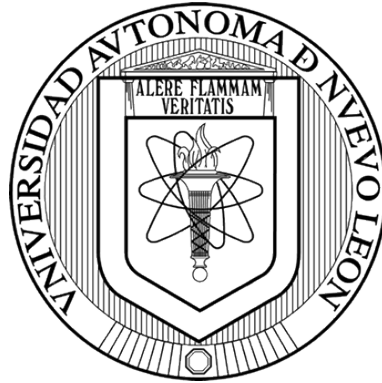


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ACTIVIDAD BIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DEL
EXTRACTO DE ORUJO DE UVA (*Vitis vinifera*. Var. Ruby Cabernet)**

Por

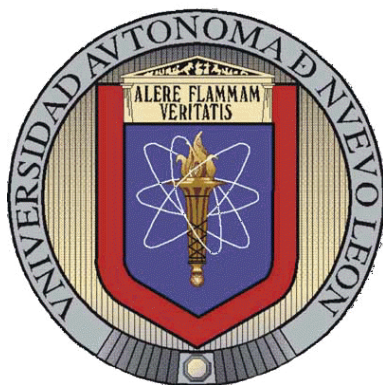
QBP. LEDY ELIZABETH GARCÍA BECERRA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Diciembre, 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD BIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DEL
EXTRACTO DE ORUJO DE UVA (*Vitis vinifera* Var. Ruby Cabernet)

Por

LEDY ELIZABETH GARCÍA BECERRA

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Acentuación en Química de Productos Naturales

Diciembre, 2010

ACTIVIDAD BIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DEL
EXTRACTO DE ORUJO DE UVA (*Vitis vinifera* Var. Ruby Cabernet)

Comité de tesis

Presidente: Dra. Catalina Rivas Morales

Secretario: Dr. Abelardo Chávez Montes

VocalDra. Azucena Oranday Cárdenas

Vocal: Dra. María Julia Verde Star

Vocal: Dra. Adriana Núñez González

ACTIVIDAD BIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DEL
EXTRACTO DE ORUJO DE UVA (*Vitis vinifera* Var. Ruby Cabernet)

Por

Ledy Elizabeth García Becerra

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Catalina Rivas Morales del Departamento de Químicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y de la Dra. Rocío Castro Ríos del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL.

Dra. Catalina Rivas Morales

Director Interno

Dra. Rocío Castro Ríos

Director Externo

Diciembre, 2010

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi mentora, la Dra. Catalina Rivas Morales, quien ha sabido guiarme y aconsejarme, gracias por compartir conmigo parte de su vida y experiencia, porque cada palabra suya, me hizo mejorar como profesional y como persona. Mi eterno y sincero agradecimiento.

Al Dr. Abelardo Chávez Montes por su apoyo y consejos, por ser un gran asesor, por contribuir enormemente a mi formación profesional, muchas gracias.

A la Dra. Rocío Castro Ríos por su asesoría y apoyo, gracias por compartir conmigo fines de semana, días festivos y vacaciones, gracias por guiarme y sacar adelante el proyecto.

A la Dra. Ma. Julia Verde Star, por su positivismo, palabras de aliento y recomendaciones, y porque gracias a usted, descubrí el eterno amor que le guardaré siempre a los productos naturales.

A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas por los consejos y observaciones que contribuyeron a mejorar y enriquecer el trabajo.

A la Dra. Adriana Núñez González, por su apoyo y por estar siempre al pendiente del proyecto.

A la LCA. Catalina Rivas Leos, por compartir estos 5 largos años conmigo, gracias por las observaciones, por los momentos tristes y alegres y gracias por la amistad que logramos consolidar.

Al QFB. Felipe Montor, por instruirme, y compartir conmigo conocimientos, ratos buenos y malos, regaños y alegrías. Gracias por valorarme y creer en mí.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Analítica: Raymundo, Mizael, Esthela, Amri, Nora, Simón, Claudia, Ángeles porque de todos ustedes aprendí algo, gracias por compartir sus tardes conmigo, por la ayuda que me brindaron y las sonrisas que compartimos.

Al Dr. Roberto Mercado por su disposición y apoyo en la parte estadística del trabajo.

A todos y cada uno de mis compañeros de Malabar Productos Naturales, en especial a mis compañeras y ex compañeras de Laboratorio: Juany, Martha, Edna, Nydia, Karla, porque me apoyaron cada vez que algo no salía bien, por impulsarme a ser mejor persona y por su amistad.

A la Dra. María de Jesús Loera Arias, por su apoyo, amistad y facilidades para la realización de este trabajo, gracias Marichú.

A mis amigos entrañables: Taby, Naye, Alfredo, Marcos, Ofelia, Lidia, Marichú, Paola, Orta, Ever, Lalo, Hugo, Fer, gracias por su amistad.

Y muy especialmente a toda mi familia, saben lo importante que son para mí, cada uno de ustedes representa algo muy importante en mi vida, y la única forma de retribuirles su cariño es dedicando y agradeciéndoles en cada uno de mis logros.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (204643) para la realización de mis estudios.

Así mismo al proyecto PAICYT/UANL (CA1495-07) por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

A la empresa Malabar Productos Naturales, al Lic. Hernando Salinas Pérez, por haberme dado una gran oportunidad, por confiar en mí, por los permisos, los consejos y por ser un gran jefe. Este logro es en gran medida por los ánimos que nunca dejaste de brindarme, muchas gracias.

Al Dr. Roberto Montes de Oca del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UNAL, por las líneas celulares tan amablemente donadas.

Al Dr. Alberto Gómez de la Facultad de Química, UANL, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme hacer una parte de este trabajo, muchas gracias por los consejos.

DEDICATORIA

A Dios, por ser Todo.

A mi madre, María Angelina García Becerra, porque sin tu coraje y valentía yo no estuviera aquí, eres la mujer más importante en mi vida... mis triunfos son tuyos mami, te amo.

A mi esposo, Hugo Aldape, por ser el hombre que me motiva a ser, agradezco a Dios por tener la suerte de tenerte junto a mí, por ser mi compañero, te amo.

A mis abuelos, Jacinto García Morales e Isabel Becerra de León (†), dos grandes ejemplos en mi vida, gracias por su apoyo, amor y bendiciones. Mis logros son a su memoria.

A mis hermanos: Grecia, Oscar, Silvano, Anabel y Jesús, por brindarme su cariño.

Finalmente, a mi familia, a mi gran familia, a mis tíos, que han sido siempre como mis hermanos mayores, gracias por su cuidado, cariño y respeto, los adoro.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
Lista de Tablas	I
Lista de Figuras	II
Nomenclaturas	IV
1 RESUMEN	1
1. ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	
3.1 Uso de las plantas en el cuidado de la salud	6
3.2 Importancia del uso de antioxidantes en la dieta humana	7
3.2.1 Enfermedades relacionadas con los radicales libres y la protección de los antioxidantes	11
3.3 Los antioxidantes de la uva	12
3.3.1 Actividad biológica de la uva y/o sus compuestos	14
3.4 Aplicaciones de residuos agroindustriales	16
3.5 Orujo de uva: estudios, aplicaciones y usos	16
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	
6.1 Objetivo general	20
6.2 Objetivos específicos	20
7. MATERIAL Y MÉTODOS	
7.1 Material vegetal	

