 min) |
| Detección  | 200 – 800 nm  |
| Equilibrado de columna                           | 12 min  |
| Velocidad de flujo                               | 1 mL/min  |
| Volumen de inyección                             | 10 $\mu\text{L}$  |
| Temperatura del automuestreador                  | 10 °C   |

### 3.7. Evaluación del efecto gastroprotector

Se evaluó el efecto gastroprotector de los extractos metanólico y butanólico obtenidos de la semilla de uva, para ello se siguió el modelo de úlcera gástrica inducida por Naproxeno (94), en ratas de la cepa Holtzman, adquiridas en el bioterio de Facultad de Ciencias de la Universidad Cayetano Heredia. Las ratas utilizadas fueron entre machos y hembras de tres meses de edad.

### 3.7.1. Obtención de los extractos

Para el proceso de extracción se siguió la metodología propuesta por Toso & Skliar (14), la cual se detalla en la Figura 25.

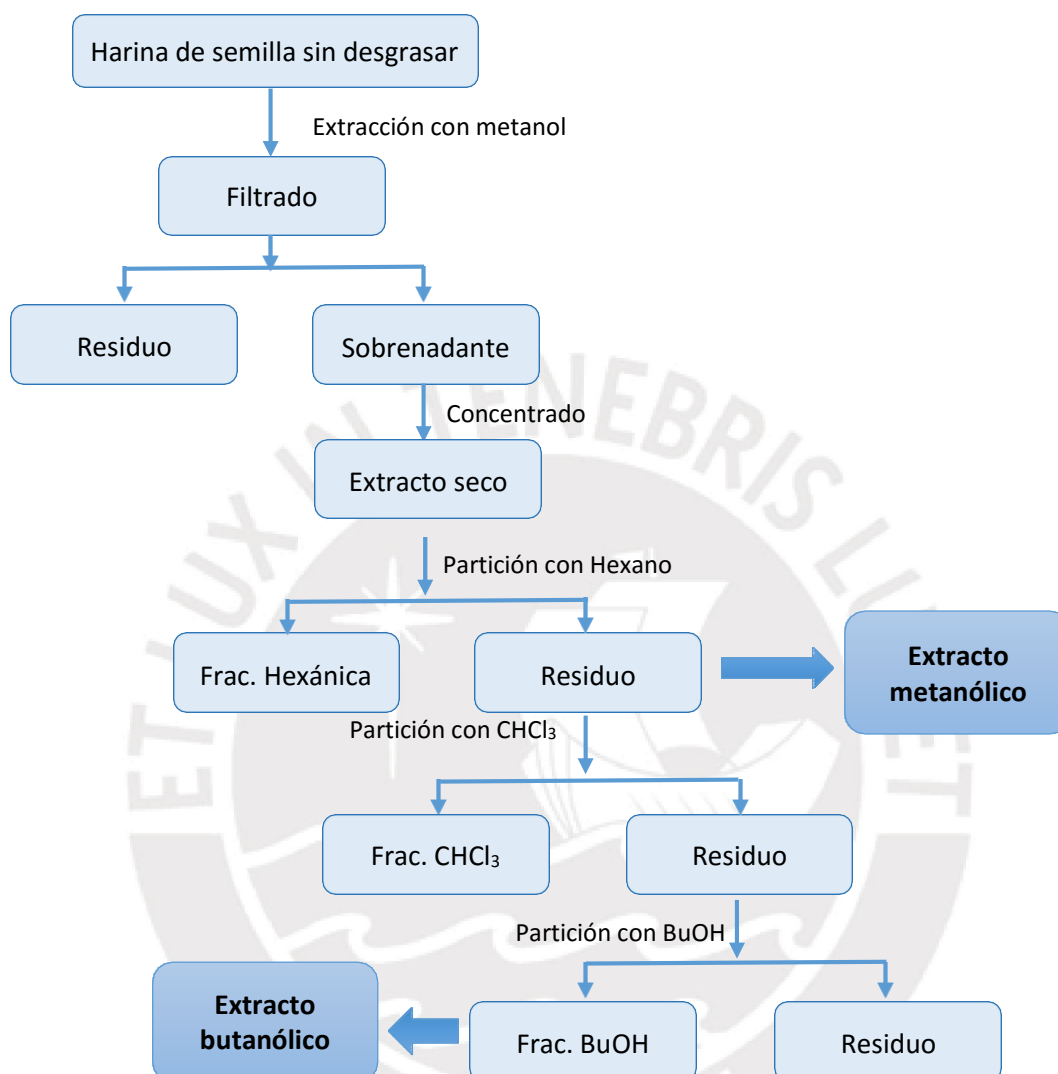


Figura 25. Proceso de obtención de los extractos alcohólicos de semillas de uva.

El procedimiento empezó con harina de semillas de uva, seca y sin desgrasar, la primera extracción se realizó con metanol, seguida de extracciones sucesivas líquido-líquido con diferentes solventes como hexano (desgrasado), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y butanol ( $\text{BuOH}$ ). Finalmente se obtuvo dos extractos secos, metanólico y butanólico, los cuales resaltan en la Figura 25. La temperatura de trabajo durante el proceso de extracción y concentración, fue por debajo de  $45\text{ }^\circ\text{C}$ , con el fin de disminuir la actividad de los componentes bioactivos, por efecto de la temperatura.



### 3.7.2. Estudio farmacológico

#### 3.7.2.1. Preparación de los animales de experimentación (ratas)

Se trabajó con 40 ratas macho ( $280 \pm 35$  g de peso) y 30 ratas hembra ( $180 \pm 35$  g de peso) de la cepa Holtzman. El período de aclimatación fue de 5 días en el bioterio del laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Norbert Wiener, a la temperatura de  $19$  a  $25 \pm 2,0$  °C.

#### 3.7.2.2. Determinación del índice de úlcera gástrica

Para la evaluación de esta actividad se trabajó con 70 ratas. Las sustancias utilizadas fueron Ranitidina (como fármaco patrón) a una dosis de 150 mg/kg, Naproxeno (como agente ulcerogénico) a una dosis de 550 mg/kg, extracto metanólico y butanólico a diferentes concentraciones, según se detalla en la Tabla 15, halatal-Sanivet (veneno), agua destilada. Todas administradas por vía oral, utilizando una cánula metálica.

Tabla 15. Tratamientos aplicados para la determinación del efecto gastroprotector.

| Grupo    | Tratamiento                         |   |
|----------|-------------------------------------|---|
| Grupo 1  | Control negativo                    | Únicamente agua destilada 1 mL/100 g de peso corporal |
| Grupo 2  | Úlcera gástrica inducida (U.G.I)    | Naproxeno sódico 550 mg/kg                            |
| Grupo 3  | Patrón                              | Ranitidina 150 mg/kg + Naproxeno 550 mg/kg            |
| Grupo 4  | Tratamiento con extracto metanólico | 200 mg/kg + Naproxeno 550 mg/kg                       |
| Grupo 5  |                                     | 400 mg/kg + Naproxeno 550 mg/kg                       |
| Grupo 6  |                                     | 600 mg/kg + Naproxeno 550 mg/kg                       |
| Grupo 7  |                                     | 800 mg/kg + Naproxeno 550 mg/kg                       |
| Grupo 8  | Tratado con extracto butanólico     | 200 mg/kg + Naproxeno 550 mg/kg                       |
| Grupo 9  |                                     | 400 mg/kg + Naproxeno 550 mg/kg                       |
| Grupo 10 |                                     | 600 mg/kg + Naproxeno 550 mg/kg                       |

El total de ratas se dividió aleatoriamente en 10 grupos de siete miembros cada uno (conformada por 4 machos y 3 hembras). Todas las ratas fueron pesadas y etiquetadas para la determinación de la dosis adecuada de las soluciones preparadas e identificación de las mismas respectivamente. Los detalles del procedimiento se muestran en la Figura 26.

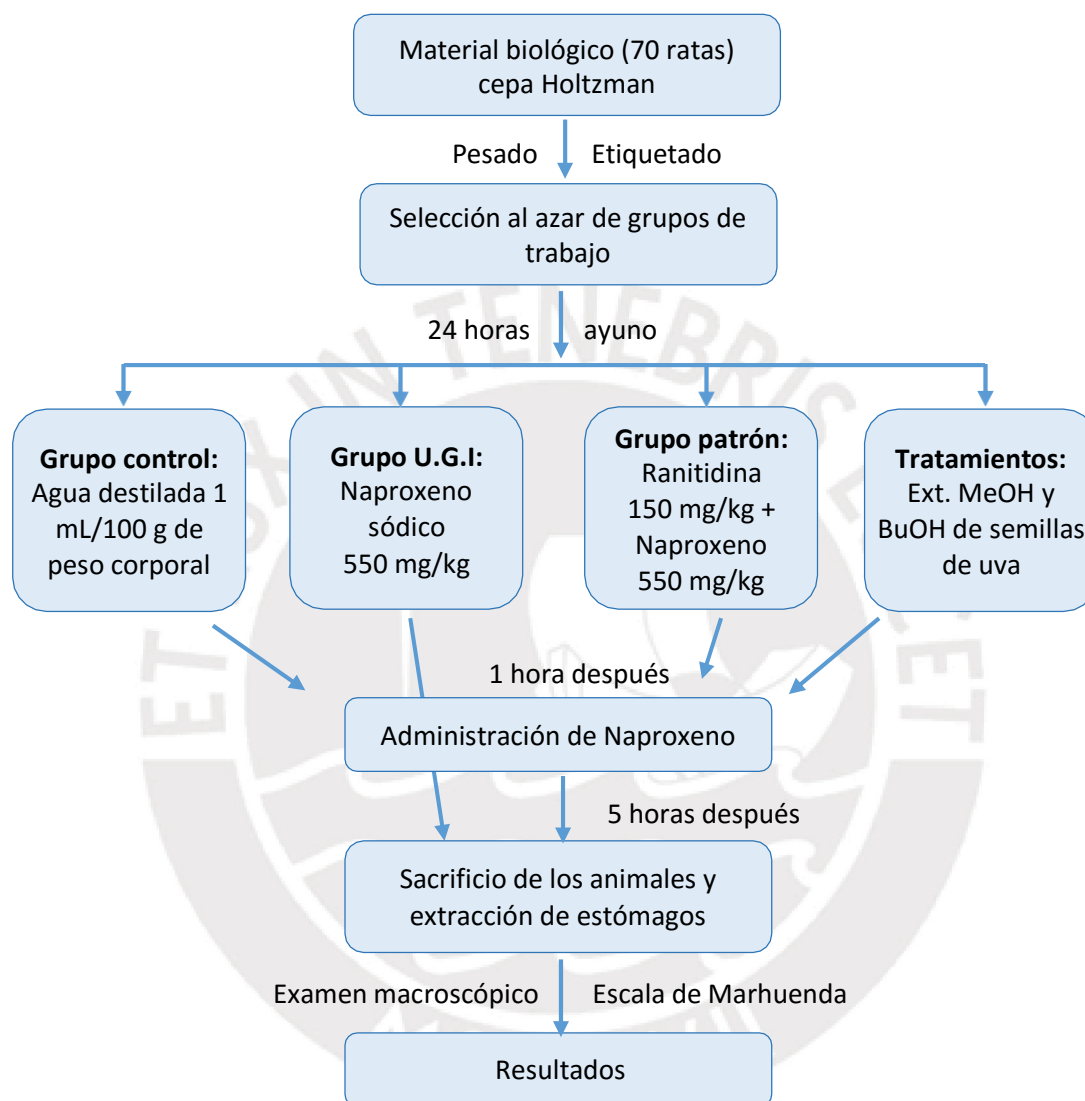


Figura 26. Protocolo para la determinación de la úlcera gástrica.

Los animales se mantuvieron en ayuno durante 24 horas, durante ese tiempo solamente se les suministró agua. Posteriormente se les administraron vía oral las diferentes dosis de extractos, previamente preparados en agua destilada. Pasada una hora, se les suministró la solución ulcerogénica y 5 horas después, los animales de experimentación fueron sacrificados suministrando una dosis de halatal.

Una vez sacrificadas las ratas se les efectuó una laparotomía en el tercio de la línea media abdominal, extrayéndose el estómago con ayuda de un equipo de disección, el cual fue abierto por la parte cóncava superior y lavado cuidadosamente con agua. Finalmente los estómagos, se extendieron sobre una superficie plana para el análisis macroscópico correspondiente con ayuda de una lupa.

### 3.7.3. Evaluación de la acción gastroprotectora.

Las lesiones producidas en la capa de la mucosa y muscular del estómago se evaluaron mediante el uso de la escala de Marhuenda modificada, que tiene como parámetros de análisis macroscópico los signos que se muestran en la Tabla 16.

El resultado del efecto gastroprotector se expresó en porcentaje de inhibición respecto al índice de ulceración del grupo de control, según la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{P media del U.G.I} - \text{P media del GT}}{\text{P media del U.G.I}} \times 100$$

Donde:

P = Promedio obtenido en la evaluación macroscópica según escala

U.G.I = grupo de úlcera gástrica inducida

GT = grupo tratamiento

Tabla 16. Parámetros de la escala de Marhuenda.

| SIGNOS                                  | PUNTAJE            |                      |                      |                  |
|---|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|
|   | 0                  | 1                    | 2                    | 3                |
| <b>Pérdida de pliegues de la mucosa</b> | No presenta        | Presenta             |                      |                  |
| <b>Decoloración de la mucosa</b>        | No presenta        | Presenta             |                      |                  |
| <b>Edema</b>                            | No presenta        | Presenta             |                      |                  |
| <b>Hemorragias</b>                      | No presenta        | Presenta             |                      |                  |
| <b>Número de petequias</b>              | Ninguno            | De 1 – 5             | De 5 – 10            | De 10 – 15       |
| <b>Intensidad de la ulceración</b>      | No presenta úlcera | úlcera menor de 1 mm | úlcera mayor de 1 mm | úlcera perforada |

#### 3.7.4. Análisis estadístico

El análisis consistió en la evaluación de diversas variables como el modelo biológico empleado (úlceras gástricas inducidas por Naproxeno), la cantidad y frecuencia de las lesiones gástricas (úlceras) presentadas en los estómagos de los animales de experimentación y su variación con los diferentes tratamientos aplicados. Finalmente se realizó una comparación del sistema de valoración de las lesiones gástricas observadas, para esto se recurrió a la escala de Marhuenda presentada anteriormente. Los datos se presentaron en términos de porcentaje de inhibición, y la diferencia de resultados entre los tratamientos aplicados se determinó por medio del análisis de varianza (KRUSKAL WALLIS).

Para el procesamiento de datos nos apoyamos en el paquete estadístico, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versión 23, año 2018.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Determinación del perfil de ácidos grasos

#### 4.1.1. Extracción

Se pesó entre 60 – 120 g de semillas de uva previamente secas y molidas para la extracción vía Soxhlet y 30 g para la extracción por CO<sub>2</sub> supercrítico, el cual se llevó a cabo en el laboratorio del Grupo de Investigación en Tecnología de Procesos Agroindustriales (ITEPA-PUCP), las cantidades de aceite obtenidos se detallan en la Tabla 17.

Tabla 17. Porcentaje de extracción de aceite de semillas de uva.

| Soxhlet         |                     |                    |                 | Fluidos supercríticos (FS) |                     |                    |                 |
|-----------------|---------------------|--------------------|-----------------|----------------------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| # Ensayo        | Peso de muestra (g) | Peso de aceite (g) | % de extracción | # Ensayo                   | Peso de muestra (g) | Peso de aceite (g) | % de extracción |
| 1               | 60                  | 8,9647             | 14,94           | 1                          | 30                  | 0,3045             | 1,02            |
| 2               | 100                 | 14,6324            | 14,63           | 2                          | 30                  | 2,4732             | 8,24            |
| 3               | 120                 | 17,9534            | 14,96           |                            |                     |                    |                 |
| 4               | 80                  | 11,738             | 14,67           |                            |                     |                    |                 |
| <b>Promedio</b> |                     |                    | <b>14,80</b>    | <b>Valor máximo</b>        |                     |                    | <b>8,24</b>     |

El resultado obtenido por el método tradicional con Soxhlet, presentó mayor porcentaje de extracción con el valor de 14,9 %, el cual se encuentra dentro del rango de valores reportados por Maier et al. (105) de 7,6 – 16,0 % y Fiori et al. (101) 11,1 – 16,6 %, mientras que en la extracción CO<sub>2</sub> supercrítico fue de solo 8,2 %, resultado que se encuentra cercano al rango reportado por Fiori et al. (101) de 10,1 – 15,0 %.

#### 4.1.2. Transesterificación

El porcentaje relativo de ácidos grasos, se calculó en función de la fracción transesterificada respecto al peso de aceite crudo, los resultados se muestran en la Tabla 18 para la extracción por el método tradicional y en la Tabla 19 para la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico.

Tabla 18. Porcentajes de transesterificación del método tradicional.

| Muestra                          | 1      | 2      | 3      | 4      |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Peso de aceite (g)               | 0,4040 | 0,5015 | 0,5008 | 0,5025 |
| Peso de metilésteres (g)         | 0,0557 | 0,0651 | 0,0683 | 0,0697 |
| % transesterificación (relativa) | 13,79  | 12,98  | 13,64  | 13,87  |

Tabla 19. Porcentajes de transesterificación del método CO<sub>2</sub> supercrítico.

| Muestra                          | M1      | M2      |
|----------------------------------|---------|---------|
| Peso de aceite (g)               | 0,3012  | 0,3071  |
| Peso de metilésteres (g)         | 0,0782  | 0,0785  |
| % transesterificación (relativa) | 25,9628 | 25,5617 |

#### 4.1.3. Análisis de ácidos grasos por GC-FID

El método comprendió tres etapas, la primera de extracción del aceite de semillas de uva con hexano, la siguiente etapa consistió en la transesterificación con MeOH/KOH y finalmente el análisis de los metilésteres por GC-FID.

En la Figura 47 (ver Anexo), se observa el cromatograma del estándar (FAMES mix) compuesto de 28 metilésteres de ácidos grasos, mientras que en las Figuras 48 y 49 (ver Anexo) se observan los cromatogramas de los metilésteres de los ácidos grasos del aceite de semilla de uva, extraídos por método Soxhlet y CO<sub>2</sub> supercrítico (FS) respectivamente. Los metilésteres que se lograron identificar fueron los que se muestran en la Tabla 20, del mismo modo se observan los porcentajes correspondientes de cada componente de fracción transesterificada.

La verificación del tiempo de retención y la desviación estándar de los metilésteres se realizó mediante la inyección de 6 volúmenes diferentes al equipo de cromatógrafo de gases (ver Anexo, Tabla 35) a partir de una solución estándar de 1500 ppm de FAMES. Con los datos obtenidos se pudo graficar una curva de calibración y observar la linealidad de los metilésteres

con el incremento de la concentración (ver Anexo, Tabla 36). La Figura 27 muestra la curva de calibración y la linealidad del palmitato de metilo a diferentes concentraciones, el mismo efecto se observó para los casos del estearato, oleato y linoleato de metilo respectivamente los cuales se pueden observar en las Figuras 50, 51 y 52 (ver Anexo).