7.1.1	Generalidades	22
7.1.2	Almacenamiento de muestras	23
7.2	Obtención de los extractos	24
7.2.1	Obtención del extracto metanólico por agitación	24
	(A)	
7.2.2	Obtención del extracto metanólico por sonicación	24
	(B)	
7.2.3	Obtención del extracto metanólico por agitación	25
	y desengrasado (C)	
7.2.4	Obtención del extracto metanol-etanol 1:1 con	25
	agitación (D)	
7.2.5	Obtención del extracto metanólico desengrasado	26
	con hexano por agitación (E)	
7.2.6	Rendimiento de los extractos	26
7.3	Selección del extracto con mayor concentración de	27
	polifenoles totales mediante el ensayo de vainillina HCl	
7.4	Determinación de la actividad antioxidante	28
7.4.1	Captura del radical DPPH	28
7.4.2	Determinación de poder reductor	29
7.4.3	Inhibición de peroxidación lipídica	30
7.5	Actividad antitumoral y citotóxica mediante el ensayo	31
	de CellTiter-Blue®	
7.5.1	Mantenimiento de los cultivos celulares	32

7.5.1.1 Cinéticas de crecimiento de las líneas celulares	32
7.5.2 Ensayo de CellTiter-Blue®	33
7.6 Identificación de las familias de metabolitos secundarios	34
7.7 Ensayo de letalidad sobre <i>Artemia salina</i>	36
7.8 Evaluación del efecto citoprotector mediante el ensayo rojo Neutro (RN)	37
7.9 Métodos generales de análisis	
7.9.1 Determinación de cenizas MGH-FH-0060	39
7.9.2 Agua y materia volátil mediante pérdida por secado MGH-FH-0080	40
7.9.3 Determinación de microorganismos	41
7.10 Identificación de compuestos presentes en el extracto	
7.10.1 Análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas	42
7.11 Análisis estadístico	43
8. RESULTADOS	44
9. DISCUSIÓN	63
10. CONCLUSIONES	75
11. LITERATURA CITADA	77
12. PERSPECTIVAS	92

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Compuestos representativos presentes en extractos derivados de uva	14
II.	Rendimiento de los extractos obtenidos del orujo de uva	44
III.	Selección de un extracto de orujo mediante el ensayo de vainillina-HCl	45
IV.	Efecto antitumoral (HeLa y SiHa) y citotóxico (Vero) del extracto de orujo de uva [E] así como el extracto de semilla de uva mediante el ensayo de CellTiter Blue®.	51
V.	Identificación de las familias de metabolitos secundarios mediante reacciones químicas específicas en el extracto de orujo de uva [E].	55
VI.	Viabilidad celular presentada en el ensayo de citoprotección causada por la exposición de H ₂ O ₂ y el extracto de orujo de uva [E].	56
VII.	Valores PROBIT obtenidos del ensayo de <i>A. salina</i> para determinar la CL ₅₀	57
VIII.	Compuestos identificados en el extracto de orujo de uva [E] mediante GS-MS utilizando la base de datos Wiley7n.1	62

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Daño celular causado a macromoléculas mediante el estrés oxidativo	8
2. Acciones de los radicales libres y los antioxidantes	10
3. Estructura base de las proantocianidinas de la uva	13
4. Cultivo de <i>Vitis vinifera</i> Var. Ruby Cabernet, en la ciudad de Aguascalientes, México.	23
5. Muestra de orujo de uva congelado (A) y seco (B)	24
6. Extracto metanólico desengrasado con hexano y extraído por agitación continua (E) en proceso de evaporación del solvente	45
7. Captura del radical libre DPPH causado por el extracto de orujo (EO) [E] y por la vitamina E (V	46
8. Poder reductor del extracto de orujo (EO) [E] y del ácido ascórbico (AA).	47
9. Inhibición de la formación de peróxidos por el extracto de orujo (A) [E] y por el extracto de semilla de uva (B)	47
10. Cultivos confluentes de las líneas celulares HeLa (A), SiHa (B) y Vero (C)	49
11. Cinéticas de crecimiento para las líneas HeLa (A), SiHa (B) y Vero (C) con el tiempo de generación (G) determinado para cada línea celular.	50
12. Actividad antitumoral del extracto de orujo de uva [E] y del	52

extracto de semilla de uva sobre células HeLa.	
13. Actividad antitumoral del extracto de orujo de uva [E] y del extracto de semilla de uva sobre células SiHa.	53
14. Actividad citotóxica del extracto de orujo de uva [E] y del extracto de semilla de uva sobre células Vero.	54
15. Efecto citoprotector de las mezclas antioxidante-oxidante del extracto de orujo de uva [E] frente al daño ocasionado por agente oxidante (H ₂ O ₂).	57
16. Espectros de masas del extracto de orujo de uva [E] sin silanizar (A) y silanizado (B).	59
17. Espectros de masas del extracto de semilla de uva sin silanizar (A) y silanizado (B).	60

NOMENCLATURAS

C	Grados Celsius
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Abs	Aborbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
g	Gramo
G	Tiempo de generación
GS-MS	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas
h	Hora
kg	Kilogramo
M/L	Mol sobre Litro
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanómetro

1. RESUMEN

En este trabajo se determinó la actividad biológica e identificación de compuestos del extracto metanólico desengrasado con hexano por agitación continua de orujo de uva (*Vitis vinifera* Var. Ruby Cabernet); el extracto presentó actividad antioxidante mediante el ensayo de captura del radical DPPH con una EC_{50} de 24 $\mu\text{g/mL}$, posee poder reductor significativo a 1000 $\mu\text{g/mL}$ y un 70 % de inhibición en la formación de hidroperóxidos en un sistema lipídico a 500 $\mu\text{g/mL}$. Además mostró efecto antitumoral sobre las líneas celulares HeLa y SiHa de cáncer de cérvix con una CI_{50} de 51 y 53 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, mientras que para la línea normal Vero presentó una CI_{50} 48 $\mu\text{g/mL}$.

El extracto de orujo de uva dio positivo para las pruebas de: esteroides y metilesteroides, sesquiterpenlactonas, dobles enlaces, cumarinas, alcaloides, flavonoides y oxhidrilos fenólicos. Se determinó la toxicidad mediante el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina* y dio una CL_{50} de 1195 $\mu\text{g/mL}$ lo cual indica que no es tóxico a esta concentración.

También se determinó el efecto citoprotector sobre una línea normal de fibroblastos humanos con las mezclas de extracto-oxidante (H_2O_2): 100 $\mu\text{g/mL}$ -40 μM , 100 $\mu\text{g/mL}$ -20 μM y 50 $\mu\text{g/mL}$ -20 μM favoreciendo la recuperación de la viabilidad celular en un 32, 28 y 26 % respectivamente, en comparación con el daño ocasionado por el oxidante de manera individual.

El extracto de orujo cumplió parámetros establecidos para asegurar su inocuidad y seguridad por la FHEUM y la FEUM. En el extracto de orujo se identificó: β -sitosterol y ácido cinámico (99 % de certeza), ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico y ácido benzoico (98 % de certeza), además de ácido gálico, un compuesto reportado en extractos de semilla de uva.

En conclusión, los resultados obtenidos proporcionan suficiente información para una posible incorporación del extracto de orujo como ingrediente funcional o en la formulación de fito-fármacos.

1. ABSTRACT

In this study we determined the biological activity and identification of compounds of the methanolic extract defatted with hexane by continuous agitation from grape pomace (*Vitis vinifera* var. Ruby Cabernet), the extract showed antioxidant activity using the capture assay with DPPH radical with a EC_{50} of 24 mg / mL, has significant reducing power to 1000 μ g / mL and 70% inhibition in the formation of lipid hydroperoxides in a lipidic system at 500 μ g / mL. In addition, it showed antitumor effect on the cell lines HeLa and SiHa of cervical cancer with an IC_{50} of 51 and 53 μ g/mL respectively, while for the normal line Vero presented an IC_{50} of 48 μ g/mL.