Tabla 20. Metilésteres identificados en el aceite de semillas de uva.

| N° C  | Metiléster                   | TR<br>(estándar) | TR<br>(muestra) | % de éster metílico |         |
|-------|------------------------------|------------------|-----------------|---------------------|---------|
|       |                              |                  |                 | Soxhlet             | FS      |
| C16:0 | palmitato de metilo          | 12,464           | 12,348          | 6,4385              | 6,8271  |
| C18:0 | estearato de metilo          | 14,730           | 14,614          | 4,3835              | 4,2436  |
| C18:1 | cis-9-oleato de metilo       | 15,101           | 14,977          | 17,3102             | 17,5106 |
| C18:2 | cis-9,12-linoleato de metilo | 15,770           | 15,652          | 71,8677             | 71,4187 |

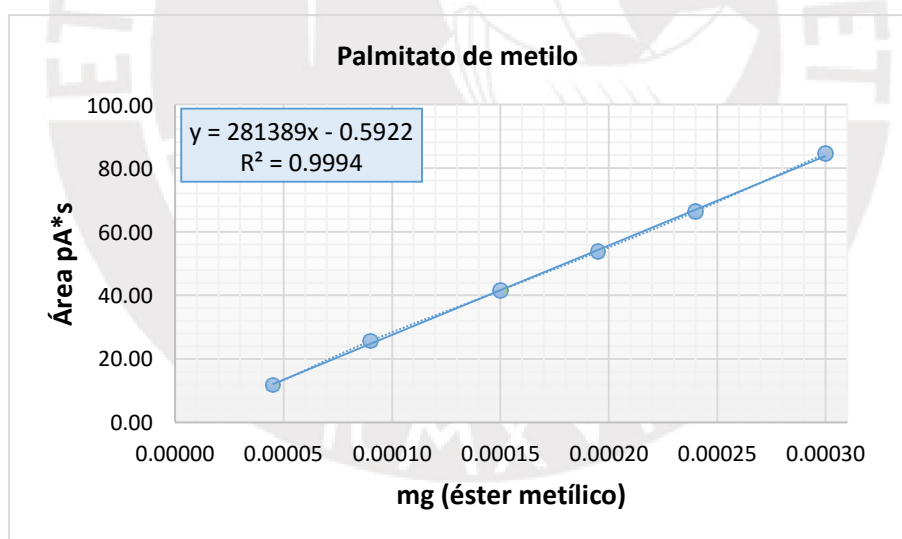


Figura 27. Curva de calibración para el palmitato de metilo.

La extracción por Soxhlet (S) y CO<sub>2</sub> supercrítico (FS) de aceites de semilla de uva mostraron diferencia significativas, como se observa en la Tabla 17, donde el rendimiento de aceite de semilla de uva extraída por el método Soxhlet (14,8 %) es mayor respecto al obtenido por CO<sub>2</sub> supercrítico 8,2 %. El valor de recuperación fue de 55,41 %, el cual se refiere al porcentaje de aceite obtenido por extracción CO<sub>2</sub> supercrítico respecto al del Soxhlet.

La composición de ácidos grasos de los aceites de semilla de uva (ver Tabla 21) extraídos tanto por ES como por FS fue consistente con los datos reportados por Da Porto et al. (4), Passos et al. (106), Beveridge et al. (107) y Prado et al. (108). El ácido linoleico fue el ácido graso más abundante, con el valor promedio de 71,9 %, seguida del ácido oleico (17,3 %), también se encontraron cantidades significativas de los ácidos palmítico (6,4 %) y esteárico (4,4 %). No se observaron diferencias significativas en la composición de metilésteres en el aceite de semillas de uva extraídos por ambos métodos (ver Tabla 20). Sin embargo, algunos autores, reportan valores más altos o más bajos, según el origen, variedad de la muestra y el método de extracción de aceite.

Tabla 21. Ácidos grasos en aceites de semilla de uva (Malbec) de diferente origen.

| # | Metiléster                     | % de ácidos grasos en semillas de uva (Malbec) |         |                                     |       |                                 |
|---|--------------------------------|--|---------|-------------------------------------|-------|---------------------------------|
|   |                                | ES   | FS      | Beveridge et al. (107) <sup>a</sup> |       | Prado et al. (108) <sup>b</sup> |
|   |                                |  |         | EP                                  | SCF   |                                 |
| 1 | Palmitato de metilo            | 6,4385   | 6,8271  | 6,28                                | 6,35  | 7,22                            |
| 2 | Estearato de metilo            | 4,3835   | 4,2436  | 4,65                                | 4,73  | 3,07                            |
| 3 | (cis-9) oleato de metilo       | 17,3102  | 17,5106 | 18,47                               | 18,95 | 16,79                           |
| 4 | (cis-9,12) linoleato de metilo | 71,8677  | 71,4187 | 67,56                               | 66,76 | 72,35                           |

<sup>a</sup>Semillas de uva de la variedad Malbec (Canadá), método de extracción Soxhlet, EP (éter de petróleo) y SCF (CO<sub>2</sub> supercrítico).

<sup>b</sup>Semillas de uva de la variedad Malbec (Brasil), método extracción (fluidos supercríticos).

Así mismo, con ayuda de la curva de calibración construida para cada metiléster identificado fue posible calcular la cantidad de la misma en unidades de mg de éster metílico por gramo de aceite crudo, los cuales se muestran en la Tabla 22.

De los datos mostrados en la Tabla 17 (porcentajes de extracción), se observa que mediante el uso del método Soxhlet se obtienen altos rendimientos de extracción de aceite respecto al uso del CO<sub>2</sub> supercrítico. Sin embargo al analizar los valores de la composición de cada metiléster por gramo de aceite crudo (Tabla 22), el aceite extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico contiene aproximadamente el doble de los reportados para el método Soxhlet, como es el caso del ácido linoleico, el cual muestra un valor de 176 mg y 86 mg respectivamente.



Tabla 22. Composición de ácidos grasos por gramo de aceite de semilla.

| Muestra         | Método de extracción  | mg de éster metílico/g de aceite crudo |              |              |               |
|-----------------|-----------------------|--|--------------|--------------|---------------|
|                 |                       | Palmítico                              | Estearico    | Oleico       | Linoleico     |
| M1              | Soxhlet               | 7,59                                   | 5,08         | 19,58        | 85,59         |
| M2              |                       | 7,65                                   | 4,94         | 19,89        | 86,98         |
| <b>Promedio</b> |                       | <b>7,62</b>                            | <b>5,01</b>  | <b>19,74</b> | <b>86,28</b>  |
| M3              | Fluidos supercríticos | 18,07                                  | 10,66        | 46,51        | 182,19        |
| M4              |                       | 15,29                                  | 9,77         | 40,82        | 169,89        |
| <b>Promedio</b> |                       | <b>16,68</b>                           | <b>10,22</b> | <b>43,67</b> | <b>176,04</b> |

## 4.2. Compuestos fenólicos y su cuantificación

### 4.2.1. Extracción de compuestos fenólicos

Los extractos metanólicos se obtuvieron de las semillas previamente desgrasadas, los porcentajes de extracción se calcularon respecto al peso de muestra desgrasada y peso de muestra sin desgrasar (harina entera), los cuales se muestran en la Tabla 23.

El resultado obtenido muestra que la carga del extracto metanólico, relativamente alta, se compone principalmente de compuestos de polaridad similar a la del metanol, los cuales comprenden desde ácidos orgánicos simples, compuestos fenólicos hasta algunos ácidos grasos de polaridad media.

Tabla 23. Porcentajes de extracto metanólico en harina semillas con y sin desgrasado.

| # Extracción    | Muestra desgrasada (g) | Extracto (g) | % de extracción (harina desgrasada) | % de extracción (harina entera) |
|-----------------|------------------------|--------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1               | 50                     | 13,4168      | 26,8336                             | 22,8622                         |
| 2               | 50                     | 12,6517      | 25,3034                             | 21,5585                         |
| 3               | 400                    | 98,8192      | 24,7048                             | 21,0485                         |
| 4               | 250                    | 68,1856      | 27,2742                             | 23,2377                         |
| <b>Promedio</b> |                        |              | <b>26,0290</b>                      | <b>22,1767</b>                  |

#### 4.2.2. Cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico

La evaluación de los fenoles totales se llevó a cabo en el extracto metanólico crudo, preparado a una concentración de 1 mg/mL, el cual se determinó mediante el ensayo de Folin Ciocalteu. La curva de calibración obtenida para este ensayo se presenta en la Figura 28, la cual presenta un coeficiente de correlación de 0,9997.

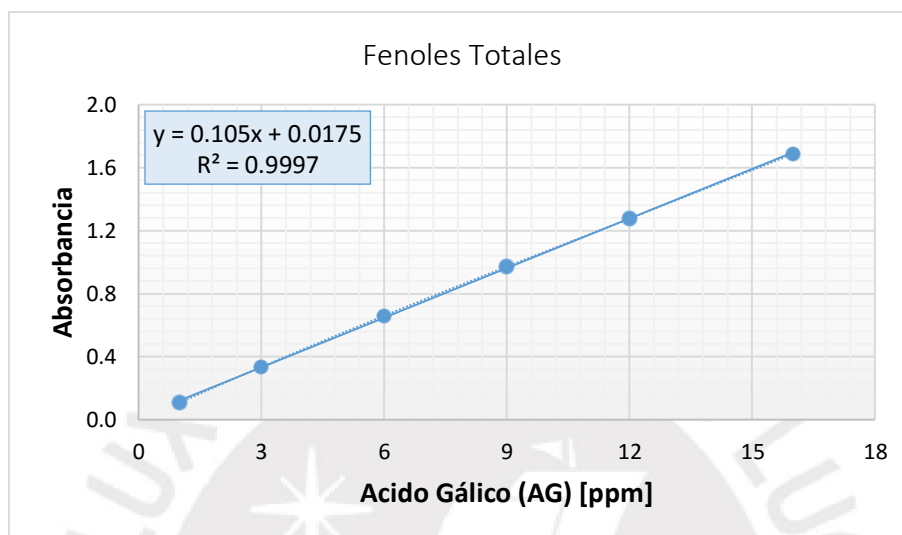


Figura 28. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

Los resultados (Tabla 24) muestran que las diluciones de los extractos metanólicos realizados a partir de una solución de concentración de 1 mg/mL, contienen compuestos fenólicos en cantidades significativas, dando un valor promedio de 40,03 mg de ácido gálico (AG) por gramo de harina de semilla de uva.

Tabla 24. Cuantificación de fenoles totales en los extractos metanólicos.

| #  | Código de Muestra | Absorbancia 765 nm | [Fenoles totales] ppm | mg AG/g extracto crudo | mg AG/g harina desgrasada | mg AG/g harina de semilla |
|--|-------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1  | M20               | 0.06696            | 0.47                  | 181.17                 | 47.16                     | 40.18                     |
| 2  | M40               | 0.11605            | 0.94                  | 180.49                 | 46.98                     | 40.03                     |
| 3  | M60               | 0.16686            | 1.42                  | 182.37                 | 47.47                     | 40.44                     |
| <b>Promedio fenoles totales (mg AG/g harina de semilla entera)</b> |                   |                    |                       |                        |                           | <b>40.03</b>              |

Por otra parte, al realizar una comparación con los valores reportados por Li et al. (109) y otros autores, mostraron que las semillas analizadas, aún después del proceso de fermentación de la uva para la producción de l vino (el cual tiene un tiempo estimado de 10 - 25 días), mantienen valores de compuestos fenólicos comparables a aquellos cuantificados en semillas de uva sin haber sido sometidas a procesos de fermentación, como se muestra en la Tabla 25.

Tabla 25. Comparación del contenido de fenoles totales en diferentes variedades de uva.

| Semillas de uva de diferentes variedades   | Procedencia de muestra            | mg AG/g de polvo o harina | Referencias          |
|--|-----------------------------------|---------------------------|----------------------|
| Chardonnay, Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon, Shiraz  | Fruto entero                      | 47,2 - 86,6               | Yi et al. (109)      |
| Cabernet Mitos, Lemberger, Samtrot, Spätburgunder  | Residuo del proceso de desgrasado | 92,4 - 194,4              | Maier et al. (105)   |
| Merlot, Cabernet Sauvignon, Cinsault, Alphonso Lavallee, Papaz Karasi, Muscat Hamburgo, Ada Karasi | Fruto maduro                      | 79,2 – 154,6              | Bozan et al. (110)   |
| Uva blanca   | Residuo de la vinificación        | 14,7 – 66,8               | Bucic et al. (88)    |
| Syrah  | Residuo de la vinificación        | 15,6 - 22,6               | Marqués et al. (111) |
| Malbec   | Fruto entero                      | 26,7 – 43,2               | Fanzone et al. (83)  |

#### 4.3. Determinación de la actividad antioxidante

El extracto metanólico de semillas de uva, mostró un buen porcentaje de captación de radical libre DPPH, como se observa en la Tabla 26. En dicha tabla se muestra la absorbancia alcanzada por la mezcla del extracto a diferentes concentraciones al reaccionar con los radicales DPPH• y su respectivo porcentaje de DPPH• remanente. Así mismo alcanzó una considerable actividad antioxidante comparable con la vitamina C.

El mecanismo de acción de los compuestos antioxidantes con los radicales DPPH• se muestra en la Figura 29, en el cual se ilustra el caso específico del ácido ascórbico.

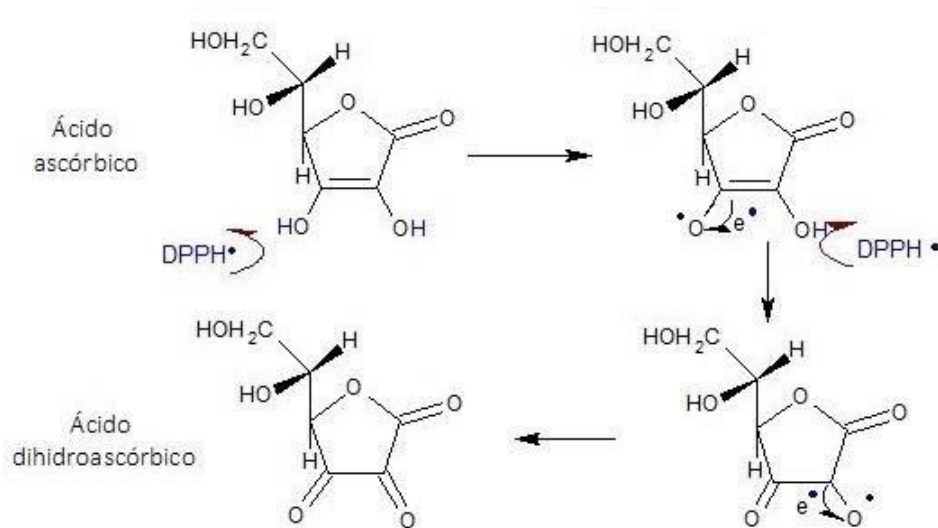


Figura 29. Mecanismo de reacción del ácido ascórbico frente al radical DPPH•.  
Adaptado y modificado de Villanueva et. al (112).

Tabla 26. Porcentaje de DPPH remanente después de la reacción.

| [Extracto] mg/mL | Absorbancia 517 nm | % DPPH remanente |
|------------------|--------------------|------------------|
| blanco           | 0,00000            | ---              |
| 0                | 0,40816            | 100,00000        |
| 5                | 0,33940            | 82,95044         |
| 10               | 0,26868            | 65,66624         |
| 15               | 0,20330            | 49,68716         |
| 20               | 0,14094            | 34,44618         |
| 25               | 0,07820            | 19,11233         |
| 30               | 0,01920            | 4,69279          |

En la Figura 30 se puede observar que conforme se incrementa la cantidad de extracto metanólico, la absorbancia del radical DPPH• disminuye en relación lineal, lo cual corrobora la actividad antioxidante del extracto. Por otra parte, en la Figura 31 se aprecia que la actividad inhibitoria máxima del extracto metanólico se alcanza a una concentración 30 mg/mL, con un 95 % de inhibición. Del mismo modo al analizar el efecto del estándar, vitamina C, se observa que este alcanza su capacidad inhibitoria máxima a 20 mg/mL, con un 96 % de inhibición (Figuras 32 y 33).

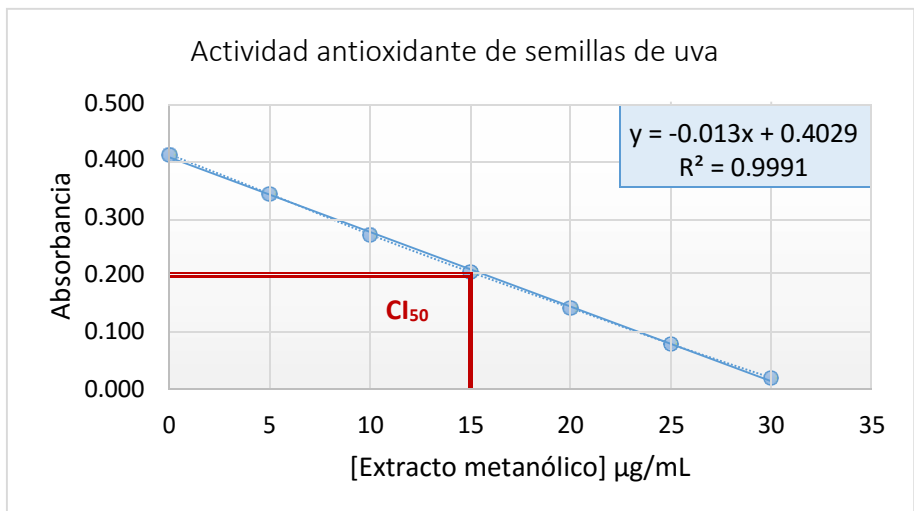


Figura 30. Curva de absorbancia del extracto metanólico de semillas de uva.

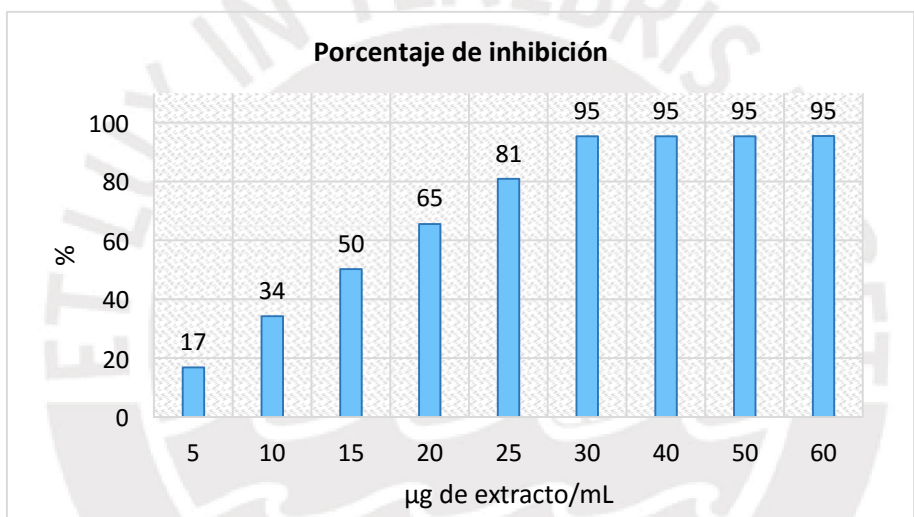


Figura 31. Porcentaje de inhibición del extracto metanólico de semillas de uva.

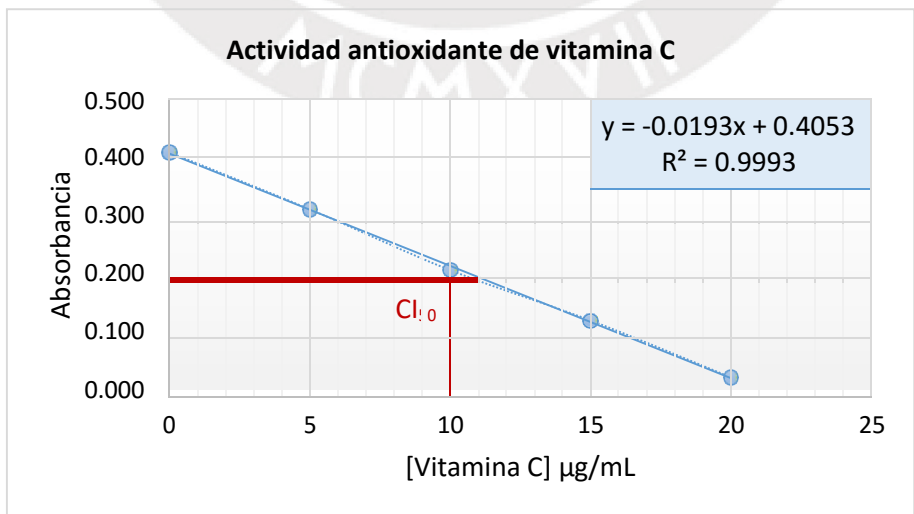


Figura 32. Curva de absorbancia de la vitamina C.

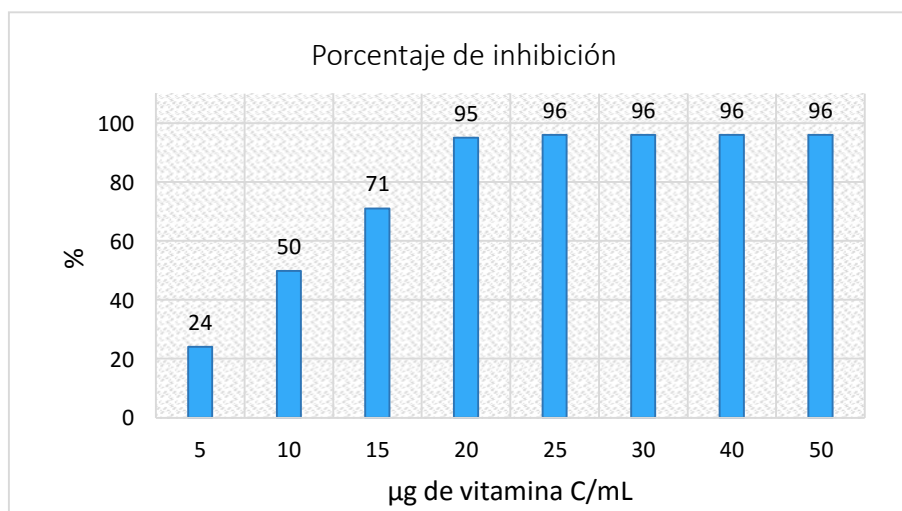


Figura 33. Porcentaje de inhibición de la vitamina C.

Tabla 27. Concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) del extracto metanólico y estándar.

| Muestra             | $CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )* | % Inhibición |
|---------------------|--------------------------------------|--------------|
| Extracto metanólico | 15,294                               | 95,330       |
| Vitamina C          | 10,436                               | 96,009       |

\* $CI_{50}$  se determinó como la concentración requerida del extracto para inhibir el 50 % de DPPH.

Tanto el extracto metanólico como la vitamina C presentaron valores de actividad antioxidante, en términos de capacidad inhibitoria media  $CI_{50}$ , le corresponde 15,294 al extracto metanólico y 10,436  $\mu\text{g/mL}$  a la vitamina C (Tabla 27). Este resultado pone en evidencia de que la vitamina C requiere menor concentración que el extracto metanólico para reducir a la mitad la cantidad de los radicales DPPH•. Sin embargo al analizar el porcentaje de inhibición, ambas muestras alcanzan porcentajes similares, este hecho pone de manifiesto que la actividad antioxidante del extracto metanólico es comparable a la vitamina C.

#### 4.4. Determinación del perfil de compuestos fenólicos mediante UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS

Para la medición UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS se usó el extracto metanólico crudo y se llevó a cabo en el laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Antofagasta – Chile, dirigido por el Dr. Jorge Borquez. El análisis cualitativo se desarrolló en modo de ionización negativa, que brinda datos de masa precisos y los iones producto de la fragmentación.

La Figura 34 muestra el cromatograma de los principales iones identificados en el extracto metanólico, previamente desgrasado. La identificación de los picos correspondiente a los compuestos fenólicos identificados o tentativamente caracterizados en el extracto, se realizó al verificar tanto el tiempo de retención como la fragmentación de masas. Para el tratamiento de los datos se utilizó el software Thermo Xcalibur.

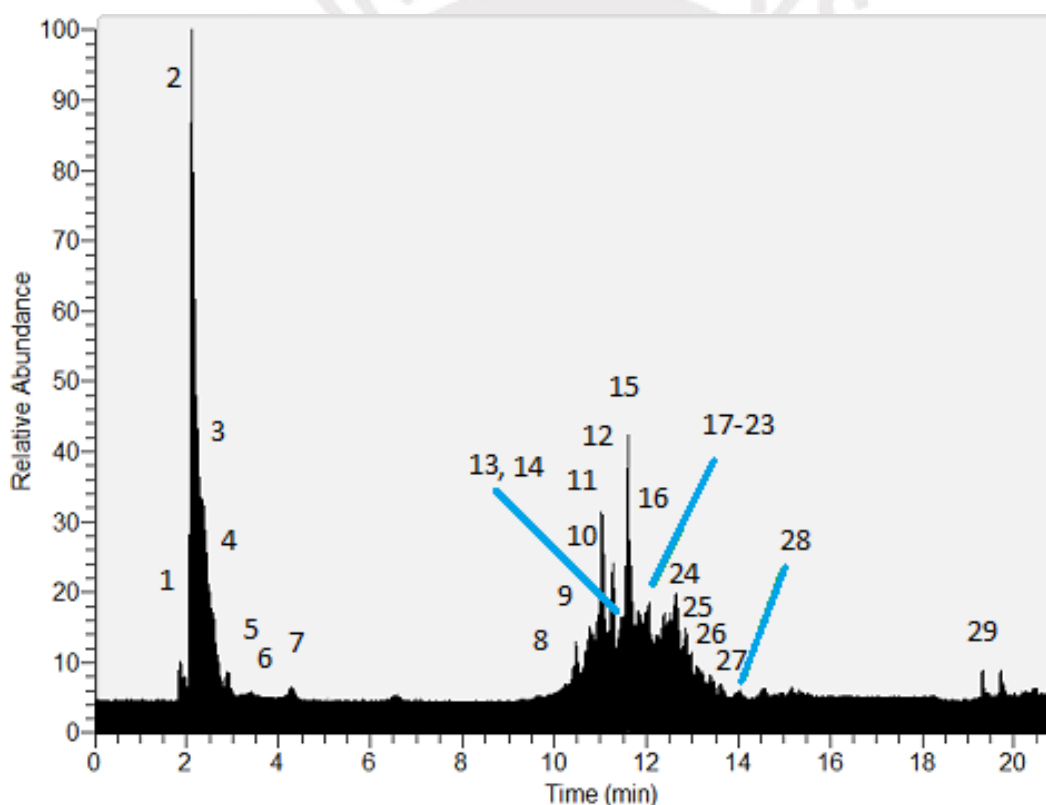


Figura 34. Cromatograma del análisis UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS del extracto metanólico.

Los compuestos identificados se muestran en la Tabla 28, la cual incluye el tiempo de retención, compuesto tentativo, tipo de metabolito, composición elemental  $[M-H]^-$ ,  $m/z$  teórica y experimental, precisión (ppm) y los fragmentos encontrados. En la Figura 35 se muestra las estructuras de los compuestos identificados.

Tabla 28. Identificación de compuestos fenólicos en semilla de uva mediante UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS.

| # Pico | T <sub>R</sub> (min.) | Identificación tentativa       | Tipo de metabolito         | Composición elemental [M-H] <sup>-</sup>                     | Masa teórica (m/z) | Masa medida (m/z) | Precisión (ppm) | Masa de iones MS <sup>2</sup> (ppm)        | Referencias |
|--------|-----------------------|--------------------------------|----------------------------|--|--------------------|-------------------|-----------------|--|-------------|
| 1      | 2,07                  | Ácido glucónico                | Ácido orgánico             | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>   | 195,05103          | 195,05069         | 1,743134        | 177,03979; 159,02927; 151,06052; 129,01854 | (113)       |
| 2      | 2,12                  | Ácido graso poliinsaturado     | Ácido graso poliinsaturado | C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>  | 377,08781          | 377,08545         | 6,247882        | 333,09798                                  | n.d.        |
| 3      | 2,35                  | Ácido málico                   | Ácido orgánico             | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>    | 133,01425          | 133,01338         | 6,518099        | 115,00270                                  | (114)       |
| 4      | 2,44                  | Ácido cítrico                  | Ácido orgánico             | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>    | 191,01973          | 191,01933         | 2,094025        | 147,02924; 111,00793                       | (114)       |
| 5      | 3,40                  | Ácido succínico                | Ácido orgánico             | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>    | 117,01933          | 117,01862         | 6,084465        | n.d.                                       | (114)       |
| 6      | 3,51                  | Galloyl hexosa I (glucogalina) | Ácido fenólico             | C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup> | 331,06707          | 331,06693         | 0,422875        | 169,01349; 125,02355                       | (114)       |
| 7      | 4,29                  | Ácido gálico                   | Ácido fenólico             | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>    | 169,01425          | 169,01375         | 2,940581        | 125,02358                                  | (115)       |
| 8      | 9,38                  | (+)-catequina-3-O-hexósido     | Flavan-3-ol                | C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup> | 451,12459          | 451,12460         | 0,033250        | 289,07147; 245,04549; 151,03912            | (116)       |
| 9      | 9,98                  | Ácido siríngico O-hexósido     | Ácido fenólico             | C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup> | 359,09837          | 359,09863         | 0,724036        | 125,02358; 197,04483                       | (114)       |
| 10     | 10,08                 | (+)-Galocatequina              | Flavan-3-ol                | C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>  | 305,06668          | 305,06644         | 0,773601        | 221,04538; 179,03430; 167,03438            | (117)       |



Tabla 28. Identificación de compuestos fenólicos en semilla de uva mediante UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS (Continuación).

| # Pico | T <sub>R</sub> (min.) | Identificación tentativa     | Tipo de metabolito | Composición elemental [M-H] <sup>-</sup>                     | Masa teórica (m/z) | Masa medida (m/z) | Precisión (ppm) | Masa de iones MS <sup>2</sup> (ppm)           | Referencias |
|--------|-----------------------|------------------------------|--------------------|--|--------------------|-------------------|-----------------|---|-------------|
| 11     | 10,38                 | Astilbina I                  | Flavononol         | C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup> | 449,10894          | 449,10892         | 0,044533        | 303,05057; 275,05386;<br>151,03928            | (118)       |
| 12     | 10,41                 | (-)-Epigallocatequina        | Flavan-3-ol        | C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>  | 305,06668          | 305,06638         | 0,970280        | 221,04533; 179,03432;<br>167,03459            | (117)       |
| 13     | 10,47                 | Procianidina B3              | Flavan-3-ol        | C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup> | 577,13515          | 577,13422         | 1,611408        | 451,10306; 425,08743,<br>407,07681; 289,07129 | (119)       |
| 14     | 10,49                 | Glucósido de ácido vainílico | Hidroxibenzoico    | C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>  | 329,08781          | 329,08826         | 1,379571        | 167,03419; 123,04398                          | (114,118)   |
| 15     | 11,03                 | (+)-Catequina                | Flavan-3-ol        | C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>  | 289,07176          | 289,07166         | 0,345935        | 245,04509; 151,03929                          | (115,120)   |
| 16     | 11,10                 | Ácido p-cumárico             | Ácido fenólico     | C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>    | 163,04007          | 163,03928         | 4,833168        | 119,0493                                      | (115,120)   |
| 17     | 11,13                 | Ácido sirínico               | Ácido fenólico     | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>    | 197,04555          | 197,04486         | 3,501728        | 181,05013; 153,05493                          | (120)       |
| 18     | 11,25                 | Procianidina B1              | Flavan-3-ol        | C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup> | 577,13515          | 577,13434         | 1,403484        | 451,10306; 425,08746;<br>407,07687; 289,07135 | (119)       |
| 19     | 11,33                 | Ácido ferúlico               | Ácido fenólico     | C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>   | 193,05063          | 193,04980         | 4,309750        | 179,03413; 149,05995                          | (115)       |
| 20     | 11,44                 | Astilbina II                 | Flavononol         | C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup> | 449,10894          | 449,10904         | 0,222663        | 303,05066; 275,05588;<br>151,03926            | (118)       |

Tabla 28. Identificación de compuestos fenólicos en semilla de uva mediante UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS (Continuación).

| # Pico | T <sub>R</sub> (min.) | Identificación tentativa                | Tipo de metabolito | Composición elemental [M-H] <sup>-</sup>                     | Masa teórica (m/z) | Masa medida (m/z) | Precisión (ppm) | Masa de iones MS <sup>2</sup> (ppm)        | Referencias |
|--------|-----------------------|---|--------------------|--|--------------------|-------------------|-----------------|--|-------------|
| 21     | 11,52                 | Dehidroepicatequina-3-gallate I         | Flavan-3-ol        | C <sub>22</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup> | 439,06707          | 439,06680         | 0,614940        | 287,05588; 169,01367; 125,02357            | (118)       |
| 22     | 11,60                 | (-)-Epicatequina                        | Flavan-3-ol        | C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>  | 289,07176          | 289,07162         | 0,484309        | 245,04443; 151,03929                       | (115,120)   |
| 23     | 11,84                 | Procianidina B4                         | Flavan-3-ol        | C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup> | 577,13515          | 577,13391         | 2,148544        | 451,10306; 425,08774; 407,07709; 289,07141 | (119)       |
| 24     | 11,97                 | Dehidroepicatequina-3-galato II isómero | Flavan-3-ol        | C <sub>22</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup> | 439,06707          | 439,06674         | 0,751594        | 287,05554; 169,01355; 125,02357            | (118)       |
| 25     | 12,10                 | Miricetina ramnósido                    | Flavonol           | C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup> | 463,08820          | 463,08783         | 0,798984        | 317,02899; 289,03525 193,01350             | (121)       |
| 26     | 12,45                 | Procianidina B2                         | Flavan-3-ol        | C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup> | 577,13515          | 577,13434         | 1,403484        | 451,10306; 425,08759; 407,07635; 289,07150 | (119)       |
| 27     | 12,60                 | Epicatequina-3-galato                   | Flavan-3-ol        | C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup> | 441,08272          | 441,08252         | 0,453430        | 289,07141; 245,04469; 151,03926            | (118,120)   |
| 28     | 13,63                 | Ácido azelaico                          | Ácido orgánico     | C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>   | 187,09758          | 187,09709         | 2,618954        | 143,10695                                  | (114)       |
| 29     | 19,89                 | Ácido quínico                           | Ácido orgánico     | C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>   | 191,05611          | 191,05495         | 6,081983        | 147,06538                                  | (114)       |

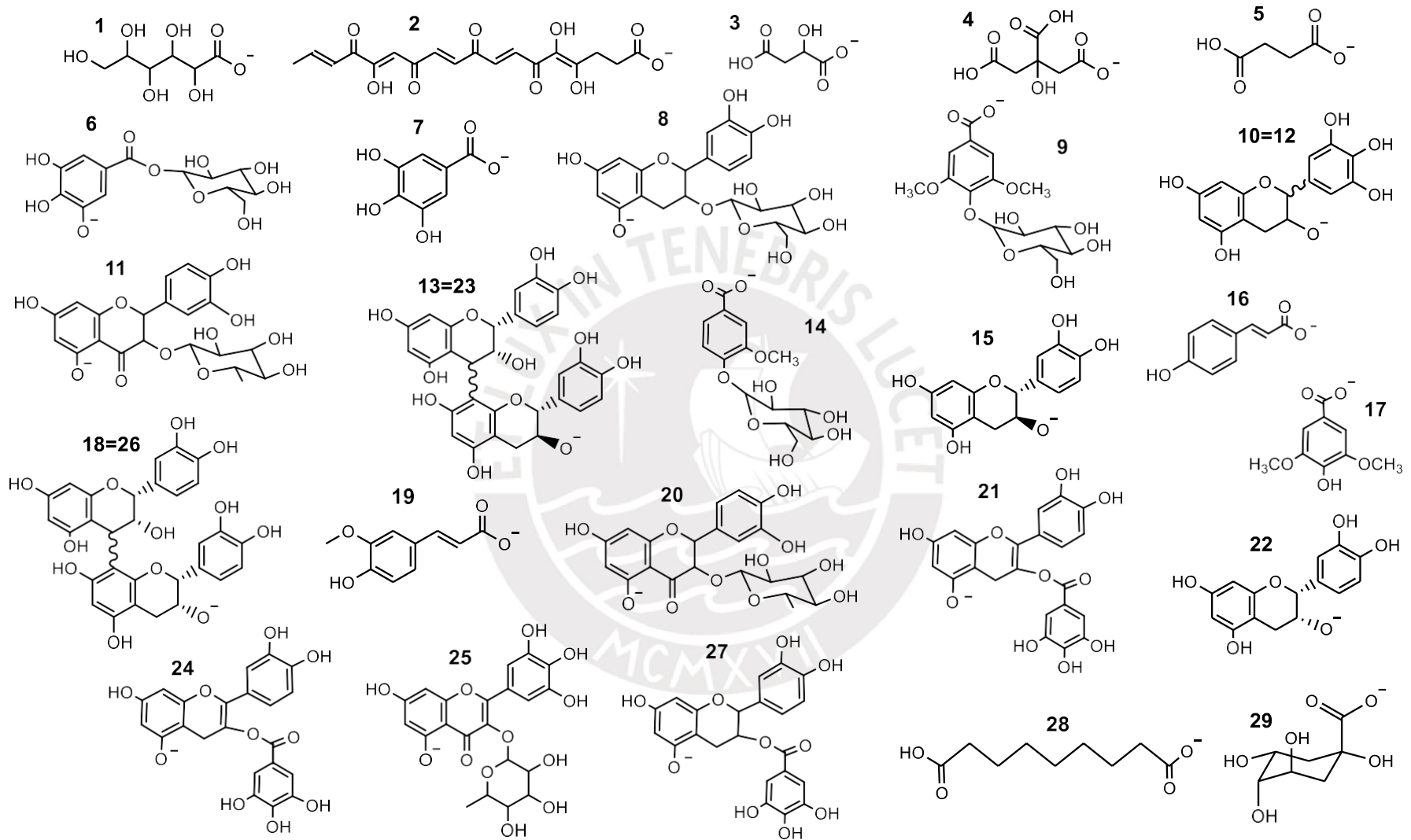


Figura 35. Estructura química de compuestos identificados (tentativos) mediante UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS.

Al realizar el tratamiento de datos correspondiente, se logró identificar 29 compuestos, entre ellos un ácido graso poliinsaturado, un ácido hidroxibenzoico, 6 ácidos orgánicos, 6 ácidos fenólicos, 2 flavanoles, un flavonol y 12 flavan-3-oles (monómeros y dímeros).

**Caracterización de ácido orgánicos:** Los compuestos **1, 3, 4, 5, 28 y 29** se caracterizaron como ácidos glucónico, málico, cítrico, succínico, azelaico y quínico respectivamente. Su identificación se logró de manera sencilla por comparación de sus comportamientos en el espectro de masas con los de la literatura publicada (113,114), otro factor importante para su identificación fue el tiempo de retención. Es así que se observaron fragmentos  $m/z$  151, 147, 143 y 147 correspondientes a los compuestos **1, 4, 28 y 29** respectivamente, productos de la pérdida del grupo carboxilo ( $-\text{CO}_2$ ) de sus iones precursoros. Por su parte en el compuesto **3** se observó el fragmento  $m/z$  115, producto de la pérdida de una molécula de agua y en el caso del compuesto **5**, no se pudo observar la fragmentación debido a que el peso del ion molecular fue cercano a 100, puesto que el equipo con el cual se trabajó solo reporta masas de iones por encima de ese valor. En la Figura 36 se muestra el espectro de masas del ácido glucónico y su correspondiente fragmentación.