The grape pomace extract gave positive tests: sterols and methylsterols, sesquiterpene lactone, double bonds, cumarins, alkaloids, flavonoids and phenolic hydroxyls. Toxicity was determined by testing of brine shrimp lethality (*Artemia salina*) and gave an CL_{50} of 1195 μ g / mL indicating that it is not toxic at this concentration.

We analyzed the cytoprotective effect on a normal line of human fibroblasts to mixtures of extract-oxidant (H_2O_2): 100 μ g/mL-40 μ M, 100 μ g/mL-20 μ M and 50 μ g/mL-20 μ M promoting recovery of cell viability by 32, 28 and 26 % respectively, compared with the damage caused by the oxidant individually.

Grape pomace extract comply set parameters to ensure their safety and security for the FEUM and FHEUM. In the pomace extract was identified: β -sitosterol and cinnamic acid (99% certainty), hexadecanoic acid, octadecanoic acid and benzoic acid (98% certainty), in addition to gallic acid, a compound reported in grape seed extracts.

In conclusion, the results provide sufficient information for a possible incorporation of the grape pomace extract as a functional ingredient or into phyto-drugs formulation.

2. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 4 billones de personas, alrededor del 80 % de la población mundial, utiliza plantas medicinales para algún aspecto del cuidado primario de su salud. Los alimentos consumidos contienen una gran variedad de fitoquímicos, y a través de la ciencia moderna se han reconocido algunos de ellos como alimentos funcionales o nutraceuticos, como ejemplo de esto se conoce el té verde y la soya. Hoy en día se redescubre la utilidad de las hierbas medicinales como suplementos alimenticios de origen botánico que son potencialmente importantes en los efectos preventivos y medicinales. Todas las plantas contienen familias de compuestos relacionados, llamados metabolitos secundarios, que interaccionan y dan como resultado efectos biológicos. (Heber, 2007; Sarker *et al.*, 2006)

El avance de la ciencia y la tecnología han permitido conocer más y mejor la relación entre la dieta humana y la salud. En este sentido, en los últimos años se han estudiado ampliamente los compuestos presentes en la uva (Heber, 2007), siendo las estructuras más reportadas: proantocianidinas monoméricas, diméricas y triméricas así como sus derivados acilados (Ugartondo *et al.*, 2007, Thimothe *et al.*, 2004; Cortell *et al.*, 2007; Kammerer *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2002; Llópiz *et al.*, 2004). Así mismo se han evaluado las propiedades biológicas tanto de extractos de uva como de compuestos derivados de ella, encontrándose que poseen actividad antioxidante, citotóxica,

antigenotóxica y antiangiogénica (Monagas *et al.*, 2006; Ugartondo *et al.*, 2007; Veluri *et al.*, 2006; Llópiz *et al.*, 2004; Rubilar *et al.*, 2007; González-Paramás *et al.*, 2004).

Las agroindustrias producen una gran cantidad de subproductos por año, generalmente considerados como residuos pero que pueden llegar a ser fuente de compuestos con actividad biológica. En los últimos años se ha estudiado la posible aplicación de subproductos de la industria agroalimentaria como el orujo de manzana, el cual ha sido utilizado como materia prima para generar enzimas, compuestos aromáticos, etanol, ácidos orgánicos y polisacáridos (Vendruscolo *et al.*, 2009) o como el orujo de oliva, que ha resultado ser un excelente bioabsorbente, removedor de reactivos textiles en agua (Akar *et al.*, 2008), antitrombótico, antiaterosclerótico (Tsantila *et al.*, 2007) y vasorelajador (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2006). Con el objetivo de darle una aplicación a este tipo de residuos se ha trabajado con orujos de arándano, tomate y uva (Khanal *et al.*, 2009, Altan *et al.*, 2009, de Campos *et al.*, 2008). Por otro lado, la industria vitivinícola en general, como parte del proceso de elaboración de vino tinto produce un subproducto sólido llamado “orujo”, el cual está constituido por semilla, hollejo y tallos de uva el cual generalmente se desecha o en algunos casos se utiliza como forraje para ganado.

Dada la relevancia del uso terapéutico de la flora en México y la gran cantidad de residuos generados por la industria vitivinícola así como la constante búsqueda de alternativas naturales que brinden mayor calidad de vida y promuevan la buena salud, se vuelve necesaria la realización de estudios biológicos, químicos, toxicológicos, clínicos y fitotécnicos que permitan una mayor caracterización de los extractos vegetales para la aplicación en el campo de la salud. En base a la escasa información acerca de la

utilización de orujos mexicanos, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antioxidante, tóxica, citotóxica y citoprotectora así como determinar los compuestos presentes en el extracto con mayor concentración de polifenoles totales obtenido del orujo de uva (*Vitis vinifera* Var. Ruby Cabernet) cultivada en el estado de Aguascalientes, México con la finalidad de que este subproducto brinde suficiente información con base científica para respaldar su uso como materia prima bioactiva, efectiva y segura para la producción de alimentos funcionales, cosméticos, nutraceuticos, fármacos y/o fitofármacos.

3. ANTECEDENTES

3.1 Uso de las plantas en el cuidado de la salud

El uso de los productos naturales, especialmente las plantas, para curación y/o tratamiento es tan antiguo y universal como la propia medicina. El uso terapéutico de las plantas se remonta a la civilización Sumeria, se ha registrado que Hipócrates utilizó aproximadamente 400 diferentes especies de plantas con fines medicinales (Sarker *et al.*, 2006). En México, la historia de la medicina herbolaria se remonta más allá de la época precolombina, actualmente representa una alternativa económica en el cuidado de la salud (FHEUM, 2001). Los productos naturales han desempeñado un papel muy importante en el sistema de medicina tradicional de todo el mundo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 75 % de las personas todavía dependen de medicamentos tradicionales a base de plantas para la atención primaria de salud a nivel mundial. La naturaleza ha sido una fuente de agentes terapéuticos desde hace miles de años, y un impresionante número de medicamentos modernos han sido derivados de fuentes naturales, basados en el uso de la medicina tradicional.

En los últimos años, se ha retomado el interés en los productos naturales como una fuente de nuevos medicamentos, tanto por la academia así como las industrias farmacéuticas. Cerca del 40 % de los medicamentos modernos en uso, se han desarrollado a partir de productos naturales. Según Cragg *et al.*, 1997; Cragg and Newman, 2001., 39 % de los medicamentos aprobados entre 1983 y 1994 eran productos

naturales o sus derivados y del 60 -80 % de los antibacterianos y anticancerígenos eran de origen natural. Para el año 2000, el 60 % de todas las drogas probadas en ensayos clínicos de multiplicidad de cáncer eran de origen natural. Los productos naturales seguirán siendo considerados como uno de las principales fuentes de nuevos medicamentos debido a que ofrecen una gran diversidad estructural, son moléculas pequeñas (<2000 Da) además de tener la capacidad de ser absorbidos y metabolizados. (Sarker *et al.*, 2006)

3.2 Importancia del uso de antioxidantes en la dieta humana

Los radicales libres son moléculas dañinas producidas por los procesos fisiológicos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio o bien, son generados por factores ambientales como la contaminación industrial, el tabaco, la radiación, los medicamentos, aditivos químicos en alimentos procesados y los pesticidas. Son átomos o moléculas extremadamente reactivas, debido a que en el orbital más externo de su estructura tienen uno o más electrones sin aparear.

Esta inestabilidad les confiere una avidéz física por la captura de un electrón de cualquier otra molécula de su entorno, ocasionando que la estructura afectada quede inestable. De esta forma pueden establecer reacciones en cadena por medio de varios transportadores que se oxidan y se reducen secuencialmente, cuando un radical libre inicial modifica una biomolécula después de transferir o capturar un electrón. Por lo tanto los radicales libres son moléculas de oxígeno, átomos de hidrógeno y metales de transición (en estado no iónico).

Debido a la alteración de los mecanismos antioxidantes, los radicales libres se generan y acumulan produciendo estrés oxidativo (destrucción molecular producida por

radicales libres derivados de oxígeno), lo cual conduce a la muerte celular, ocasiona la destrucción de las macromoléculas de la célula (ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y proteínas), induciendo una disminución en la resistencia al ambiente y un incremento en la fragilidad celular.

Las estructuras sub-celulares de generación de radicales libres incluyen principalmente, las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas así como la membrana nuclear, la citoplásmica, así como del retículo endoplásmico. Una vez que el radical se genera, tiene una vida media de microsegundos corto lapso de tiempo en el que es capaz de interactuar con las biomoléculas cercanas. (**Figura 1**)

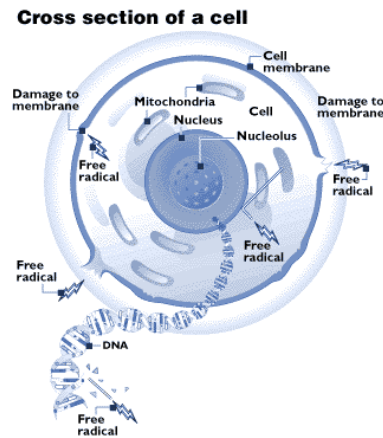


Figura 1. Daño celular causado a macromoléculas mediante el estrés oxidativo.

Existen funciones específicas que cumplen los radicales libres en algunas células del organismo, por ejemplo, juegan un papel fisiológico importante en la homeostásis, como en el caso del óxido nítrico sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa, ya que el óxido nítrico participa en la relajación muscular, el control del tono vascular y varias funciones que dependen de la guanosin monofosfato cíclico (GMPc). El superóxido (O_2^-) formado por la oxidasa ND(P)H controla la producción de eritropoyetina, participa en el

control de la ventilación, en la relajación del músculo liso y en la transducción de señales de varios receptores membranales que activan funciones inmunes y en general mantienen la homeostasis redox. También son generados y utilizados por células como los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, los eosinófilos y los fibroblastos para eliminar organismos extraños como bacterias y virus.

Con el tiempo las funciones celulares se van debilitando y la formación de radicales libres es mayor respecto a la cantidad que necesitan las células para cumplir algunas funciones, causando una acumulación de los mismos, lo cual ocasiona reacciones con moléculas para estabilizar su estructura iniciando con ellos la reacción en cadena que destruye las células. Los lípidos representan el grupo más susceptible debido a la presencia de dobles enlaces en sus ácidos grasos, además de constituir de manera fundamental el organelo celular más expuesto, que es la membrana celular. Para esta sobreproducción de radicales libres las células han desarrollado mecanismos que las protegen del efecto nocivo de los radicales con base a un complejo sistema de defensa constituido por los agentes antioxidantes, dicho sistema es activado para controlar y estabilizar el ambiente redox intracelular y extracelular. (Fernández-Pachón *et al.*, 2006)

Los antioxidantes son sustancias que, presentes en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula) retardan o previenen la oxidación. Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en una molécula inocua o un radical libre débil no tóxico. (**Figura 2**)

Las moléculas clave del envejecimiento

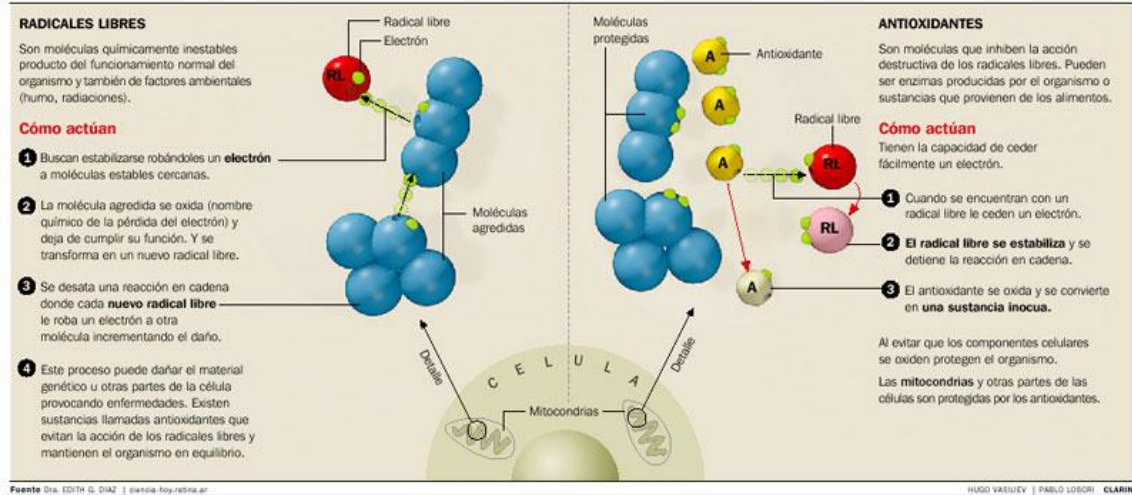


Figura 2. Acciones de los radicales libres y los antioxidantes.

Existen dos tipos de antioxidantes de manera general:

- **Endógenos:** Son los propios del sistema biológico, tales como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, melatonina, ferritina, bilirrubina y estrógenos.
- **Exógenos:** Son los ingeridos por la dieta, tales como la vitamina E, vitamina C y β -caroteno o los polifenoles del té verde o la uva.

De la misma manera, existen varios tipos de antioxidantes en cuanto a su modo de acción:

- **Primarios:** previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas.
- **Secundarios:** Capturan los radicales libres evitando la reacción en cadena.
- **Terciarios:** Reparán las biomoléculas dañadas por los radicales libres

3.2.1 Enfermedades relacionadas con los radicales libres y la protección de los antioxidantes

La elevación del daño oxidativo celular se manifiesta en enfermedades crónicas con el daño producido por radicales libres, los cuales afectan a todos los aparatos y sistemas del organismo, como algunos tipos de cáncer, la inflamación y padecimientos inmunitarios que involucran al riñón, el hígado, el páncreas y el sistema nervioso; alteraciones en los vasos sanguíneos y el corazón además de padecimientos oftalmológicos, como las cataratas, el sangrado ocular y el daño degenerativo macular.

Las especies de radicales derivados de oxígeno son carcinógenas potenciales, ya que facilitan la mutagénesis, la promoción tumoral y su progresión. (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004; Gutiérrez-Maydata, 2002)

El proceso de lipoperoxidación se asocia con la etiología de diversos padecimientos como lo son el engrosamiento y rigidez de los vasos sanguíneos (aterosclerosis), que reduce el adecuado suministro de sangre, la inflamación de las articulaciones (artritis reumatoide), la inflamación y el exceso de mucosidad en los pulmones (enfisema pulmonar), el crecimiento celular maligno incontrolable (cáncer) y el proceso de envejecimiento celular. Diversos polifenoles han demostrado su eficacia al inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidasas (Hirano *et al.*, 2001; Terao *et al.*, 2001), con lo cual los padecimientos antes mencionados se ven notablemente favorecidos en su disminución.