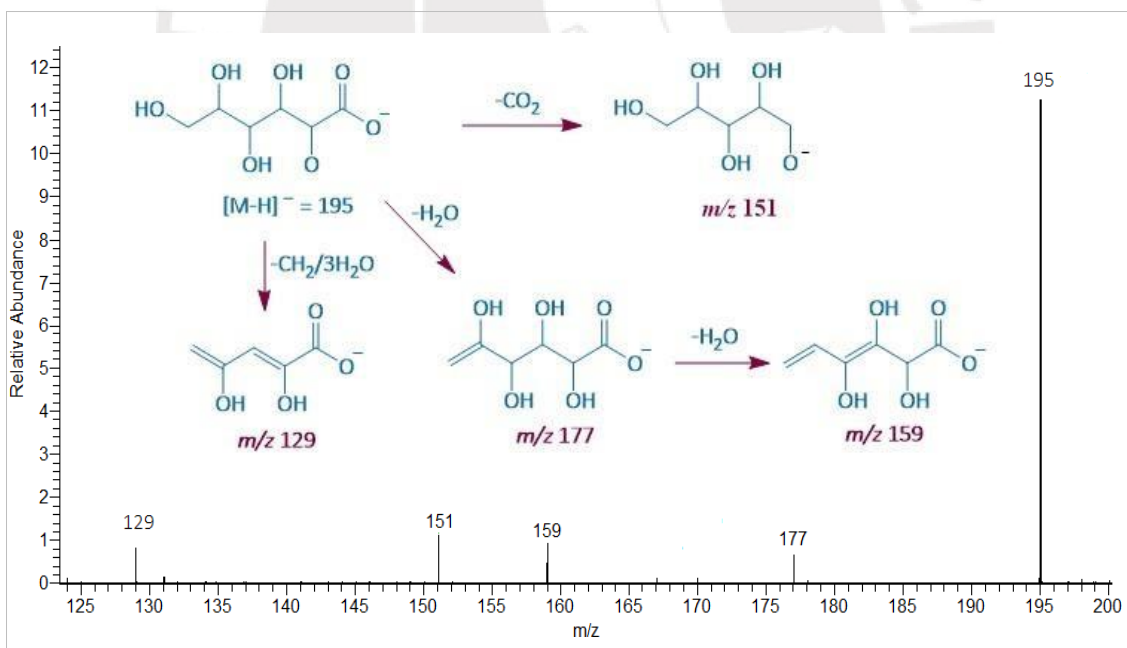


Figura 36. Espectro  $\text{MS}^2$  y fragmentación para el ácido glucónico.

**Ácidos hidroxibenzoicos, fenólicos y derivados.** Los compuestos **7, 16, 17 y 19**, se identificaron como ácidos gálico, *p*-cumárico, siríngico y ferúlico respectivamente, fueron los principales ácidos fenólicos identificados en el extracto de semillas de uva. Se detectaron las señales  $m/z$  en 125, 119, 153 y 149 correspondientes a la pérdida del grupo carboxilo ( $-\text{CO}_2$ ) de los ácidos

gálico, *p*-cumárico, siríngeo y ferúlico, además del ion molecular respectivamente, además en el caso de los ácido siríngeo y ferúlico, las señales *m/z* en 181 y 179 por la pérdida de agua respectivamente.

El compuesto **6** se caracterizó como glucogalina, formado a partir de ácido gálico y  $\beta$ -D-glucosa. Se observaron los fragmentos *m/z* 169, producto de la pérdida del grupo glucósido y *m/z* 125 típico del ion galoil (Figura 37). Por otro lado el compuesto **9** presentó el ion molecular *m/z* 359 y los fragmentos *m/z* 197 y 125, lo que indica que corresponde a un glicósido del ácido siríngeo. En el compuesto **14** se observó el ion molecular *m/z* 329 y fragmentos *m/z* 167 y 123, que indica que se trata de un glicósido del ácido vainílico. La fragmentación de los ácidos fenólicos y derivados antes mencionados fueron reportados en diferentes variedades de uva como Tempranillo, Graciano, Cabernet Sauvignon, Merlot entre otros (115,118,120), sin embargo solamente algunos fueron reportados en semillas de uva la variedad Malbec (Argentina) realizado por Fanzone et al. (83).

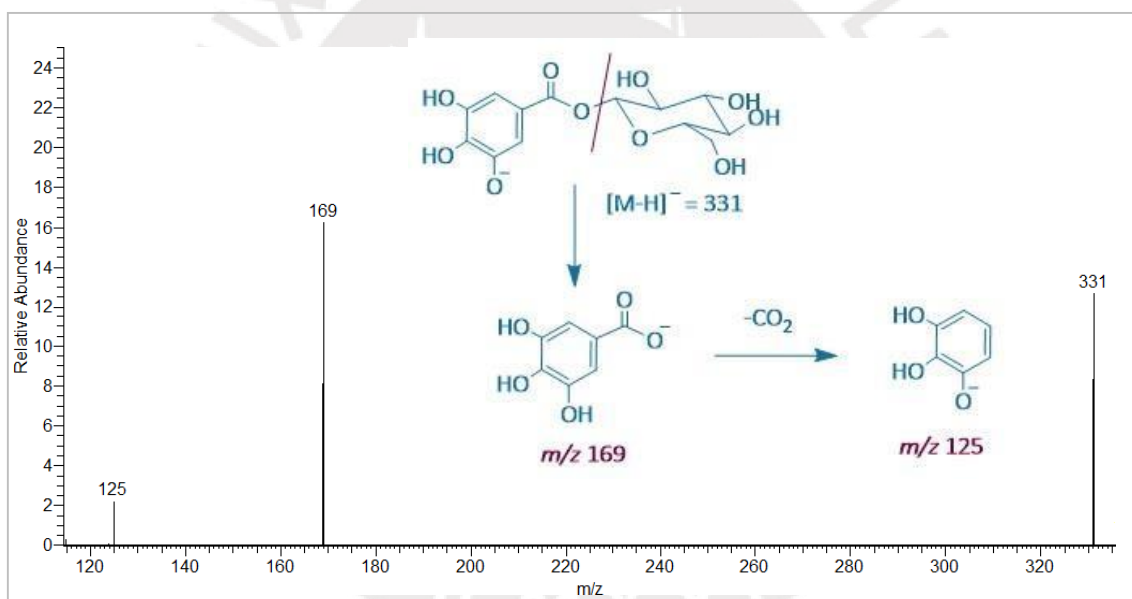


Figura 37. Espectro  $MS^2$  y fragmentación para la glucogalina.

**Caracterización de flavonoides:** Se observó que constituyen el grupo de compuestos mayoritarios del extracto de semillas de uva, se pudieron identificar 3 tipos de derivados de flavonoides como flavan-3-oles, flavanonoles y flavonoles. La identificación de los compuestos se realizó a partir de la masa de sus iones desprotonados ( $[M-H]^-$ ) y los de los productos característicos de su fragmentación, así como por comparación con los datos publicados en la literatura. Las reglas de escisión (o fragmentación) de los flavonoides fueron consistentes con los resultados con otros tipos de sistemas de espectrometría de masas equipados con fuentes

de ionización por electroespray, lo que facilitó el proceso de identificación de los flavonoides por comparación de los fragmentos obtenidos.

**Flavanonoles:** Los compuestos **11** y **20** se identificaron como flavanonol-3-O-hexósidos correspondientes a isómeros de la astilbina (dihidroquercetina-3-O-ramnósido), compuesto identificado en algunos vinos rojos y blancos (118). De acuerdo al espectro de masas en el modo de ionización negativa, los flavanonoles mostraron el ion molecular  $m/z$  449, además  $m/z$  303, que indica la pérdida del grupo ramnósido (fragmento distintivo), reportado en trabajos anteriores (118), además de la señal  $m/z$  151 característico de la pérdida de CO en la fragmentación de los flavanonoles. En base a los fragmentos presentados y al tener distintos tiempos de retención, se concluyó que ambos compuestos son isómeros.

**Flavonol:** Por otra parte el compuesto **25** se identificó como miricetina ramnósido, derivado de flavonol, de acuerdo a la masa del ion molecular y al fragmento  $m/z$  317, indicativo de la pérdida de una unidad de ramosilo (121), adicionalmente se produjeron los iones típicos de la fragmentación de la miricetina, como se muestra en la Figura 38. Cabe resaltar que la presencia de este compuesto de acuerdo al cromatograma, es mínima respecto a los demás, a la fecha no se ha reportado su presencia en uvas de la variedad Malbec, sin embargo la variedad Muscadinia posee alto contenido (121).

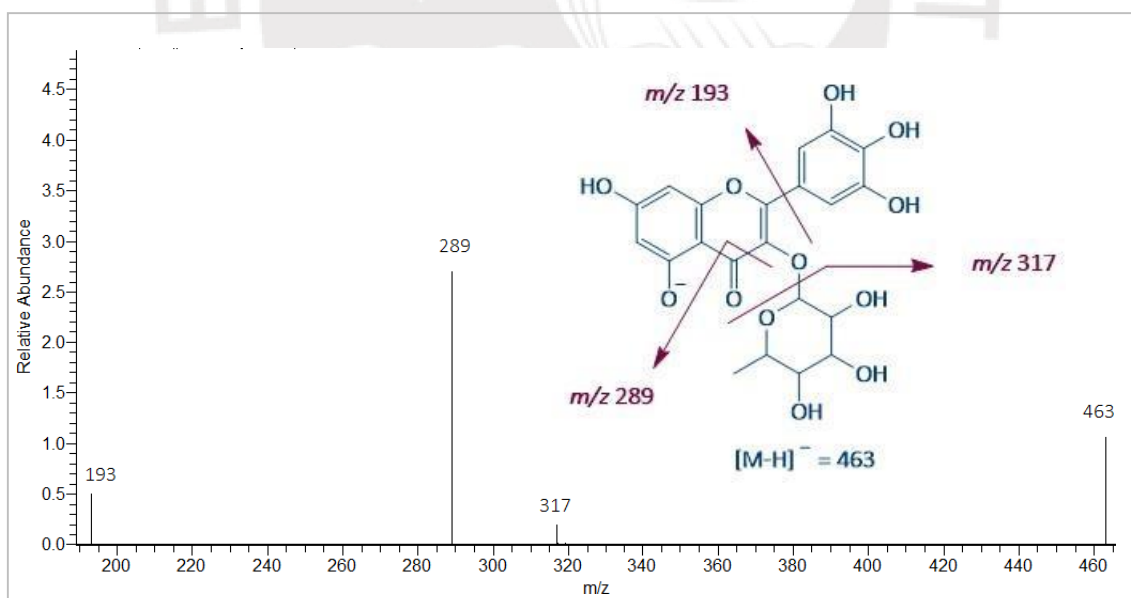


Figura 38. Espectro  $MS^2$  y fragmentación de miricetina ramnósido, Adaptado de Fabre et al. (122).

**Flavonoles:** Los compuestos **8**, **10**, **12**, **15**, **21**, **22**, **24** y **27** con masas de ion molecular ( $[M-H]^-$ )  $m/z$  451, 305, 305, 289, 439, 289, 439 y 441 correspondientes a (+)-catequina-3-hexósido, galocatequina, epigalocatequina, catequina, dehidroepicatequina-3-galato I, epicatequina,

dehidroepicatequina-3-galato II y epicatequina-3-O-galato respectivamente, fueron identificados como flavan-3-oles monoméricos. Las Figuras 39 y 40 muestran los espectros de masas del ion molecular y del patrón de fragmentación de la epicatequina-3-galato respectivamente.

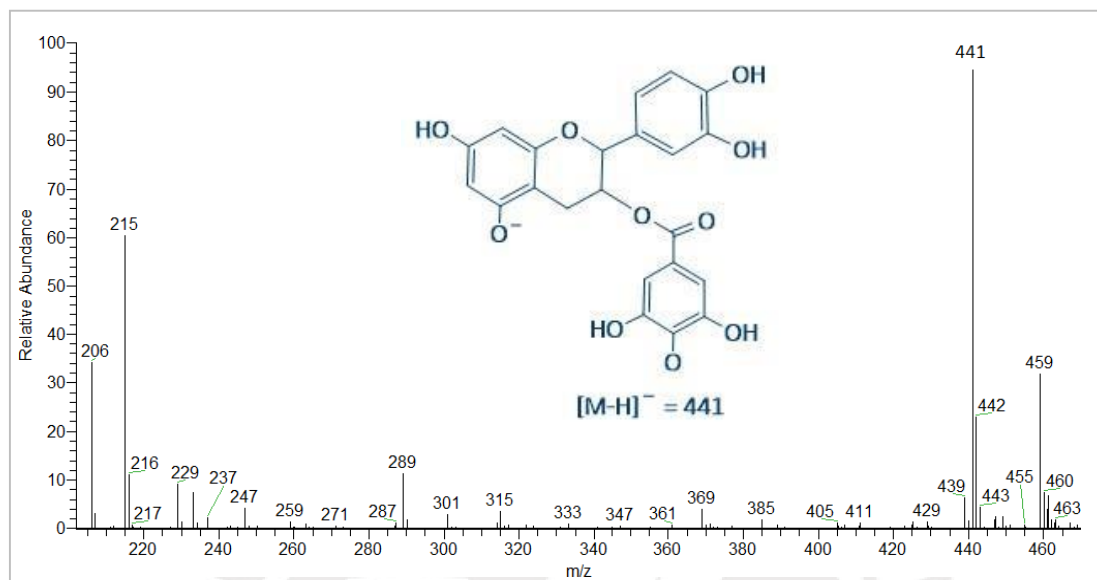


Figura 39. Espectro MS del ion molecular de la epicatequina-3-galato.

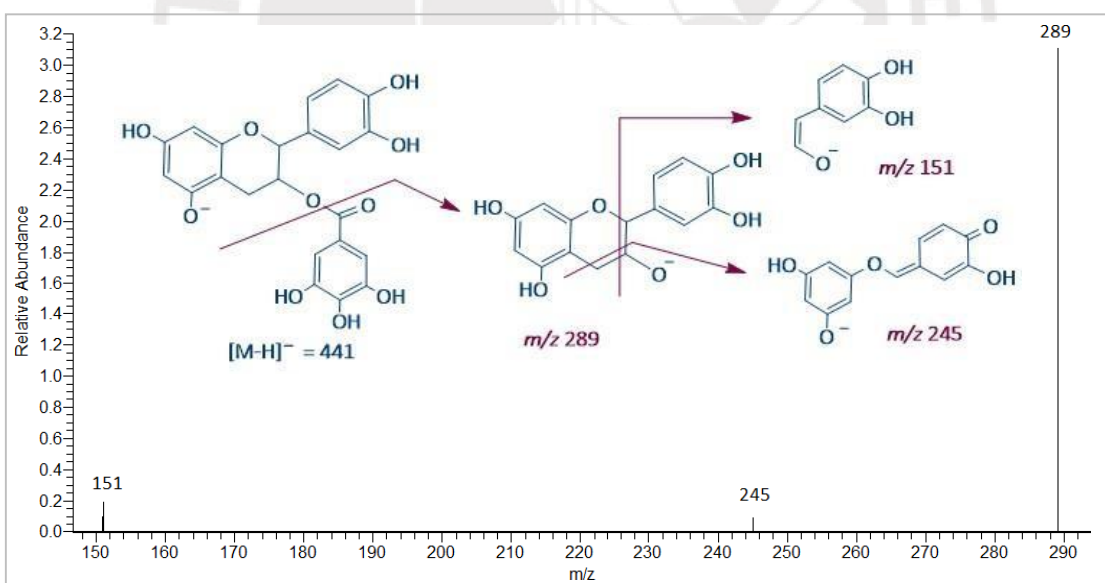


Figura 40. Espectro MS<sup>2</sup> y fragmentación de epicatequina-3-galato (adaptado de Galaverna et al. (123).

Todos estos compuestos son derivados de la catequina y algunos de ellos son isómeros entre sí, presentaron los iones característicos m/z 245 y 151 correspondientes al patrón de fragmentación de la catequina, además de los fragmentos producto de la pérdida de la molécula de hexosa correspondiente como se observa en la Tabla 27.

Así mismo los compuestos **13**, **18**, **23** y **26** se identificaron como procianidinas B3, B1, B4 y B2 respectivamente, con el ion molecular  $m/z$  577. La ruta de fragmentación de los flavanoles oligoméricos bajo ESI-MS en modo negativo se muestra en la Figura 41, los cuales son característicos para cada uno de los casos por tratarse de compuestos isoméricos. Sin embargo la diferenciación entre los mismos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención y el orden de elución reportados en trabajos anteriores (115,118,119). El espectro de masas de las procianidinas se muestra en la Figura 42.

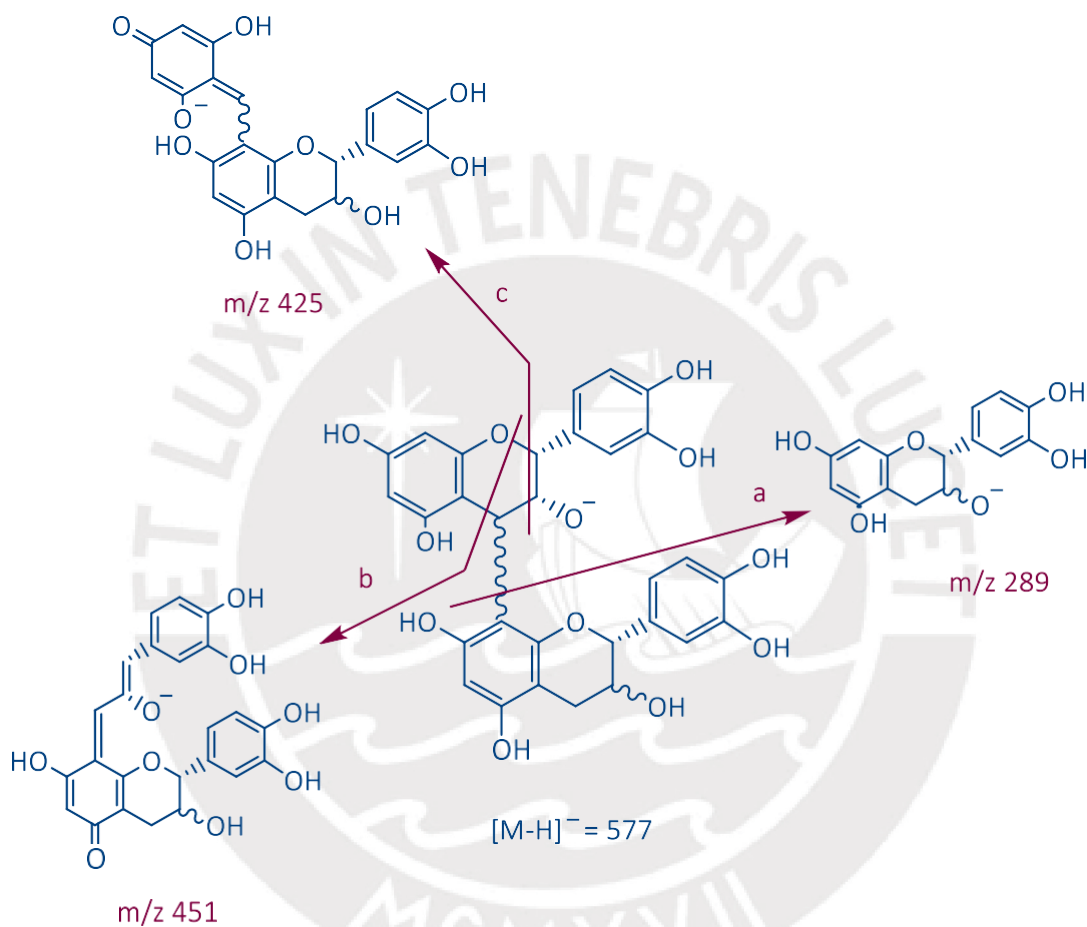


Figura 41. Patrón de fragmentación de las procianidinas.  
Adaptado de Poupard et al. (124).