Se ha demostrado que la quercetina, un polifenol encontrado en varias plantas, mejora la función contráctil del ventrículo izquierdo y reduce la incidencia de trastornos de la conducción cardíaca, mejora la circulación coronaria y previene la formación de

trombos intravasculares, posee efectos vasodilatadores en aorta aislada de ratas con una notable disminución de lesiones de reperfusión del miocardio (Merck, S. A, 2000; Benito *et al.*, 2002).

Otra propiedad de los polifenoles está relacionada con la inflamación, se ha determinado que evitan el daño producido al endotelio vascular al prevenir la sobrerregulación de mediadores inflamatorios (IL-8, MCP-1, ICAM-1) a través de la citocina proinflamatoria TNF- α (Youdim *et al.*, 2002; Wang and Mazza, 2002).

La interacción de los radicales libres con el ADN causa cambios conformacionales, alteración de bases y ruptura de una o de la doble cadena y pérdida de nucleótidos, eludiendo el sistema de reparación al presentar una mutación antes de la replicación, esto conduce a la producción de genes mutados y por ende, de proteínas disfuncionales, lo cual deriva en enfermedades como el cáncer (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004; Valenzuela, 2004).

Una propiedad farmacológica importante de los polifenoles es que pueden ser absorbidos por las membranas celulares y protegerlas de la acción de los radicales libres, tienen la ventaja de ser hidrosolubles y liposolubles, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y pueden proteger a las células cerebrales y aumentan la efectividad de las células naturales “killer” del sistema inmunológico (Sen *et al.*, 2002; Bagchi *et al.*, 2002).

3.3 Los antioxidantes de la uva

Desde hace algunos años, la situación de enfermedades cardiovasculares en Francia llamó la atención mundial, a partir del proyecto denominado MONICA, organizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que se basó en un monitoreo a nivel

mundial de enfermedades coronarias, indicaron que Francia a pesar de poseer una dieta alta en la ingesta de grasas saturadas, presentó uno de los menores índices de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, y que dicha paradoja se podía deber al alto consumo de vino tinto, se iniciaron una gran cantidad de estudios que finalmente concluyeron que en realidad el efecto benéfico que obtenían del vino tinto eran sus compuestos, de ésta manera se determinó la presencia de polifenoles en el vino, los cuales provenían de la uva, (Renaud and Lorgeril, 1992) iniciando así una variedad de estudios con los polifenoles de la uva. La propiedad preponderante en los compuestos presentes en la uva, ya sea extractos de partes de ésta, vino tinto o el fruto completo, es mayoritariamente antioxidante. Los compuestos polifenólicos de la uva poseen en su estructura química una gran variedad de grupos –OH (**Figura 3**), lo cual se relaciona con su capacidad antioxidante (Cárdenas, 2001; Kelm *et al.*, 2005; Gabetta *et al.*, 2000; Guendez *et al.*, 2005; Revilla and Ryan, 2000; Caillet *et al.*, 2006; Gerogiannaki-Christopoulou *et al.*, 2006).

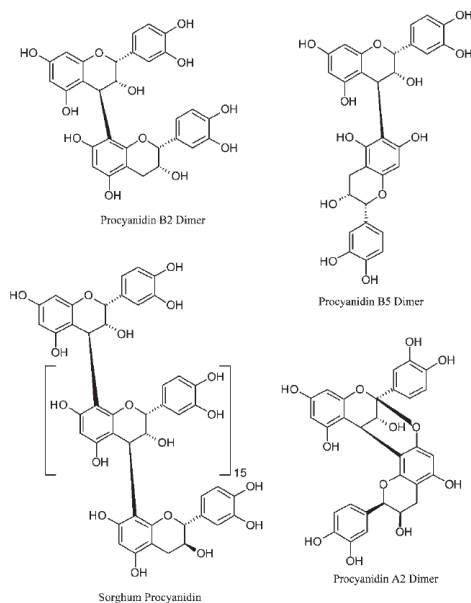


Figura 3. Estructura base de las proantocianidinas de la uva.

En la **Tabla I**, se presenta un breve resumen de los compuestos más representativos en la uva identificados en extractos de diferentes variedades.

Tabla I. Compuestos representativos presentes en extractos derivados de uva.

Tipo de extracto	Variedad de uva	Compuesto (s) identificado (s)	Referencia
Semilla de uva	Merlot Chardonnay Muscadine	Para las tres variedades: Ácido gálico, catequina, epicatequina.	Yilmaz and Toledo, 2004
Vino y Semillas	Tempranillo Graciano Cabernet Suavignon	Para las tres variedades: catequina, epicatequina, epicatequina-3 gallato, dímeros de procianidinas B3, B1, T2, B4, B2, B2-3 gallato, y flavan-3-ol.	Monagas <i>et al.</i> , 2003
Semillas	Carménère	Catequina, epicatequina, epicatequina-3-O-gallato y epigallocatequina.	Fernández <i>et al.</i> , 2007
Piel de uva y vino tinto	Castelão	Estilbenos (resveratrol)	Sun <i>et al.</i> , 2006
Extracto de semilla de uva	N/A	Proantocianidinas: B1, B2, B3, B4, proantocianidina trimérica C1, epicatequina, catequina.	Köhler <i>et al.</i> , 2008
Piel de uva	N/A	Resveratrol	Pascual-Martí <i>et al.</i> , 2001
Piel de uva	Muscadina	Antocianinas (Delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y maldivina)	Huang <i>et al.</i> , 2009
Piel y semilla de uva	N/A	Proantocianidina B1, B2, catequina, epicatequina, Delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y maldivina	Muñoz <i>et al.</i> , 2008
Fruto completo	Diamond muscat Selma Pete Summer muscat	Ácido caftárico, catequina, rutina, quercetina, para las 3 variedades, y solamente en la variedad Diamond muscat kaempferol	Breksa <i>et al.</i> , 2010
Piel y semillas	Chardonnay Suavignon	Ácido gálico, metil gallato, catequina, epicatequina, epicatequina gallato, procianidina B1 y B2, Quercetina, rutina, kaempferol.	Hollecker <i>et al.</i> , 2009

3.3.1 Actividad biológica de la uva y/o sus compuestos

Se han realizado múltiples estudios acerca de la actividad biológica de extractos de uva (partes) y/o sus compuestos, de entre ellas destaca la actividad antioxidante, ésta es la más estudiada mediante una gran variedad de métodos, por ejemplo, Breksa *et al.*, 2010, determinaron la actividad antioxidante de semillas de uva de la variedad Summer muscat mediante el método Folin-Ciocalteu y ABTS, encontrando muy buenos

resultados. Kallithraka *et al.*, 2005, determinó mediante el método de DPPH que la variedad Limnio y Mandilaria, poseían actividad antirradical estadísticamente similar a la vitamina E, mediante el mismo método de DPPH Iacopini *et al.*, 2008, determinó la variedad Canaiolo con la mejor actividad antioxidante. Las variedades de uva existentes en el mundo poseen una diversidad de compuestos y varía también su actividad, Bozan *et al.*, 2008, evaluaron la actividad antioxidante mediante el método de DPPH y ORAC de varios tipos de uva, determinando mediante DPPH que la variedad Papaz Karasi fue la mejor y mediante el método de ORAC fue la bogazkere.

Se han realizado estudios acerca del efecto citotóxico sobre líneas celulares de origen tumoral, Veluri *et al.*, 2006, determinaron la eficiencia de un extracto de semilla de uva sobre células de cáncer de próstata (PCA, por sus siglas en inglés), también han evaluado el resveratrol sobre el crecimiento celular y la metástasis encontrando que reduce el volumen y peso del tumor, así como la prevención de la metástasis a pulmón en un estudio *in vivo* (Kimura and Okuda, 2001). También se han evaluado fracciones de proantocianinas de uva sobre células MCF-7 de cáncer de mama, encontrando que disminuyen la viabilidad y proliferación celular *in vitro* (Faria *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que un extracto de semilla de uva rico en proantocianinas previene los daños en células Fao expuestas a H₂O₂ (Llópiz *et al.*, 2004), además de potenciar la expresión de las enzimas antioxidantes (Puiggròs *et al.*, 2005) en un estudio similar utilizaron un extracto de semilla de uva para evaluar el daño cromosomal en la línea celular WIL-NS (linfoblastos), mediante el ensayo de micronúcleos concluyendo que el extracto no es genotóxico y previene el daño causado por radicales libres (Sugisawa *et al.*, 2004), en un trabajo realizado por Ugartondo *et al.*, 2007, determinaron que la actividad antioxidante mediante el método de AAPH y citotóxica sobre keratinocitos, de

una fracción de proantocianinas de uva está relacionada. Además se ha determinado que las proantocianinas de las semillas de uva son neuroprotectores ya que son capaces de sobre-regular la defensa antioxidante atenuando la lipoperoxidación y la oxidación de proteínas *in vivo* (Devi *et al.*, 2006).

3.4 Aplicaciones de residuos agroindustriales

Las agroindustrias producen una gran cantidad de subproductos por año, generalmente considerados como residuos pero que pueden llegar a ser un recurso para convertirse en fuente de compuestos para la industria farmacéutica. En los últimos años, se ha estudiado la posible aplicación de los subproductos de la industria agroalimentaria como el orujo de manzana, el cual ha sido utilizado como materia prima para generar enzimas, compuestos aromáticos, etanol, ácidos orgánicos y polisacáridos (Vendruscolo *et al.*, 2009) o como el orujo de oliva, que ha resultado ser un excelente bioabsorbente, removedor de reactivos textiles en agua (Akar *et al.*, 2008), antitrombótico, antiaterosclerótico (Tsantila *et al.*, 2007) y vasorelajador (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2006). Con el objetivo de darle una aplicación a este tipo de residuos agroindustriales se ha trabajado con orujos de arándano, tomate y uva. (Khanal *et al.*, 2009; Altan *et al.*, 2009; de Campos *et al.*, 2008)

3.5 Orujo de uva: Estudios, aplicaciones y usos

El aprovechamiento de los residuos de las agroindustrias ha llamado la atención, y entre ellos el residuo producido por la industria vitivinícola, el orujo, es considerado una fuente de compuestos polifenólicos con actividad biológica. De esta manera se han

evaluado la actividad biológica así como la determinación de los compuestos presentes en algunos orujos obtenidos de varias regiones.

Rubilar *et al.*, 2007, evaluaron la composición y la actividad antioxidante de extractos etanólicos de *Vitis vinifera* de la variedad Garnatxa y Cabernet Sauvignon (Casa Torres, España) mediante DPPH y TBARS determinando gran poder antioxidante para ambas variedades y diferentes compuestos: para el extracto crudo etanólico de la variedad Garnatxa encontraron epicatequina, quercetina, vitexina y kaempferol, mientras que para la variedad Cabernet Suavignon se encontraron miricetina, ramnetina además de Quercetina y kaempferol.

Chidambara *et al.*, 2002, realizaron un estudio acerca de la actividad antioxidante de un orujo de uva de la variedad Bangalore Blue cultivada en India demostrando mediante la peroxidación lipídica, el ensayo de captura del radical hidroxilo y sobre la oxidación de lipoproteínas que posee buena actividad para ser aplicado en alimentos así como suplementos alimenticios. En un estudio similar, Torres *et al.*, 2002, determinaron los compuestos presentes en fracciones de *Vitis vinifera* de la variedad Parella (Casa Torres, España), determinando catequinas monoméricas y triméricas, así como su actividad antioxidante obteniendo resultados favorables, además de determinar que el extracto muestra poca toxicidad sobre *A. salina* y que no presenta actividad sobre células humanas de melanoma. En un estudio realizado por González-Paramás *et al.*, 2004, determinaron la presencia de catequina, epicatequina, epigallocatequina y proantocianidinas B1, B2, B3 y B4 en un extracto metanólico de *Vitis vinifera* de la variedad Merlot y Tempranillo (España), determinando además su capacidad antioxidante por el método de TBARS.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La importancia de este trabajo radica en el hecho de que la uva es un recurso natural rico en polifenoles, compuestos con actividad biológica, y que la industria vitivinícola mexicana produce un residuo de la elaboración de vino tinto llamado orujo, este residuo está formado por ollejos, semillas y tallos de la uva, y el cual no tiene ningún uso, por lo que resulta de gran interés utilizar el orujo de uva, para la obtención de un extracto con actividad biológica e identificar sus compuestos, para ser utilizado como ingrediente funcional o para la elaboración de fito-fármacos.

5. HIPÓTESIS

El extracto metanólico crudo obtenido a partir de orujo de uva (*Vitis vinifera* Var. Ruby Cabernet) del estado de Aguascalientes, México, posee actividad biológica y puede ser utilizado como ingrediente funcional o para la elaboración de fito-fármacos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar la actividad biológica e identificar los compuestos químicos del extracto de orujo de uva (*Vitis vinifera var. Ruby Cabernet*)

6.2 Objetivos específicos

1. Obtener los extractos del orujo de uva con solventes de diferente polaridad
2. Seleccionar el extracto con mayor concentración de polifenoles totales mediante el ensayo de Vainillina-HCl.
3. Determinar la actividad antioxidante del extracto de orujo mediante diferentes técnicas:
 - DPPH
 - Poder reductor
 - Inhibición de peroxidación lipídica
4. Evaluar la actividad antitumoral y citotóxica del extracto de orujo sobre la línea celular HeLa (ATCC: CCL-2) de adenocarcinoma de cérvix y SiHa (ATCC: HTB-35) de carcinoma de células escamosas de cérvix y la línea celular normal Vero (ATCC: CCL-81)
5. Identificar las familias de metabolitos secundarios presentes en el extracto de orujo mediante reacciones químicas.

6. Evaluar la toxicidad del extracto de orujo mediante el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*
7. Evaluar el efecto citoprotector del extracto de orujo de uva sobre la línea normal humana de fibroblastos (ATCC: CRL-2522) mediante la técnica de incorporación de rojo neutro.
8. Evaluar los parámetros establecidos para asegurar la inocuidad y seguridad en los Métodos generales de análisis de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) y Normas Oficiales Mexicanas (NOM's)
 - MGH-FH-0060 Determinación de cenizas
 - MGH-FH-0080 Agua y materia volátil
 - MGH-FH-0170 Determinación de microorganismos
9. Identificar los compuestos del extracto de orujo mediante Análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GS-MS).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material vegetal

7.1.1 Generalidades

Ubicación de los viñedos La Bordalesa:

Se localizan 8 Km al norte de la ciudad de Aguascalientes a 1830 m sobre el nivel del mar.

Clima:

Predomina el clima semiseco. La temperatura media anual es de 17 a 18°C. La temperatura más alta (30°C o más), se presenta en los meses de mayo y junio y la más baja, es alrededor de -4°C, en el mes de enero. Las lluvias son escasas y se presentan durante el verano. La precipitación total anual es de 526 mm, por lo que la práctica agrícola requiere de riego.

Suelo:

Delgado, pobre, arcilloso, calcáreo y de pH alcalino.

Cantidad de orujo producido:

250 a 350 toneladas por temporada

En la **Figura 4** se aprecia el cultivo de parras de *V. vinifera* Var. Ruby Cabernet en la región de Aguascalientes, México.