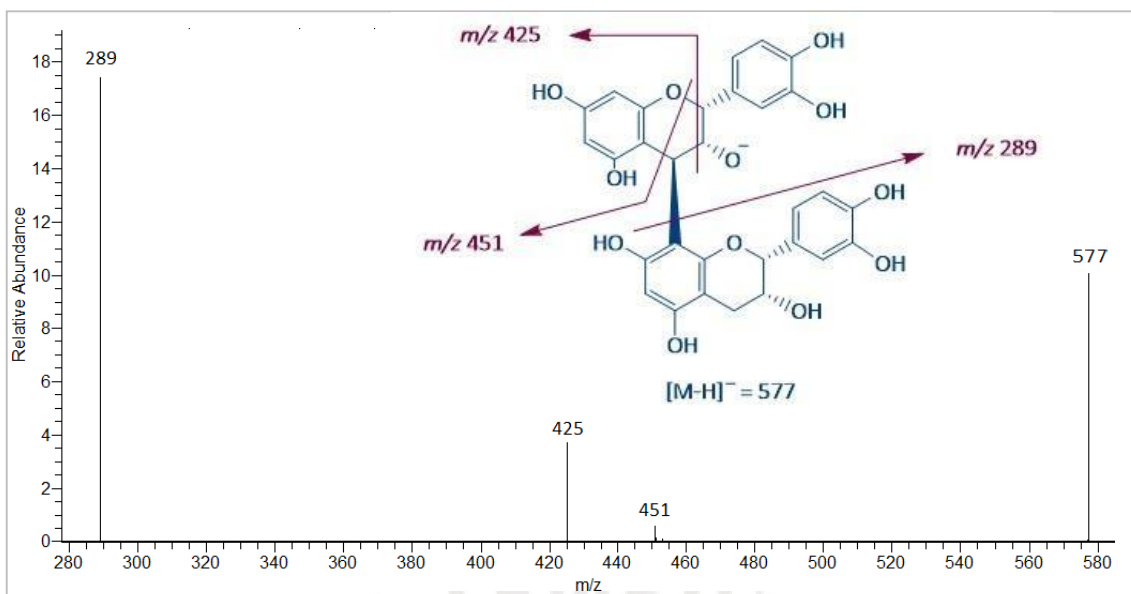


Figura 42. Espectro  $MS^2$  de procianidinas.

El compuesto **2** presentó el ion molecular  $m/z$  377, el cual no coincide con ningún ácido fenólico o flavonoide reportado. De la misma forma al analizar su espectro UV-visible no se observa el pico característico de los ácidos benzoicos y fenólicos por lo que se descarta la posibilidad de que se trate de un compuesto similar. Sin embargo su MS, presenta la señal  $m/z$  en 333, que corresponde a  $[M-H - 44]^-$ , producto de la pérdida del grupo carboxilo, el cual indicaría que se trata de un ácido graso de C-18; por otra parte la fórmula molecular sugiere 10 insaturaciones, lo cual indica la presencia de dobles enlaces y grupos carbonilos. Finalmente con los datos recopilados se sugiere la estructura de un ácido graso polinsaturado no determinado.

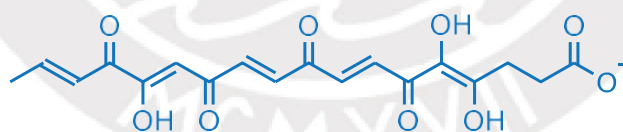


Figura 43. Estructura sugerida para el compuesto **2**.

#### 4.5. Evaluación del efecto gastroprotector de los extractos

En la evaluación del efecto gastroprotector mediante la administración de los extractos metanólico y butanólico vía oral en ratas de la raza Holtzman, a las que se les indujo químicamente úlcera gástrica por la administración de Naproxeno (grupo de control), se encontró que los tratamientos aplicados con diferentes concentraciones, presentaron una menor cantidad de lesiones gástricas respecto al grupo de control, al realizar un análisis descriptivo con ayuda de la escala de Marhuenda como se muestra en la Tabla 29. Estos resultados indican la suma total de los puntos asignados (escala de Marhuenda) por cada lesión causada (o signos evaluados) por el agente ulcerogénico en cada tratamiento. Las lesiones individuales registradas se muestran en la Tabla 37 (ver Anexo).

Tabla 29. Análisis descriptivo del tratamiento con los extractos.

| Signos             | Pérdida de pliegues de mucosa | Decoloración de la mucosa | Edema | Hemorragias | Número de petequias | Intensidad de la ulceración | Total |
|--------------------|-------------------------------|---------------------------|-------|-------------|---------------------|-----------------------------|-------|
| <b>Tratamiento</b> |                               |                           |       |             |                     |                             |       |
| Agua destilada     | 0                             | 0                         | 0     | 0           | 0                   | 0                           | 0     |
| Naproxeno          | 7                             | 0                         | 7     | 0           | 0                   | 127                         | 141   |
| Ranitidina         | 7                             | 3                         | 7     | 0           | 0                   | 0                           | 17    |
| MeOH 200 mg        | 7                             | 7                         | 7     | 0           | 0                   | 96                          | 117   |
| MeOH 400 mg        | 7                             | 4                         | 7     | 0           | 0                   | 77                          | 95    |
| MeOH 600 mg        | 4                             | 3                         | 7     | 0           | 0                   | 14                          | 28    |
| MeOH 800 mg        | 4                             | 2                         | 7     | 0           | 0                   | 50                          | 63    |
| BuOH 200 mg        | 5                             | 3                         | 7     | 0           | 0                   | 48                          | 63    |
| BuOH 400 mg        | 7                             | 2                         | 7     | 0           | 0                   | 36                          | 52    |
| BuOH 600 mg        | 2                             | 0                         | 7     | 0           | 0                   | 36                          | 45    |
| <b>Total</b>       | 50                            | 24                        | 63    | 0           | 0                   | 484                         | 621   |

En la Figura 44 se muestran algunas imágenes de los estómagos extraídos de ratas, en las cuales se pueden observar diferencias macroscópicas en las lesiones causadas al aplicar los tratamientos, control negativo, grupo de control (U.G.I), grupo patrón, extractos metanólico y butanólico.

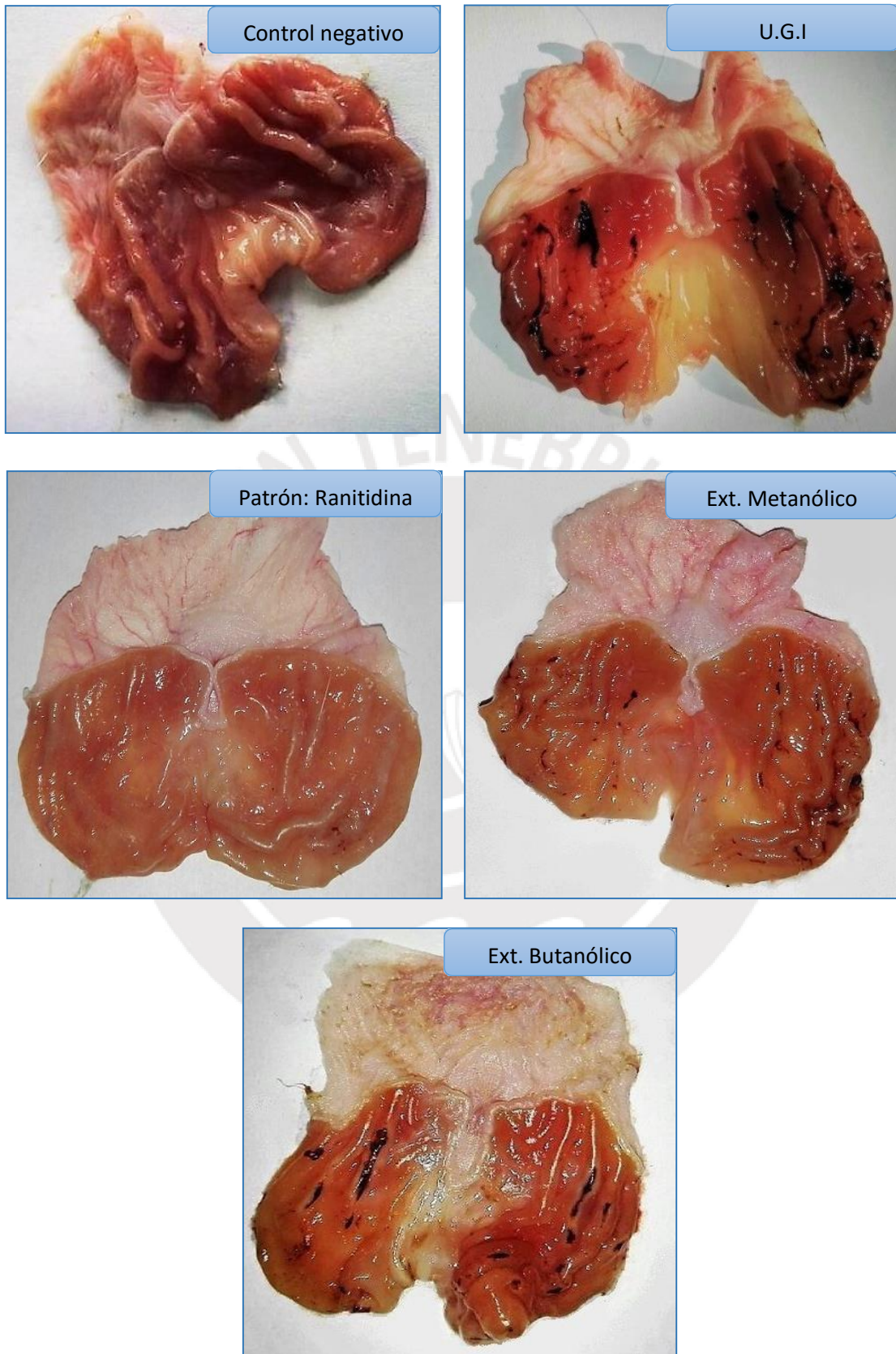


Figura 44. Estómagos extraídos de ratas con los diferentes tratamientos.  
(U.G.I: úlcera gástrica inducida).

#### 4.5.1. Análisis estadístico

En la Tabla 30 se muestra los resultados descriptivos para las puntuaciones totales obtenidas mediante la escala de Marhuenda para cada uno de los tratamientos. En primer lugar, se tiene los promedios de las puntuaciones, en el que se puede observar que el grupo con mayor puntuación es el Naproxeno (media = 20,14) y la Ranitidina con el menor valor (media = 2,43); en cuanto a los extractos, el grupo de ratones tratado con **Ext. MeOH 600 mg**, presentó una puntuación media de 4 unidades. Así mismo se tiene la desviación típica o estándar, la cual nos indica que el grupo más homogéneo, en cuanto a sus respuestas, lo conformó el de ratas tratadas con **Ranitidina** ( $s = 0,53$ ) y el grupo más heterogéneo fue el tratado con **Ext. MeOH 400 mg** ( $s = 5,71$ ).

Tabla 30. Estadísticos descriptivos del ensayo del efecto gastroprotector.

| Tratamiento      | N° indiv. | Media | Desviación estándar (s) | Error estándar | 95 % del intervalo de confianza para la media |                 | Mínimo | Máximo |
|------------------|-----------|-------|-------------------------|----------------|---|-----------------|--------|--------|
|                  |           |       |                         |                | Límite inferior                               | Límite superior |        |        |
| Naproxeno        | 7         | 20,14 | 5,70                    | 2,15           | 14,87   | 25,41           | 9      | 25     |
| Ext. MeOH 200 mg | 7         | 16,71 | 4,54                    | 1,71           | 12,52   | 20,91           | 9      | 23     |
| Ext. MeOH 400 mg | 7         | 13,57 | 5,71                    | 2,16           | 8,29  | 18,85           | 6      | 22     |
| Ext. MeOH 600 mg | 7         | 4,00  | 3,00                    | 1,13           | 1,23  | 6,77            | 1      | 8      |
| Ext. MeOH 800 mg | 7         | 9,00  | 4,32                    | 1,63           | 5,00  | 13,00           | 2      | 13     |
| Ext. BuOH 200 mg | 7         | 9,00  | 3,56                    | 1,35           | 5,71  | 12,29           | 2      | 12     |
| Ext. BuOH 400 mg | 7         | 8,71  | 2,50                    | 0,94           | 6,40  | 11,02           | 5      | 12     |
| Ext. BuOH 600 mg | 7         | 6,43  | 2,57                    | 0,97           | 4,05  | 8,81            | 3      | 10     |
| Ranitidina       | 7         | 2,43  | 0,53                    | 0,20           | 1,93  | 2,92            | 2      | 3      |
| Total            | 63        | 10,00 | 6,63                    | 0,84           | 8,33  | 11,67           | 1      | 25     |

El error estándar se obtiene a partir de la desviación y se usa para determinar las estimaciones interválicas, por ejemplo, se estima que las ratas tratadas con **Ext. MeOH 600 mg** tendrán una puntuación promedio entre 1,23 y 6,77 unidades con un nivel de seguridad del 95 %.

En cuanto a los valores extremos observados tenemos que el menor valor (1) se observó en una rata tratada con Ext. MeOH 600 mg mientras que el máximo valor (25) se registró en el grupo Naproxeno.

La Figura 45 muestra los valores promedio de las puntuaciones, en la que se nota claramente que al aumentar la dosificación del extracto metanólico de las semillas de uva (200; 400 y 600 mg/kg) las puntuaciones disminuyen, es decir hay un aumento del efecto gastroprotector de los extractos, estas puntuaciones aumentan a una dosis mayor (800 mg/kg) es decir se pierde el efecto. Al observar la evolución de los promedios de los extractos butanólico de las semillas de uva se observa que las puntuaciones van disminuyendo según el incremento en la dosis aplicada (de 200; 400 y 600 mg/kg).

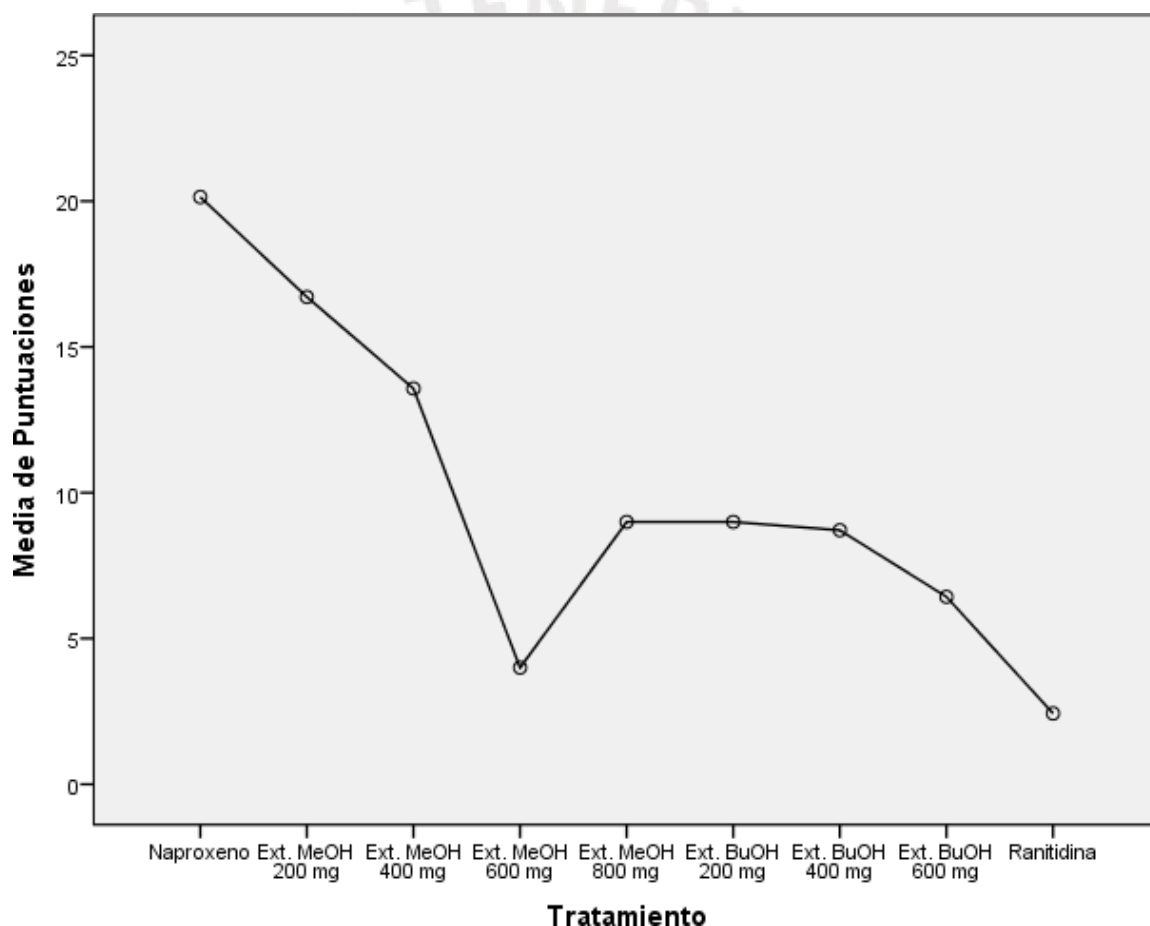


Figura 45. Gráfico de Medias para los tratamientos aplicados.

Por otra parte, en la Tabla 31 se presenta la prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas para los tratamientos aplicados, la cual al tener un “p” valor menor a 0,05 rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas, con lo cual no es posible realizar la prueba ANOVA.

Tabla 31. Prueba de homogeneidad de varianzas.

| Estadístico de Levene | gl1* | gl2 | Sig** (p valor) |
|-----------------------|------|-----|-----------------|
| 2,444                 | 8    | 54  | 0,025           |

\* gl: grados de libertad

\*\* Sig: significación

La Tabla 32, presenta la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis la cual no presupone varianzas iguales, dado que el p valor es menor a 0,05 se rechaza la hipótesis de igualdad de promedios, es decir existe al menos un tratamiento con efectos diferenciados.

Tabla 32. Prueba de Kruskal Wallis.

|                           | Puntuaciones |
|---------------------------|--------------|
| Chi-cuadrado              | 41,810       |
| gl                        | 8            |
| Sig. Asintótica (p valor) | 0,000        |

Mediante el método de Games-Howell (prueba de comparaciones múltiples) el cual tampoco presupone igualdad de varianzas, fue posible determinar cuál o cuáles de los tratamientos presentan efecto gastroprotector. Es así que en la Tabla 33 se muestra las comparaciones de los promedios de las puntuaciones dos a dos, es decir en primer lugar compara el Naproxeno con cada uno de nuestros extractos para determinar si tienen un efecto gastroprotector y en segundo lugar, se comparan estos versus la Ranitidina para determinar si son comparables en cuanto a su efecto.

Al observar el **p** valor, se evidencia que existe una diferencia de promedios o un efecto gastroprotector para el caso de cinco extractos: Ext. MeOH 600 mg (p valor = 0,002), Ext. MeOH 800 mg (p valor = 0,029), Ext. BuOH 200 mg (p valor = 0,023), Ext. BuOH 400 mg (p valor = 0,018) y Ext. BuOH 600 mg (p valor = 0,006). Seguidamente comparamos la Ranitidina versus estos cinco extractos del párrafo anterior, en este caso nos interesa los que sean comparables, así tenemos 3 extractos que no se puede demostrar que sean diferentes, es decir, que su efecto es comparable a la Ranitidina. Estos son Ext. MeOH 600 mg (p valor= 0,879), Ext. MeOH 800 mg (p valor= 0,077) y Ext. BuOH 600 mg (p valor=0,070).