Figura 4. Cultivo de *Vitis vinifera* Var. Ruby Cabernet, en la ciudad de Aguascalientes, México.

7.1.2 Almacenamiento de muestras

El orujo fue donado por la industria vitivinícola La Bordalesa (Aguascalientes, Mex), fue congelado a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su transporte y almacenamiento previo a su utilización. Al material vegetal se le realizó el siguiente procedimiento: Se descongeló aproximadamente 1 kg de orujo y fue colocado en una charola cubierta por aluminio para posteriormente introducirlo a un horno a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Riossa, México) durante 2 d para su secado, posteriormente fue triturado en un molino Oskar (Wiley, México). El material vegetal seco y triturado fue almacenado en frascos de vidrio protegidos de la luz y con tapa hermética a temperatura ambiente hasta su utilización. El extracto estandarizado de semilla de uva al 95 % en polifenoles, fue donado por Malabar Productos Naturales (Guadalupe, Nuevo León, Mex). El polvo fue almacenado en frascos de vidrio protegido de la luz y con tapón de rosca a temperatura ambiente hasta su utilización.

En la **Figura 5** se observa las fotografías tomadas al orujo de uva congelado (**Figura 5A**) y el orujo de uva seco y listo para ser usado en los procesos de extracción (**Figura 5B**).

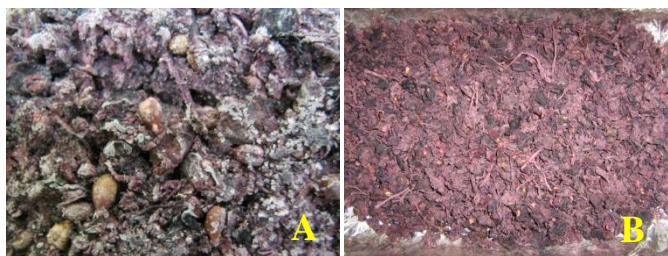


Figura 5. Muestra de orujo de uva congelado (A) y seco (B)

7.2 Obtención de extractos

A partir del material vegetal seco y triturado se realizaron bajo diferentes métodos la obtención de extractos del orujo de uva, dichas extracciones se diseñaron a partir de las referencias existentes, estudios realizados por diferentes autores que han trabajado con extractos de uva (Yilmaz y Toledo, 2004; Monagas *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2003; González-Paramás *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2002; Köhler *et al.*, 2008; Aquino *et al.*, 2001)

7.2.1 Obtención del extracto metanólico por agitación (A)

Se pesaron 20 g de material vegetal seco y triturado, se colocaron en un matraz con 50 mL de Metanol (MeOH, CTR Scientific) tapándolo con tapón de caucho recubierto con aluminio y sellado con cinta adhesiva, se sometió a una extracción por agitación continua en un agitador (Dual Action Shaker Lab-Line) durante 1 día a temperatura ambiente, posteriormente se filtró utilizando papel filtro Whatman No 1 (Whatman International LTD, England) y se evaporó el solvente en campana de extracción.

7.2.2 Obtención del extracto metanólico por sonicación (B)

Se pesaron 20 g de material vegetal seco y triturado, se colocaron en un matraz con 50 mL de MeOH (CTR Scientific) y se sometió a sonicación, se realizaron 5 ciclos de 5

min cada uno con un intervalo de 1 min, posteriormente se dejó en reposo durante 24 h, posteriormente se filtró utilizando papel filtro Whatman No 1 (Whatman International LTD, England) y se evaporó el solvente en un horno (Riossa, México) a 40°C hasta su evaporación total.

7.2.3 Obtención del extracto metanólico por agitación y desengrasado (C)

Se pesaron 20 g de material vegetal seco y triturado, se colocaron en un matraz con 50 mL de MeOH (CTR Scientific) tapándolo con tapón de caucho recubierto con aluminio y sellado con cinta adhesiva, se sometió a una extracción por agitación continua en un agitador (Dual Action Shaker Lab-Line) durante 1 día a temperatura ambiente, posteriormente se filtró utilizando papel filtro Whatman No 1 (Whatman International LTD, England), el filtrado se colocó en un vaso de precipitado de 100 mL y se colocó en refrigeración a 4 °C durante 24 h como paso de desengrasado, posteriormente se decantó la fase insoluble y la soluble se procedió a evaporar el solvente en campana de extracción.

7.2.4 Obtención del extracto metanol-etanol 1:1 con agitación (D)

Se pesaron 20 g de material vegetal seco y triturado, se colocaron en un matraz con 50 mL de una mezcla de metanol-etanol 1:1 (MeOH, EtOH, CTR Scientific) tapándolo con tapón de caucho recubierto con aluminio y sellado con cinta maskin tape, se sometió a una extracción por agitación continua en un agitador (Dual Action Shaker Lab-Line) durante 1 d, posteriormente se filtró utilizando papel filtro Whatman No 1 (Whatman International LTD, England) se evaporó el solvente en un horno (Riossa, México) a 40 °C hasta su evaporación total.

7.2.5 Obtención del extracto metanólico desengrasado con hexano por agitación (E)

Se pesaron 20 g de material vegetal seco y triturado, se colocaron en un matraz con 50 mL de hexano (CTR Scientific), tapándolo con tapón de caucho recubierto con aluminio y sellado con cinta, se sometió a extracción por agitación continua en un agitador (Dual Action Shaker Lab-Line) a temperatura ambiente durante 3 días. Posteriormente, se separó el solvente mediante filtración utilizando papel filtro Whatman No 1 (Whatman International LTD, England), el material vegetal se dejó secar sobre el papel filtro durante 1 d a temperatura ambiente en campana de extracción (ProVent Fisher Hamilton, EUA). Una vez evaporado el solvente, el material vegetal fue sometido a extracción con 150 mL de MeOH (CTR Scientific) con agitación constante y a temperatura ambiente. Finalmente, se filtró y se evaporó el solvente en campana de extracción hasta sequedad

7.2.6 Rendimiento de los extractos

El rendimiento de extracción se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{PE}{PI} \times 100$$

Donde:

PE = Peso obtenido después de la extracción

PI = Peso inicial del material vegetal a extraer

7.3 Selección del extracto con mayor concentración de polifenoles totales mediante el ensayo de Vainillina HCl

Los constituyentes activos de la uva son los polifenoles, específicamente las proantocianidinas (**Figura 3**) los cuales representan una gran variedad de polímeros de flavan-3-ol como lo son las catequina y las epicatequinas. El ensayo colorimétrico de Vainillina-HCl es utilizado para la determinación de proantocianidinas. Este ensayo tiene el siguiente fundamento: La vainillina es protonada en una solución ácida dando como resultado un carbocatión electrofílico débil que reacciona con el anillo flavonoide en la posición 6 u 8, el compuesto formado es deshidratado para dar como resultado un compuesto con color.