Tabla 33. Comparaciones múltiples: Games-Howell.

| (I) Tratamiento | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | p valor | Intervalo de confianza al 95% |                 |       |
|-----------------|----------------------------|----------------|---------|-------------------------------|-----------------|-------|
|                 |                            |                |         | Límite inferior               | Límite superior |       |
| Naproxeno       | Ext. MeOH 200 mg           | 3,43           | 2,75    | 0,929                         | -6,92           | 13,77 |
|                 | Ext. MeOH 400 mg           | 6,57           | 3,05    | 0,484                         | -4,78           | 17,92 |
|                 | Ext. MeOH 600 mg           | 16,14*         | 2,43    | 0,002                         | 6,54            | 25,75 |
|                 | Ext. MeOH 800 mg           | 11,14*         | 2,70    | 0,029                         | 0,94            | 21,34 |
|                 | Ext. BuOH 200 mg           | 11,14*         | 2,54    | 0,023                         | 1,35            | 20,93 |
|                 | Ext. BuOH 400 mg           | 11,42*         | 2,35    | 0,018                         | 1,91            | 20,95 |
|                 | Ext. BuOH 600 mg           | 13,71*         | 2,36    | 0,006                         | 4,19            | 23,24 |
| Ranitidina      | Ext. MeOH 200 mg           | -14,28*        | 1,73    | 0,002                         | -21,92          | -6,65 |
|                 | Ext. MeOH 400 mg           | -11,143*       | 2,17    | 0,026                         | -20,77          | -1,52 |
|                 | Ext. MeOH 600 mg           | -1,57          | 1,15    | 0,879                         | -6,61           | 3,46  |
|                 | Ext. MeOH 800 mg           | -6,57          | 1,65    | 0,077                         | -13,84          | 0,70  |
|                 | Ext. BuOH 200 mg           | -6,57*         | 1,36    | 0,032                         | -12,55          | -0,59 |
|                 | Ext. BuOH 400 mg           | -6,28*         | 0,97    | 0,006                         | -10,47          | -2,10 |
|                 | Ext. BuOH 600 mg           | -4,00          | 0,99    | 0,070                         | -8,31           | 0,31  |

\* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Al realizar el análisis del porcentaje de inhibición, se observó que la administración de las diferentes dosis de los extractos de semillas de uva, *Vitis vinífera* de la variedad Malbec, mostró efectos positivos para inhibir las lesiones gástricas provocadas por Naproxeno. La Tabla 34 muestra los porcentajes de inhibición observados para cada tratamiento; de los extractos metanólicos aplicados, el que presentó mayor porcentaje de inhibición fue el Ext. MeOH 600 mg con 80 % de inhibición de la ulceración y en cuanto a los extractos butanólicos, el que presentó una mayor inhibición fue el Ext. BuOH 600 mg con un 68 % de inhibición de la ulceración tal como se observan en la Figura 45 y Figura 46 (digrama de barras).

La tendencia inhibitoria es directa con el incremento de la dosis de extracto aplicada, es decir a mayor dosis mayor porcentaje de inhibición; sin embargo en el caso específico del extracto metanólico se observó que un incremento en la dosis por encima de los 600 mg/kg, el efecto gastroprotector tiende a disminuir.

Tabla 34. Porcentaje de Inhibición.

| Tratamiento      | Media | % de Inhibición |
|------------------|-------|-----------------|
| Naproxeno        | 20,14 | 0               |
| Ext. MeOH 200 mg | 16,71 | 17              |
| Ext. MeOH 400 mg | 13,57 | 33              |
| Ext. MeOH 600 mg | 4,00  | 80              |
| Ext. MeOH 800 mg | 9,00  | 55              |
| Ext. BuOH 200 mg | 9,00  | 55              |
| Ext. BuOH 400 mg | 8,71  | 57              |
| Ext. BuOH 600 mg | 6,43  | 68              |
| Ranitidina       | 2,43  | 88              |

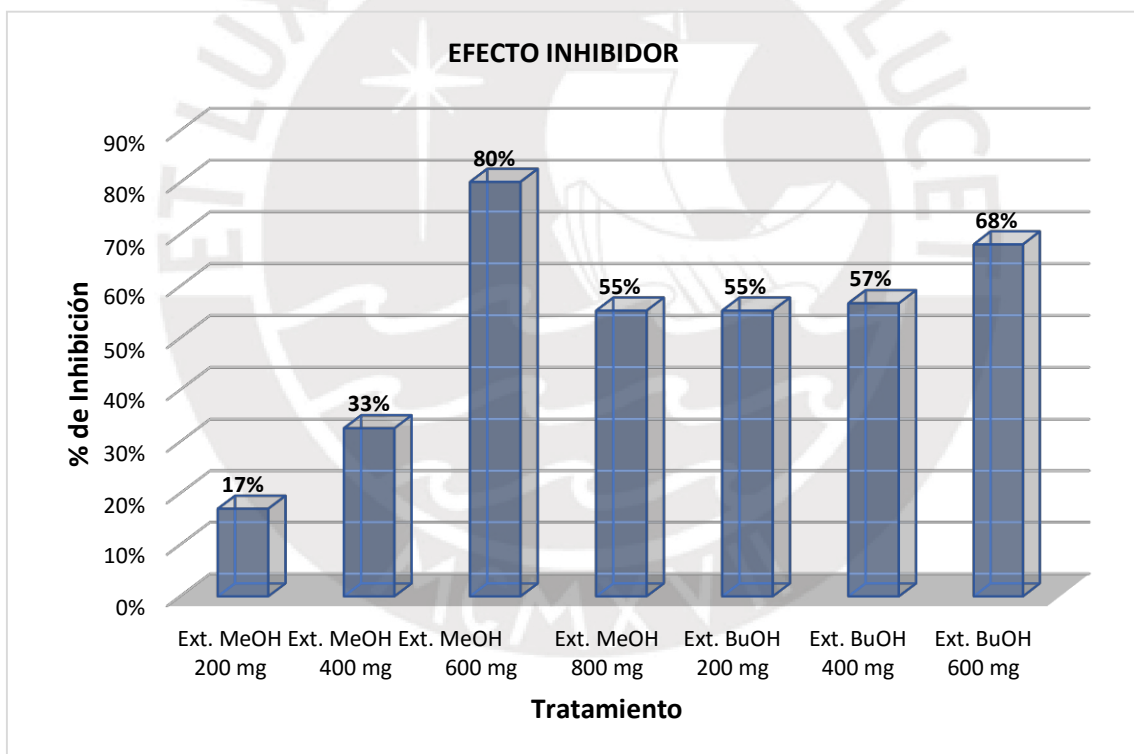


Figura 46. Efecto inhibitorio de los tratamientos.

El uso de plantas medicinales y productos alimenticios con alto contenido de metabolitos secundarios, especialmente aquellos con propiedades antioxidantes, son en la actualidad focos de gran atención tanto en la medicina natural como la alternativa. Este gran interés surge como respuesta a la necesidad de revalorar el uso de estas fuentes de compuestos bioactivos en acciones preventivas frente a síntomas o algunas enfermedades (42,94).



Los resultados demuestran que el extracto metanólico de semillas de uva (*Vitis vinífera*), posee mayor efecto gastroprotector que el extracto butanólico contra el daño gástrico inducido por el Naproxeno en ratas.

El efecto gastroprotector o también llamado efecto antiulceroso se le atribuye a la presencia de diferentes compuestos orgánicos, como ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, (principalmente, ácidos fenólicos y flavonoides), además de las cumarinas (125), presentes en el extracto metanólico de semillas de uva (ver Tabla 28). La presencia de compuestos con actividad antioxidante hace posible que estos interfieran en el metabolismo de las prostaglandinas. Especialmente la PGE2, debido a que se encarga de la activación de los receptores EP1 y EP3, y como consecuencia la inhibición de la secreción del ácido clorhídrico por el mucocitoprotector, mediante diferentes mecanismos de acuerdo al tipo de compuesto antioxidante (126,127).



## 5. CONCLUSIONES

El método GC-FID fue una herramienta útil para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de uva extraídas, tanto por el método Soxhlet como CO<sub>2</sub> supercrítico. El método Soxhlet presentó mayor rendimiento de extracción de aceite, por lo que en términos de rendimientos este método es recomendable frente a la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Sin embargo al analizar el contenido de ácidos grasos en el aceite, es decir en términos de selectividad, el uso de CO<sub>2</sub> supercrítico demostró ser el mejor.

La cuantificación de fenoles totales se alcanzó satisfactoriamente empleando el método Folin Ciocalteu. Los valores obtenidos evidencian la presencia de altos contenidos de compuestos antioxidantes en la semilla de uva de la variedad Malbec, valores que son comprobables con semillas de uva fresca (sin previo procesamiento) de otras variedades. Se demostró que las semillas utilizadas, residuos de la industria vitivinícola, son fuente considerable de compuestos fenólicos.

El empleo del radical DPPH• en la determinación de la actividad antioxidante in vitro del extracto metanólico fue muy útil, el cual permitió calcular el CI<sub>50</sub> y por consiguiente realizar una comparación con la actividad antioxidante del ácido ascórbico. Se observó que el extracto metanólico posee un valor de IC<sub>50</sub> menor que la vitamina C. Sin embargo en términos del porcentaje de inhibición ambos alcanzan un valor cercano a 96%, el cual indica que el extracto metanólico posee actividad antioxidante comparable a la vitamina C.

El método UHPLC, acoplado con LTQ-Orbitrap, demostró ser confiable y efectivo, debido a que proporciona información necesaria y adecuada para la elucidación estructural. La identificación de compuestos fenólicos en el extracto de semillas de uva de la variedad Malbec, se realizó exitosamente, se caracterizaron los componentes fenólicos principales y traza. Así mismo se concluye que los flavanoles son los constituyentes principales.

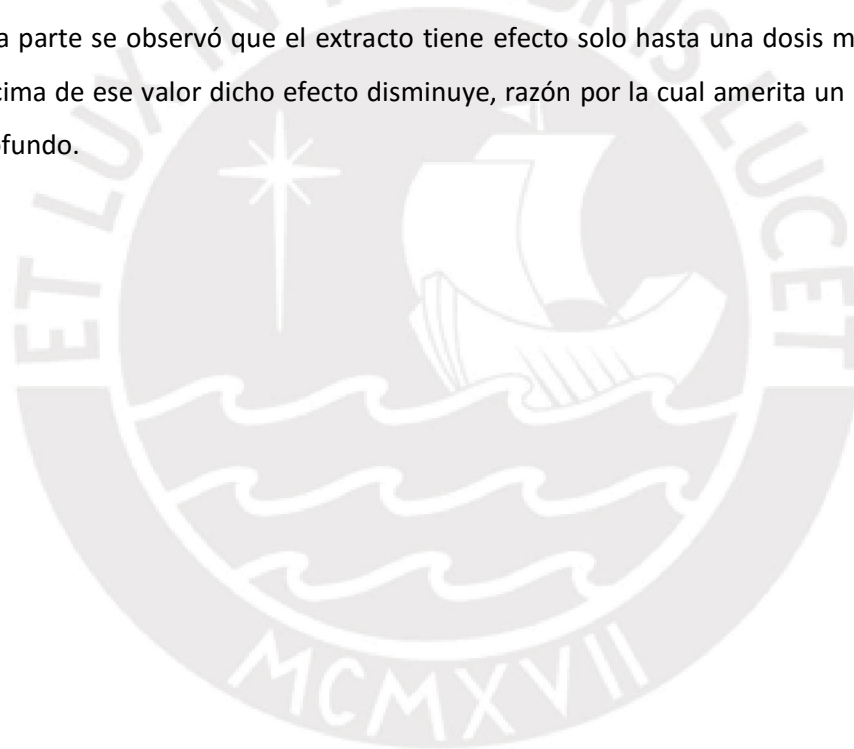
Los extractos metanólico y butanólico de semillas de uva de la variedad Malbec inducen a la producción de mucus en la mucosa gástrica frente a la úlcera inducida por Naproxeno en ratas, acción debida a la presencia de componentes bioactivos. El extracto metanólico presentó un mayor efecto gastroprotector que el extracto butanólico, comparable al de la Ranitidina.

Los resultados obtenidos muestran que las semillas de uva, un residuo principal de la industria vitivinícola, son una fuente valiosa de compuestos bioactivos como el aceite (rico en ácidos grasos) y compuestos fenólicos, componentes de gran importancia de uso industrial, uso alimenticio y con importantes aplicaciones farmacológicas.

## 6. RECOMENDACIONES:

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, quedan abiertas algunas consideraciones a tomar en cuenta y opciones para continuar la investigación.

- En lo que respecta a la caracterización de los metabolitos de semillas de uva o residuos orgánicos en general, es útil conocer el material de trabajo en cuanto a los componentes de interés para su aprovechamiento adecuado.
- Para la aplicación farmacológica de cualquier producto es recomendable realizar un análisis previo, pruebas toxicológicas.
- En cuanto al efecto gastroprotector, es necesario profundizar el estudio en cuanto a la composición de los extractos dosificados, porque es importante conocer cuál de todos los componentes es quien tiene dicho efecto o si se trata de una acción sinérgica. Por otra parte se observó que el extracto tiene efecto solo hasta una dosis máxima y por encima de ese valor dicho efecto disminuye, razón por la cual amerita un estudio más profundo.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Fraternali D, Ricci D, Verardo G, Gorassini A, Stocchia V, Sestili P. Activity of *Vitis vinifera* Tendrils Extract Against Phytopathogenic Fungi. *Nat Prod Commun*. 2015;10(6):1037-42.
2. Crews C, Hough P, Godward J, Brereton P, Lees M, Guet S, et al. Quantitation of the Main Constituents of Some Authentic Grape-Seed Oils of Different Origin. *J Agric Food Chem*. 2006;54(17):6261-5.
3. Bail S, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer G. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chem*. 2008;108(3):1122-32.
4. Da Porto C, Porretto E, Decorti D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem*. 2013;20(4):1076-80.
5. Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre P-L. Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. *J Agric Food Chem*. 2001;49(7):3341-8.
6. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet Lond Engl*. 1992;339(8808):1523-6.
7. Düring H, Davtyan A. Developmental changes of primary processes of photosynthesis in sun-and shade-adapted berries of two grapevine cultivars. *VITIS-J Grapevine Res*. 2015;41(2):63.
8. Haselgrove L, Botting D, Heeswijck R van, Høj PB, Dry PR, Ford C, et al. Canopy microclimate and berry composition: the effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L cv. Shiraz grape berries. *Aust J Grape Wine Res*. 2000;6(2):141-149.
9. Gómez Romero M. Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales. [Tesis doctoral]. Universidad de Granada; 2010.
10. Watson RR, editor. Polyphenols in plants: isolation, purification and extract preparation. First edition. Amsterdam: Elsevier, Academic Press; 2014. 331 p.
11. Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;41(5):1523-42.
12. Baruah JB. Chemistry of phenolic compounds: state of the art. New York: Nova Science Publishers; 2011.
13. Creus E. Compuestos fenólicos, un análisis de sus beneficios para la salud. *Ámbito Farm*. 2004;23:80-84.
14. Toso RE, Skliar MI. Aislamiento, identificación y cuantificación de compuestos con actividad gastroprotectora presentes en *Centaurea solstitialis*. *Ciencia veterinaria*. Red Universidad Nacional de La Pampa; 2000.
15. Goel RK, Maiti RN, Tavares IA. Role of endogenous eicosanoids in the antiulcer effect of kaempferol. *Fitoterapia*. 1996;67(6):548-52.

16. Biodiversidad y desarrollo en el Perú [Internet]. [citado 18 de junio de 2017]. Disponible en: [http://www.peruecologico.com.pe/lib\\_c21\\_t09.htm](http://www.peruecologico.com.pe/lib_c21_t09.htm)
17. Informe seguimiento agroeconómico (ISA) [Internet]. [citado 18 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.minagri.gob.pe/portal/seguimiento-agroeconomico-isa>
18. MINAGRI. Informe de Seguimiento Agroeconómico (ISA) IV-trimestre\_2016 [Internet]. 2017. Disponible en: <http://www.minagri.gob.pe/portal/seguimiento-agroeconomico-isa/isa-trimestral-2016>
19. ISA Trimestral 2016 [Internet]. [citado 15 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.minagri.gob.pe/portal/seguimiento-agroeconomico-isa/isa-trimestral-2016>
20. Vitseva O, Varghese S, Chakrabarti S, Folts JD, Freedman JE. Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46(4):445-51.
21. Estudian el empleo de orujo de uva en la alimentación del ganado ovino — Noticias de la Ciencia y la Tecnología (Amazings® / NCYT®) [Internet]. [citado 18 de junio de 2017]. Disponible en: <http://noticiasdelaciencia.com/not/17814/estudian-el-empleo-de-orujo-de-uva-en-la-alimentacion-del-ganado-ovino/>
22. Haprowine.eu [Internet]. [citado 18 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.haprowine.eu/introduccion.php>
23. Ventosa E, Clemente R, Pereda L. Generación y Gestión de Residuos del Sector. Report No.: LIFE08 ENV/E/000143.
24. Vislocky LM, Fernandez ML. Biomedical effects of grape products. *Nutr Rev.* 2010;68(11):656-70.
25. Yilmaz Y, Toledo RT. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends Food Sci Technol.* 2004;15(9):422-33.
26. Rózek A, Achaerandio I, Almajano MP, Güell C, López F, Ferrando M. Solid foodstuff supplemented with phenolics from grape: antioxidant properties and correlation with phenolic profiles. *J Agric Food Chem.* 2007;55(13):5147-55.
27. Manach C, Hubert J, Llorach R, Scalbert A. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53(10):1303-15.
28. Harborne JB. *Phytochemical Methods.* Dordrecht: Springer Netherlands; 1984.
29. Yonekura-Sakakibara K, Saito K. Functional genomics for plant natural product biosynthesis. *Nat Prod Rep.* 2009;26(11):1466-87.
30. Dewick PM. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.* John Wiley & Sons; 2002. 524 p.
31. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 2011;126(4):1821-35.
32. Garrido J, Borges F. Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Res Int.* 2013;54(2):1844-58.
33. Paladino S. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.) [Tesis de maestría]. [Mendoza]: Universidad Nacional de Cuyo; 2008.

34. Rice-Evans CA, Packer L. *Flavonoids in Health and Disease*. Second Edition. CRC Press; 2003. 496 p.
35. Stuart JA, Robb EL. *Bioactive Polyphenols from Wine Grapes*. New York, NY: Springer New York; 2013.
36. Fernandez Pachon MS, Villafio D, Troncoso AM, García Parrilla M. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Arch Latinoam Nutr*. 2006;56(2):110–122.
37. Latorre Leal M. *Polifenoles de la uva [Tesis de grado]*. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2016.
38. Xia E-Q, Deng G-F, Guo Y-J, Li H-B. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int J Mol Sci*. 2010;11(2):622-46.
39. Grases F, Prieto RM, Fernandez-Cabot RA, Costa-Bauzá A, Tur F, Torres JJ. Effects of Polyphenols from Grape Seeds on Renal Lithiasis. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:1-6.
40. Chong MF-F, Macdonald R, Lovegrove JA. Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr*. 2010;104(S3):S28-39.
41. Menéndez Soriano C. *Efectos vasculares de la quercetina y la catequina: interacciones y papel de los procesos de conjugación y desconjugación metabólica [Tesis doctoral]*. Universidad Complutense de Madrid; 2012.
42. Winkel Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*. 2001;126(2):485–493.
43. Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci*. 2005;10(5):236-42.
44. Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci*. 2012;3.
45. Winkel Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol*. 2002;5(3):218–223.
46. Bruneton J. *Farmacognosia: Fitoquímica y plantas medicinales*. 2da ed. Acribia S. A; 1993.
47. Ikan R. *Natural products: a laboratory guide*. 2nd ed. San Diego, Calif: Academic Press; 1991. 360 p.
48. Iwashina T. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *J Plant Res*. 2000;113(3):287-99.
49. Marks SC, Mullen W, Crozier A. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. *J Sci Food Agric*. 2007;87(4):719-28.
50. de Freitas V, da Silva Porto P, Assunção M, Cadete-Leite A, Andrade JP, Paula-Barbosa MM. Flavonoids from grape seeds prevent increased alcohol-induced neuronal lipofuscin formation. *Alcohol Alcohol Oxf Oxf*. 2004;39(4):303-11.
51. Yilmaz Y, Toledo RT. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agric Food Chem*. 2004;52(2):255-60.
52. Del Rio D, Stewart AJ, Mullen W, Burns J, Lean MEJ, Brighenti F, et al. HPLC-MSn Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea. *J Agric Food Chem*. 2004;52(10):2807-15.

53. Andersen ØM, Markham KR, editores. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor & Francis; 2006. 1237 p.
54. Walle T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin Cancer Biol.* 2007;17(5):354-62.
55. Aron PM, Kennedy JA. Compositional Investigation of Phenolic Polymers Isolated from *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir during Fermentation. *J Agric Food Chem.* 2007;55(14):5670-80.
56. Clifford MN. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 2000;80(7):1063-72.
57. Vermerris W, Nicholson RL. *Phenolic compound biochemistry*. Dordrecht: Springer; 2006. 276 p.
58. Mazza G, Miniati E, others. *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. CRC press; 1993.
59. Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res.* 2017;61(1):1361779.
60. Barnes S. Phyto-oestrogens and osteoporosis: what is a safe dose? *Br J Nutr.* 2003;89(S1):S101–S108.
61. Buckingham J, Munasinghe VRN. *Dictionary of Flavonoids with CD-ROM*. CRC Press; 2015.
62. Herrmann K. Flavonols and flavones in food plants: a review†. *Int J Food Sci Technol.* 1976;11(5):433-48.
63. Duarte J, Pérez-Vizcaíno F. Protección cardiovascular con flavonoides: enigma farmacocinético. *Ars Pharm Internet.* 2015;56(4):193–200.
64. Martínez Flórez S, González Gallego J, Culebras JM, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 2002;17(6):271–278.
65. Escamilla Jiménez CI, Cuevas Martínez EY, Guevara Fonseca J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM.* 2009;52(2):73–75.
66. Heiss C, Keen CL, Kelm M. Flavanols and cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J.* 2010;31(21):2583-92.
67. Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr.* 2005;135(1):48–52.
68. Van der Woude H, Boersma MG, Vervoort J, Rietjens IM. Identification of 14 quercetin phase II mono- and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II in vitro model systems. *Chem Res Toxicol.* 2004;17(11):1520–1530.
69. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1):230S–242S.
70. Palou A. *El Libro blanco de las grasas en la alimentación funcional*. Barcelona: Unilever España; 2008.

71. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Fundación Iberoamericana de Nutrición. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana: consulta de expertos : 10-14 de noviembre de 2008 Ginebra. Granada: FAO FINUT; 2012.
72. Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.* 1997;15(10):401–409.
73. La MG, Giammanco S, Di DM, Tabacchi G, Tripoli E, Giammanco M. Omega 3 fatty acids: biological activity and effects on human health. *Panminerva Med.* 2005;47(4):245-57.
74. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. *J Biol Chem.* 2002;277(52):50230-6.
75. Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85(6):1629-42.
76. Ando H, Ryu A, Hashimoto A, Oka M, Ichihashi M. Linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. *Arch Dermatol Res.* 1998;290(7):375-81.
77. Georgiev V, Ananga A, Tsoлова V. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients.* 2014;6(1):391-415.
78. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem.* 1992;40(12):2379-83.
79. Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D, Hertog MGL, Hollman PCH, Hertog MGL, et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet.* 1993;342(8878):1007-11.
80. Hertog MG, Hollman PC. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr.* 1996;50(2):63-71.
81. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 1995;33(12):1061-80.
82. Fuente Marín L. Estudio de la capacidad antioxidante de los polifenoles del vino y sus aplicaciones biológico/preventivas [Tesis de grado]. [Villaviciosa de Odón]: Universidad Europea Laureate; 2014.
83. Fanzone M, Zamora F, Jofré V, Assof M, Peña-Neira Á. Phenolic Composition of Malbec Grape Skins and Seeds from Valle de Uco (Mendoza, Argentina) during Ripening. Effect of Cluster Thinning. *J Agric Food Chem.* 2011;59(11):6120-36.
84. Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno DA, et al. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int J Mol Sci.* 2014;15(9):15638-78.
85. Pérez Trueba G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cuba Investig Bioméd.* 2003;22(1):0–0.
86. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta.* 2013;763:1-10.
87. Gülçin İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol.* 2012;86(3):345-91.



88. Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Bilić M, Velić D. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J Food Eng.* 2006;81(1):236-42.
89. Sagaró E. Gastritis. *Rev Gastrohnp.* 2009;11(3).
90. Valdivia Roldán M. Gastritis y gastropatías. *Rev Gastroenterol Perú.* 2011;31(1):38–48.
91. Abreu L, García LA. *Gastroenterología: endoscopia diagnóstica y terapéutica.* Ed. Médica Panamericana; 2007. 456 p.
92. Ramírez Ramos A, Mendoza Requena D, Leey Casella J, Guerra Valencia J. Estudio del *Helicobacter pylori* en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2002;19(4):209–214.
93. Albornoz Troncoso OC. *Actividad gastroprotectora del diterpeno aromático ferruginol [Tesis de grado]. [Valdivia - Chile]: Universidad Austral de Chile; 2004.*
94. Borja Bartolo K. *Efecto gastroprotector del extracto hidroalcohólico de las hojas de Mutisia acuminata R. & p. "Chinchilcuma" [Tesis de grado]. [Perú]: Universidad Norbert Wiener; 2013.*
95. Ferrer López I, Pérez Pozo JM, Herrerías Gutiérrez JM, Faus Dáder MJ, Universidad de Granada, Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica. *Guía de seguimiento farmacoterapéutico sobre úlcera péptica.* Granada: Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica; 2004.
96. Camacho Mora JE. *Úlcera péptica. Revista Médica de Costa Rica y Centro América.* 2014;129-34.
97. Bonet JT, Egea AM, Herola AG. *Úlcera gástrica y duodenal. Guía Actuac Clínica En AP Internet.* 2002;
98. Martín de Argila de Prados C, Boixeda de Miquel D. *Úlcera péptica. Rev Esp Enfermedades Dig.* 2004;96(1):81–82.
99. Gaibor Recalde DV. *Determinación de la actividad gastroprotectora de savia de sande (Brosimum utile) en ratas (Rattus norvegicus) con lesiones gástricas inducidas [Tesis de grado]. [Riobamba - Ecuador]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2013.*
100. Hurtado Manrique PE. *Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de Juglans neotropica Diels" Nogal peruano" [Tesis de grado]. [Perú]: Universidad Norbert Wiener; 2014.*
101. Fiori L, Lavelli V, Duba KS, Sri Harsha PSC, Mohamed HB, Guella G. *Supercritical CO2 extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. J Supercrit Fluids.* 2014;94:71-80.
102. Yu L, Perret J, Harris M, Wilson J, Haley S. *Antioxidant Properties of Bran Extracts from "Akron" Wheat Grown at Different Locations. J Agric Food Chem.* 2003;51(6):1566-70.
103. Barrón-Yáñez RM, García-Mateos M, Soto-Hernández MR, Colinas-León T, Kite G. *Flavonoides y actividad antioxidante de Calia secundiflora (Ort.) Yakovlev. Rev Fitotec Mex.* 2011;34(3):151–157.
104. Simirgiotis M, Quispe C, Bórquez J, Areche C, Sepúlveda B. *Fast Detection of Phenolic Compounds in Extracts of Easter Pears (Pyrus communis) from the Atacama Desert by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UHPLC–Q/Orbitrap/MS/MS). Molecules.* 2016;21(1):92.

105. Maier T, Schieber A, Kammerer DR, Carle R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem.* 2009;112(3):551-9.
106. Passos CP, Silva RM, Da Silva FA, Coimbra MA, Silva CM. Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. *Chem Eng J.* 2010;160(2):634-40.
107. Beveridge THJ, Girard B, Kopp T, Drover JCG. Yield and Composition of Grape Seed Oils Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Petroleum Ether: Varietal Effects. *J Agric Food Chem.* 2005;53(5):1799-804.
108. Prado JM, Dalmolin I, Carareto NDD, Basso RC, Meirelles AJA, Vladimir Oliveira J, et al. Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *J Food Eng.* 2012;109(2):249-57.
109. Li Y, Skouroumounis GK, Eley GM, Taylor DK. Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chem.* 2011;129(2):570-6.
110. Bozan B, Tosun G, Özcan D. Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. *Food Chem.* 2008;109(2):426-30.
111. Marqués JL, Porta GD, Reverchon E, Renuncio JAR, Mainar AM. Supercritical antisolvent extraction of antioxidants from grape seeds after vinification. *J Supercrit Fluids.* 2013;82:238-43.
112. Villanueva-Tiburcio JE, Condezo-Hoyos LA, Asquiere ER. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). *Food Sci Technol.* 2010;30:151-60.
113. Cádiz-Gurrea M de la L, Fernández-Arroyo S, Joven J, Segura-Carretero A. Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Res Int.* 2013;50(1):197-204.
114. Abu Reidah IM, Contreras MM, Arráez Román D, Segura Carretero A, Fernández Gutiérrez A. Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application. *J Chromatogr A.* 2013;1313:212-27.
115. Baiano A, Previtali MA, Viggiani I, De Gianni A. Maceration procedures alternative to the standard vinification in red: the case of Nero di Troia wine. *Eur Food Res Technol.* 2016;242(6):825-35.
116. Sommella E, Pepe G, Pagano F, Ostacolo C, Tenore GC, Russo MT, et al. Detailed polyphenolic profiling of Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca) by a combination of RP-UHPLC and HILIC, both hyphenated to IT-TOF mass spectrometry. *Food Res Int.* 2015;76:466-77.
117. Perestrelo R, Lu Y, Santos SAO, Silvestre AJD, Neto CP, Câmara JS, et al. Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Food Chem.* 2012;135(1):94-104.
118. Monagas M, Suárez R, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *Am J Enol Vitic.* 2005;56(2):139-147.

119. Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B, Laureano O, Ricardo da Silva JM. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J Agric Food Chem*. 2003;51(22):6475–6481.
120. Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agric Food Chem*. 2004;52(14):4360-7.
121. Lee J-H, Johnson JV, Talcott ST. Identification of Ellagic Acid Conjugates and Other Polyphenolics in Muscadine Grapes by HPLC-ESI-MS. *J Agric Food Chem*. 2005;53(15):6003-10.
122. Fabre N, Rustan I, de Hoffmann E, Quetin-Leclercq J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2001;12(6):707–715.
123. Galaverna RS, Sampaio PTB, Barata LES, Eberlin MN, Fidelis CHV. Differentiation of two morphologically similar Amazonian Aniba species by mass spectrometry leaf fingerprinting. *Anal Methods*. 2015;7(5):1984-90.
124. Poupard P, Sanoner P, Baron A, Renard CMGC, Guyot S. Characterization of procyanidin B2 oxidation products in an apple juice model solution and confirmation of their presence in apple juice by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry: LC-ESI-MS/MS of procyanidin B2 oxidation products. *J Mass Spectrom*. 2011;46(11):1186-97.
125. Mota KSL, Dias GEN, Pinto MEF, Luiz-Ferreira Â, Monteiro Souza-Brito AR, Hiruma Lima CA, et al. Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules*. 2009;14(3):979-1012.
126. Chavéz Flores JE. Estudio Fitoquímico y efecto antiulceroso del extracto acuoso de hoja *Vallea stipularis* Lf" Chuillur" en ratas. *Rev Acad Perú Salud*. 2007;14(2).
127. Díaz-Casasola L. Mucosa gástrica: mecanismos protectores y efectos dañinos del ácido acetilsalicílico. *Enfoques fisiológico y bioquímico. Rev Med E Investig*. 2015;100-3.

8. ANEXOS

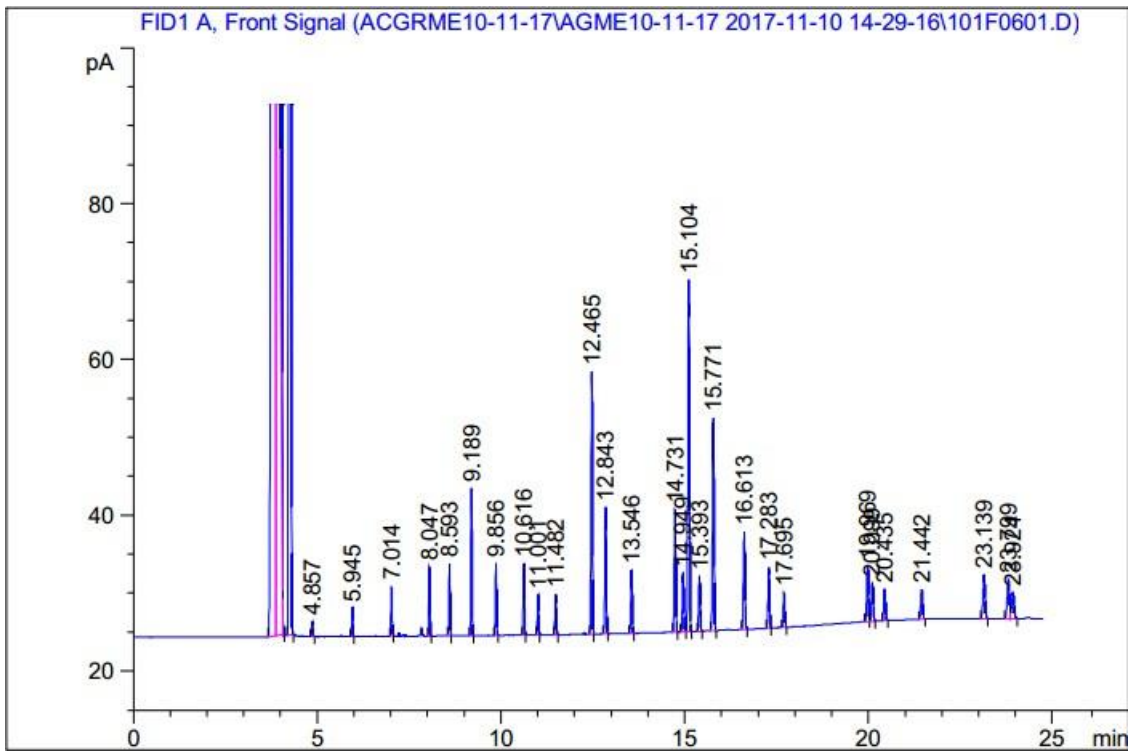


Figura 47. Cromatograma GC-FID del estándar FAMES Mix 28 componentes.

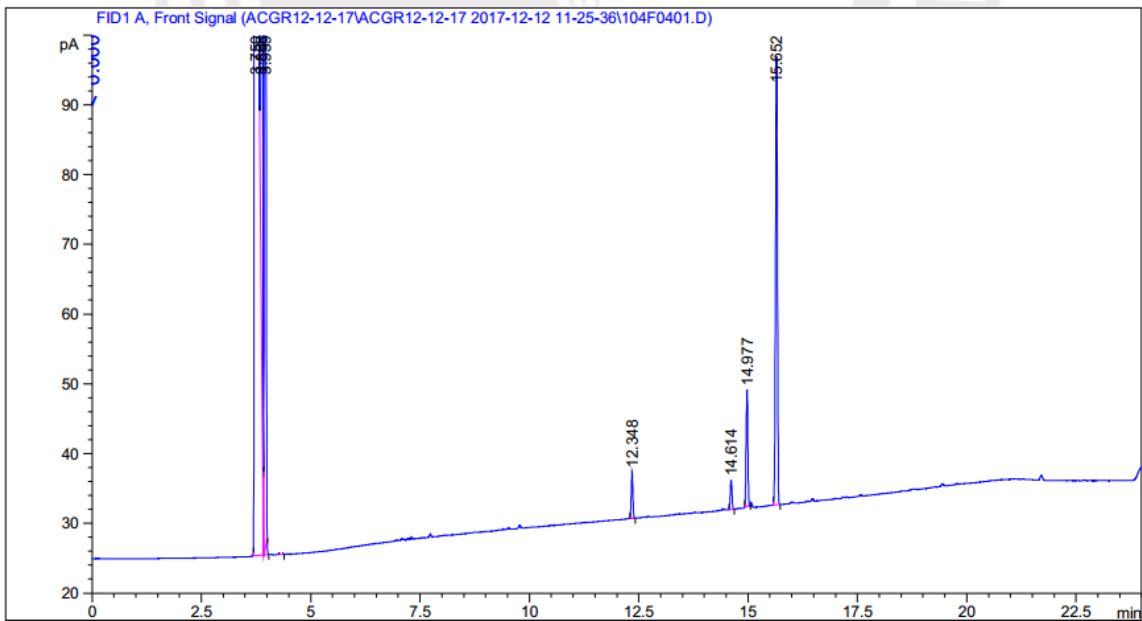


Figura 48. Cromatograma GC-FID del aceite de semillas (Soxhlet).

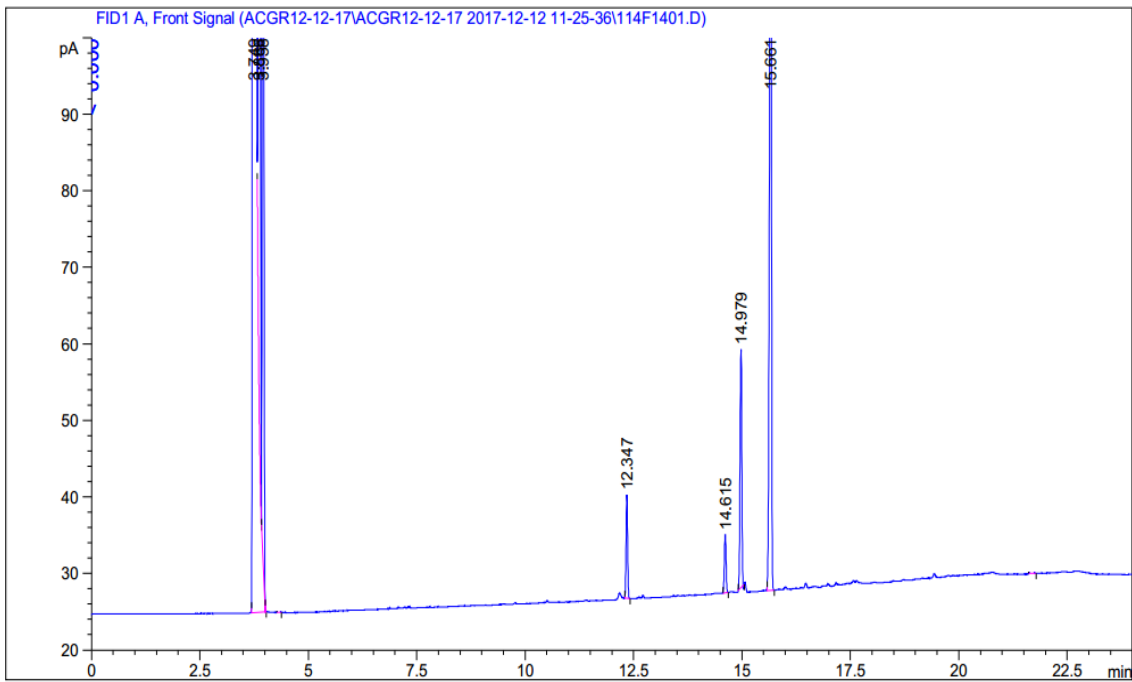


Figura 49. Cromatograma GC-FID del aceite de semillas ( $\text{CO}_2$  supercrítico).

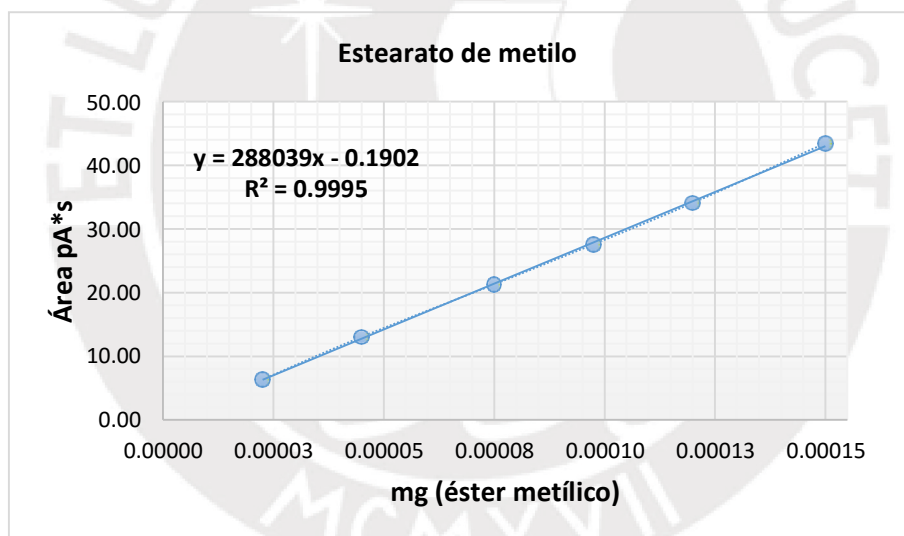


Figura 50. Curva de calibración para el estearato de metilo.

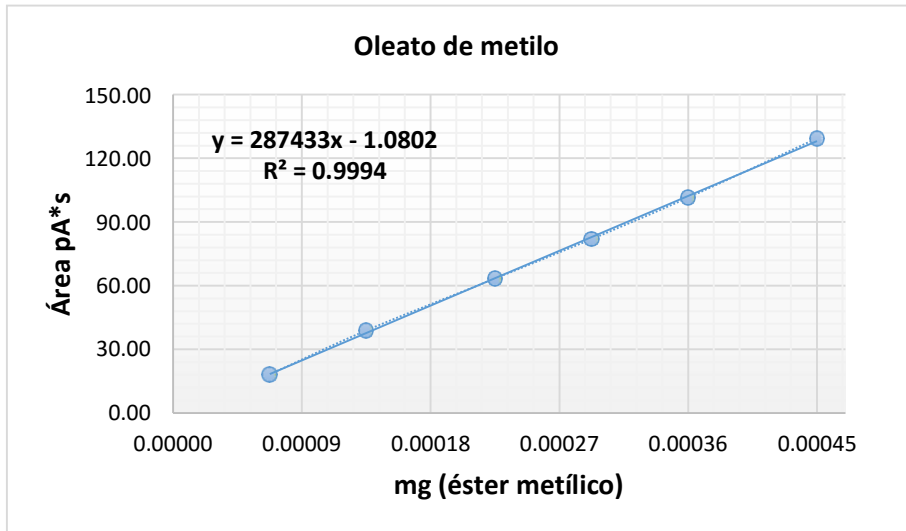


Figura 51. Curva de calibración para el oleato de metilo.

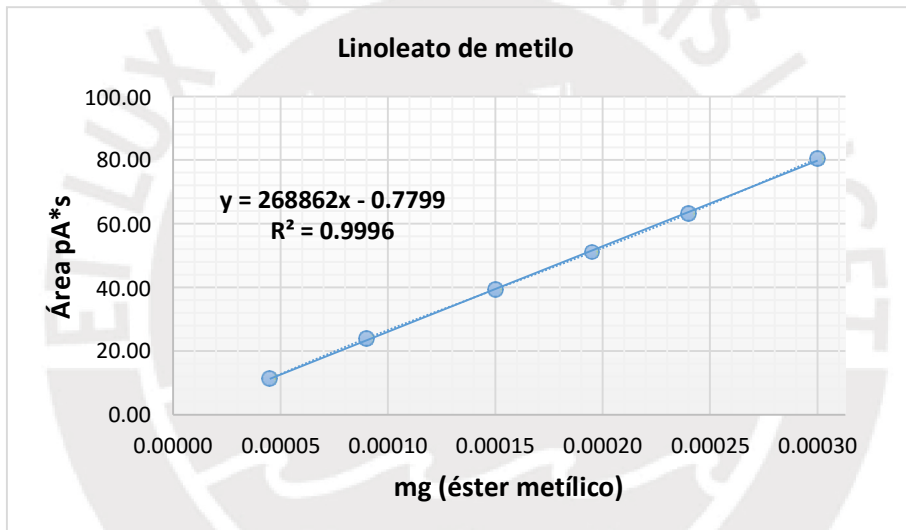


Figura 52. Curva de calibración para el linoleato de metilo.

Tabla 35. Tiempos de retención de los volúmenes de inyección de FAMES.

| N° | Éster          | Tiempo de retención $t_R$ (min) |                   |                   |                   |                   |                   | Promedio | SD    |
|----|----------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------|-------|
|    |                | 2,0 $\mu\text{L}$               | 1,6 $\mu\text{L}$ | 1,3 $\mu\text{L}$ | 1,0 $\mu\text{L}$ | 0,6 $\mu\text{L}$ | 0,3 $\mu\text{L}$ |          |       |
| 1  | Butírico       | 4,857                           | 4,859             | 4,859             | 4,859             | 4,859             | 4,859             | 4,859    | 0,001 |
| 2  | Caproico       | 5,945                           | 5,947             | 5,948             | 5,949             | 5,949             | 5,949             | 5,948    | 0,002 |
| 3  | Caprílico      | 7,014                           | 7,015             | 7,016             | 7,017             | 7,020             | 7,020             | 7,017    | 0,003 |
| 4  | Cáprico        | 8,047                           | 8,047             | 8,047             | 8,048             | 8,050             | 8,050             | 8,048    | 0,001 |
| 5  | Undecanoico    | 8,593                           | 8,593             | 8,594             | 8,594             | 8,596             | 8,596             | 8,594    | 0,001 |
| 6  | Láurico        | 9,189                           | 9,189             | 9,189             | 9,190             | 9,191             | 9,194             | 9,190    | 0,002 |
| 7  | Tridecanoico   | 9,856                           | 9,856             | 9,857             | 9,857             | 9,859             | 9,859             | 9,857    | 0,001 |
| 8  | Mirístico      | 10,616                          | 10,616            | 10,615            | 10,615            | 10,618            | 10,618            | 10,616   | 0,001 |
| 9  | Miristoleico   | 11,001                          | 11,001            | 11,001            | 11,002            | 11,003            | 11,003            | 11,002   | 0,001 |
| 10 | Pentadecanoico | 11,482                          | 11,482            | 11,482            | 11,483            | 11,484            | 11,484            | 11,483   | 0,001 |
| 11 | Palmítico      | 12,465                          | 12,464            | 12,463            | 12,463            | 12,464            | 12,467            | 12,464   | 0,002 |
| 12 | Palmitoleico   | 12,843                          | 12,842            | 12,842            | 12,842            | 12,843            | 12,848            | 12,843   | 0,002 |
| 13 | Margárico      | 13,546                          | 13,546            | 13,546            | 13,547            | 13,548            | 13,548            | 13,547   | 0,001 |
| 14 | Esteárico      | 14,731                          | 14,729            | 14,728            | 14,729            | 14,729            | 14,731            | 14,730   | 0,001 |
| 15 | Elaídico       | 14,949                          | 14,950            | 14,947            | 14,947            | 14,946            | 14,946            | 14,948   | 0,002 |
| 16 | Oleico         | 15,104                          | 15,102            | 15,101            | 15,099            | 15,099            | 15,102            | 15,101   | 0,002 |
| 17 | Linoeláidico   | 15,393                          | 15,394            | 15,393            | 15,393            | 15,394            | 15,394            | 15,394   | 0,001 |
| 18 | Linoleico      | 15,771                          | 15,771            | 15,768            | 15,768            | 15,768            | 15,773            | 15,770   | 0,002 |
| 19 | Araquídico     | 16,613                          | 16,613            | 16,612            | 16,612            | 16,613            | 16,619            | 16,614   | 0,003 |
| 20 | Gadoleico      | 17,283                          | 17,284            | 17,283            | 17,283            | 17,284            | 17,290            | 17,285   | 0,003 |
| 21 | Linolénico     | 17,695                          | 17,695            | 17,695            | 17,694            | 17,696            | 17,696            | 17,695   | 0,001 |
| 22 | Docosanoico    | 19,969                          | 19,970            | 19,968            | 19,968            | 19,970            | 19,976            | 19,970   | 0,003 |
| 23 | Erúcico        | 20,099                          | 20,100            | 20,100            | 20,098            | 20,101            | 20,101            | 20,100   | 0,001 |
| 24 | Tricosanoico   | 20,435                          | 20,434            | 20,435            | 20,434            | 20,436            | 20,436            | 20,435   | 0,001 |
| 25 | Lignocérico    | 21,442                          | 21,441            | 21,442            | 21,443            | 21,443            | 21,454            | 21,444   | 0,005 |
| 26 | EPA            | 23,139                          | 23,138            | 23,136            | 23,138            | 23,137            | 23,137            | 23,138   | 0,001 |
| 27 | Nervónico      | 23,799                          | 23,799            | 23,797            | 23,798            | 23,798            | 23,798            | 23,798   | 0,001 |
| 28 | DHA            | 23,924                          | 23,927            | 23,923            | 23,925            | 23,925            | 23,925            | 23,925   | 0,001 |

Tabla 36. Áreas bajo la curva de los componentes del estándar FAMES.

| N° | Nombre         | t <sub>R</sub> (min) | Área pA*s |         |         |         |          |          |
|----|----------------|----------------------|-----------|---------|---------|---------|----------|----------|
|    |                |                      | 0,3 µL    | 0,6 µL  | 1,0 µL  | 1,3 µL  | 1,6 µL   | 2,0 µL   |
| 1  | Butírico       | 4,859                | 0,0000    | 0,0000  | 0,0000  | 3,1279  | 3,7528   | 4,5161   |
| 2  | Caproico       | 5,948                | 0,0000    | 0,0000  | 3,9343  | 4,9822  | 6,0696   | 7,4975   |
| 3  | Caprílico      | 7,017                | 0,0000    | 3,9916  | 6,3598  | 8,1587  | 9,9445   | 12,4391  |
| 4  | Cáprico        | 8,048                | 0,0000    | 5,4386  | 8,8412  | 11,3062 | 13,8528  | 17,4343  |
| 5  | Undecanoico    | 8,594                | 0,0000    | 5,6931  | 9,1911  | 11,8304 | 14,5157  | 18,2942  |
| 6  | Láurico        | 9,190                | 5,4393    | 11,7581 | 19,1306 | 24,6479 | 30,2887  | 38,3458  |
| 7  | Tridecanoico   | 9,857                | 0,0000    | 6,1077  | 9 9810  | 12,8258 | 15,7732  | 19,9365  |
| 8  | Mirístico      | 10,616               | 0,0000    | 6,2090  | 10,0528 | 13,0336 | 16,0191  | 20,3432  |
| 9  | Miristoleico   | 11,002               | 0,0000    | 3,7329  | 6 0185  | 7,7585  | 9,5441   | 12,0766  |
| 10 | Pentadecanoico | 11,483               | 0,0000    | 3,7433  | 6 1241  | 7,8911  | 9,7903   | 12,4035  |
| 11 | Palmítico      | 12,464               | 11,7725   | 25,6421 | 41,5263 | 53,6707 | 66,3129  | 84,5391  |
| 12 | Palmitoleico   | 12,843               | 5,8106    | 12,3956 | 20,6866 | 26,7335 | 33,0650  | 42,1206  |
| 13 | Margárico      | 13,547               | 0,0000    | 6,3642  | 10,4503 | 13,5228 | 16,7400  | 21,3685  |
| 14 | Esteárico      | 14,730               | 6,3530    | 13,0369 | 21,2811 | 27,5740 | 34,0692  | 43,4444  |
| 15 | Eláidico       | 14,948               | 0,0000    | 6,4718  | 10,5290 | 13,6433 | 16,9165  | 21,5433  |
| 16 | Oleico         | 15,101               | 18,1697   | 38,8572 | 63,3351 | 81,9610 | 101,5236 | 129,4452 |
| 17 | Linoeláidico   | 15,394               | 0,0000    | 6,0993  | 9,9854  | 12,9438 | 16,0120  | 20,3894  |
| 18 | Linoleico      | 15,770               | 11,3315   | 23,9630 | 39,3834 | 51,0644 | 63,2213  | 80,5961  |
| 19 | Araquídico     | 16,614               | 5,2716    | 11,2299 | 18,3508 | 23,7102 | 29,3722  | 37,4192  |
| 20 | Gadoleico      | 17,285               | 3,2625    | 6,6948  | 10,9747 | 14,2167 | 17,6156  | 22,4653  |
| 21 | Linolénico     | 17,695               | 0,0000    | 3,8299  | 6,3146  | 8,1607  | 10,1673  | 12,9091  |
| 22 | Docosanoico    | 19,970               | 3,2090    | 6,6760  | 10,7816 | 13,9762 | 17,3578  | 22,1412  |
| 23 | Erúcico        | 20,100               | 0,0000    | 4,9891  | 8,2821  | 10,7015 | 13,3247  | 17,0063  |
| 24 | Tricosanoico   | 20,435               | 0,0000    | 3,9334  | 6,4244  | 8,2906  | 10,2678  | 13,0698  |
| 25 | Lignocérico    | 21,444               | 7,1206    | 4,2489  | 6,7638  | 8,6332  | 10,6503  | 13,4367  |
| 26 | EPA            | 23,138               | 0,0000    | 6,6521  | 10,9720 | 14,1970 | 17,6817  | 22,5619  |
| 27 | Nervónico      | 23,798               | 0,0000    | 6,6450  | 10,7662 | 14,0550 | 17,4399  | 22,3121  |
| 28 | DHA            | 23,925               | 0,0000    | 4,5958  | 7,6024  | 9,8711  | 12,1708  | 15,5171  |



Tabla 37. Puntuación de Marhuenda por cada individuo analizado.

| Tratamiento                      | Ratas (código) | SIGNOS                 |                           |       |             |                     |                             |   |   |    |
|----------------------------------|----------------|------------------------|---------------------------|-------|-------------|---------------------|-----------------------------|---|---|----|
|                                  |                | Pérdida de pliegues de | Decoloración de la mucosa | Edema | Hemorragias | Número de petequias | Intensidad de la ulceración |   |   |    |
| Grupo 1<br>(Blanco)              | CR-            | -                      | -                         | -     | -           | -                   | -                           | - | - | -  |
|                                  | CR=            | -                      | -                         | -     | -           | -                   | -                           | - | - | -  |
|                                  | CR≡            | -                      | -                         | -     | -           | -                   | -                           | - | - | -  |
|                                  | CV-            | -                      | -                         | -     | -           | -                   | -                           | - | - | -  |
|                                  | CV=            | -                      | -                         | -     | -           | -                   | -                           | - | - | -  |
|                                  | CA-            | -                      | -                         | -     | -           | -                   | -                           | - | - | -  |
|                                  | CA=            | -                      | -                         | -     | -           | -                   | -                           | - | - | -  |
| Grupo 2<br>(Ranitidina)          | CR-            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 0 | 0  |
|                                  | CR=            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 0 | 0  |
|                                  | CR≡            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 0 | 0  |
|                                  | CV-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 0 | 0  |
|                                  | CV=            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 0 | 0  |
|                                  | CA-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 0 | 0  |
|                                  | CA=            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 0 | 0  |
| Grupo 3<br>(Naproxeno)           | CR-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 5 | 8 | 9  |
|                                  | CR=            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 3 | 4 | 0  |
|                                  | CR≡            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 6 | 15 |
|                                  | CV-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 5 | 6 | 9  |
|                                  | CV=            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 3 | 6 | 12 |
|                                  | CA-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 5 | 0 | 9  |
|                                  | CA=            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 3 | 8 | 9  |
| Grupo 4 (Ext.<br>MeOH) 200<br>mg | CR-            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 5 | 6 | 3  |
|                                  | CR=            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 4 | 6 | 0  |
|                                  | CR≡            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 6 | 4 | 6  |
|                                  | CV-            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 4 | 0  |
|                                  | CV=            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 3 | 8 | 3  |
|                                  | CA-            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 6 | 4 | 6  |
|                                  | CA=            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 5 | 6 | 9  |

Tabla 37. Puntuación de Marhuenda por cada individuo analizado (continuación).

| Tratamiento                | Ratas (código) | SIGNOS                 |                           |       |             |                     |                             |   |    |   |
|----------------------------|----------------|------------------------|---------------------------|-------|-------------|---------------------|-----------------------------|---|----|---|
|                            |                | Pérdida de pliegues de | Decoloración de la mucosa | Edema | Hemorragias | Número de petequias | Intensidad de la ulceración |   |    |   |
| Grupo 5 (Ext. MeOH) 400 mg | CR-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 2  | 0 |
|                            | CR=            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 5 | 6  | 0 |
|                            | CR≡            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 3 | 4  | 3 |
|                            | CV-            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 4  | 3 |
|                            | CV=            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 8 | 6  | 6 |
|                            | CA-            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 4  | 0 |
|                            | CA=            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 8 | 6  | 3 |
| Grupo 6 (Ext. MeOH) 600 mg | CR-            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 0  | 0 |
|                            | CR=            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 0  | 0 |
|                            | CR≡            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 5 | 0  | 0 |
|                            | CV-            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 5 | 0  | 0 |
|                            | CV=            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 0  | 0 |
|                            | CA-            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 1 | 0  | 0 |
|                            | CA=            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 1 | 0  | 0 |
| Grupo 7 (Ext. MeOH) 800 mg | CR-            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 1 | 0  | 0 |
|                            | CR=            | 0                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 10 | 0 |
|                            | CR≡            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 6  | 3 |
|                            | CV-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 10 | 0 |
|                            | CV=            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 0  | 3 |
|                            | CA-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 3 | 8  | 0 |
|                            | CA=            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 4  | 0 |
| Grupo 8 (Ext. BuOH) 200 mg | CR-            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 6  | 0 |
|                            | CR=            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 3 | 4  | 0 |
|                            | CR≡            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 5 | 4  | 0 |
|                            | CV-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 0  | 0 |
|                            | CV=            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 3 | 4  | 0 |
|                            | CA-            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 4  | 0 |
|                            | CA=            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 5 | 6  | 0 |

Tabla 37. Puntuación de Marhuenda por cada individuo analizado (continuación).

| Tratamiento                 | Ratas (código) | SIGNOS                 |                           |       |             |                     |                             |   |   |   |
|-----------------------------|----------------|------------------------|---------------------------|-------|-------------|---------------------|-----------------------------|---|---|---|
|                             |                | Pérdida de pliegues de | Decoloración de la mucosa | Edema | Hemorragias | Número de petequias | Intensidad de la ulceración |   |   |   |
| Grupo 9 (Ext. BuOH) 400 mg  | CR-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 4 | 0 |
|                             | CR=            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 3 | 4 | 0 |
|                             | CR≡            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 3 | 4 | 0 |
|                             | CV-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 2 | 0 |
|                             | CV=            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 2 | 0 |
|                             | CA-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 4 | 0 |
|                             | CA=            | 1                      | 1                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 4 | 0 |
| Grupo 10 (Ext. BuOH) 600 mg | CR-            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 6 | 0 |
|                             | CR=            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 4 | 0 |
|                             | CR≡            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 4 | 4 | 0 |
|                             | CV-            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 2 | 0 | 0 |
|                             | CV=            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 3 | 0 | 0 |
|                             | CA-            | 0                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 0 | 6 | 0 |
|                             | CA=            | 1                      | 0                         | 1     | 0           | 0                   | 0                           | 1 | 4 | 0 |