La metodología utilizada fue la descrita por Nakamura *et al.*, 2003: se prepararon soluciones de catequina (Sigma Aldrich, USA), extracto estandarizado de semilla de uva (Tecnoespecialidades S.A de C.V) y extracto de orujo de 5, 10, 50 y 100 µg/mL. Se colocaron en volúmenes de 1 mL las soluciones de catequina, semilla de uva y extracto de orujo a las diferentes concentraciones a probar en un tubo en ensayo al cual se le agregaron 2.5 mL de metanol [control] (CTR Scientific) o 2.5 mL de vainillina al 1 % en metanol [muestra] (CTR Scientific) y 2.5 mL de una solución de HCl/Metanol (CTR Scientific) 9 M/L. Los tubos con la mezcla de reacción fueron incubados por 20 min a 30 °C y se realizó la medición de absorbancia a 500 nm y se obtuvo la absorbancia final que representa la absorbancia del estándar catequina empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia final (A)} = \frac{A_m - A_b}{A_c - A_o}$$

Donde:

A_o = Absorbancia a 500 nm del control de 0 mg de catequina [1 mL de metanol + 2.5 mL de metanol + 2.5 mL de HCl 9 mol/L]

A_b = Muestra de 0 mg de catequina [1 mL de metanol + 2.5 mL de vainillina 1 % + 2.5 mL de HCl 9 mol/L]

A_c = Control [1 mL de las diferentes soluciones de catequina o soluciones de extracto de orujo + 2.5 mL de metanol + 2.5 mL de HCl 9 mol/L]

A_m = Muestra [[1 mL de las diferentes soluciones de catequina o soluciones de extracto de orujo + 2.5 mL de vainillina 1 % + 2.5 mL de HCl 9 mol/L]

Los resultados se reportaron como porcentaje de polifenoles totales en dónde la absorbancia de la solución de catequina a 100 µg/mL se tomó de referencia como el 100 %.

7.4. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó mediante tres pruebas las cuales miden diferentes parámetros: la capacidad de capturar el radical libre DPPH, la donación de electrones y la inhibición de la formación de hidroperóxidos a partir de ácido linoleico.

7.4.1 Captura del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

La capacidad de captura del radical DPPH (Sigma Chemical Co, USA) fue determinada de acuerdo al método descrito por Brand-Williams *et al.*, 1995, con pequeñas modificaciones: se prepararon soluciones de diferentes concentraciones del

extracto metanólico crudo de orujo de uva [EO] (25-150 µg/mL) y Vitamina E (Sigma Chemical Co, USA) [VE] (5-25 µg/mL) y se llevaron a un volumen final de 100 µL usando MeOH (CTR Scientific). Se colocaron 2 mL de una solución metanólica de DPPH (20 µg/mL) en cada tubo, los cuales fueron incubados a temperatura ambiente durante 20 min en oscuridad. Se preparó un sistema control sin extracto y un blanco con MeOH (CTR Scientific) y se corrió a las mismas condiciones que el extracto de orujo de uva para hacer la corrección de la línea base. Pasado el tiempo de incubación, los cambios en la absorbancia de las muestras se midieron a 517 nm en espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, USA). La disminución en la absorbancia de la mezcla de reacción, indica capacidad atrapante de radicales libre.

La inhibición del radical DPPH causada por el extracto de orujo y la vitamina E fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Captura del radical DPPH (\%)} = \left[\frac{(ABS_{t=0 \text{ min}} - ABS_{t=20 \text{ min}})}{ABS_{t=0 \text{ min}}} \right] \times 100$$

Donde:

$ABS_{t=0 \text{ min}}$ = Absorbancia tiempo 0 min

$ABS_{t=20 \text{ min}}$ = Absorbancia después de 20 min de incubación

Los resultados se expresaron como la concentración efectiva media (EC_{50}) definida como la concentración a la cual una muestra causa un decremento del 50 % de la concentración inicial de DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995).

7.4.2 Determinación de poder reductor

El poder reductor del extracto metanólico crudo de orujo se determinó de acuerdo al método descrito (Zou *et al.*, 2004; Oyaizu *et al.*, 1986), reduciendo Fe^{3+} a Fe^{2+} con

pequeñas modificaciones: las soluciones evaluadas tanto del extracto de orujo y el ácido ascórbico [Grado alimenticio, Tecnoespecialidades Comerciales S.A de C.V, México] (20-1000 µg/mL) fueron preparadas en tubos cónicos ajustando un volumen final de 1 mL con MeOH (CTR Scientific), se adicionaron 2.5 mL de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 6.6) y 2.5 mL de una solución al 1 % de ferricianuro de potasio (Sigma Chemical Co, USA.). Esta mezcla fue incubada en baño de agua a 50 °C durante 30 min, posteriormente se adicionaron 2.5 mL de una solución al 10 % de ácido tricloroacético (Sigma Chemical Co, USA.). La mezcla se dejó reaccionar por 10 min a temperatura ambiente. Del tubo de reacción se tomaron 2.5 mL y se colocaron en un tubo de vidrio, al cual se le adicionaron 2.5 mL de agua destilada (Laboratorios Monterrey S.A de C.V, México) y 0.5 mL de una solución al 0.1 % de cloruro férrico (Sigma Chemical Co, USA.); esta mezcla se mantuvo durante 10 min a temperatura ambiente, y se medirá el poder reductor del extracto a 700 nm en el espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, USA). El incremento en la absorbancia de la mezcla de reacción indica capacidad reductora de la sustancia ensayada.

7.4.3 Inhibición de peroxidación lipídica

La evaluación de la protección a la peroxidación de lípidos se llevó a cabo mediante la técnica de inhibición de oxidación de ácido linoleico descrita (Zou *et al.*, 2004; Mitsuda *et al.*, 1966). Se preparó una emulsión con 0.28 g de ácido linoleico (Sigma Chemical Co, USA), 0.28 g de Tween 20 (Sigma Chemical Co, USA) como emulsificador y 50 mL de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 7.0), esta mezcla se homogenizó en oscuridad total. Para las mezclas de reacción se utilizaron frascos con rosca cubiertos de la luz, se colocaron 0.5 mL de las soluciones etanólicas (CTR Scientific) del extracto

de orujo o del extracto estandarizado de semilla de uva [Tecnoespecialidades S.A de C.V](50, 100 y 500 µg/mL), 2.5 mL de la emulsión de ácido linoleico y 2 mL de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 7.0), posteriormente se incubó a 37 °C en oscuridad para acelerar el proceso de peroxidación. Los niveles de peroxidación se determinaron de acuerdo al método de tiocianato: se colocaron 5 mL de etanol (CTR Scientific) al 75 % en un tubo de vidrio, 100 µL de tiocianato de amonio al 30 % (Sigma Chemical Co, USA), 100 µL de la mezcla de reacción incubada y 100 µL de una solución de cloruro ferroso (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 20 mM en 3.5 % de HCl. Se dejó incubar por 5 min en baño maría a 45°C, se realizó la lectura de absorbancia a 500 nm por espectrofotometría (Thermo Spectronic Genesys 20, USA). Como control se empleó la emulsión sin antioxidante. El porcentaje de inhibición de la peroxidación de ácido linoleico se determinó a las 84 h con la siguiente fórmula (Oyaizu, 1986):

$$\text{Inhibición de Peroxidación (\%)} = 100 - \left[\frac{ABS_{trt\ 84h}}{ABS_{ctr\ 84h}} \right] \times 100$$

Donde:

$ABS_{trt\ t=84}$ = Absorbancia de la muestra a las 84 h

$ABS_{ctr\ t=84}$ = Absorbancia del control a las 84 h

El incremento en la absorbancia indica la presencia de peróxido formado durante la incubación de la emulsión.

7.5 Actividad antitumoral y citotóxica mediante el ensayo de CellTiter-Blue®

El cultivo de las líneas celulares adherentes HeLa de adenocarcinoma de cérvix (ATCC: CCL-2) y SiHa de carcinoma de células escamosas de cérvix (ATCC: HTB-35), se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Cellgro,

Herdon, VA), la línea Vero de riñón de mono verde (ATCC: CCL-81) se mantuvo en medio M-199 (GIBCO, invitrogen, USA) fueron suplementados con 10 y 4 % de Suero Bovino Fetal (Fetal bovine SERUM Qualified GIBCO) estéril descomplementado y una mezcla de antibióticos (10,000 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) y 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) respectivamente.

7.5.1 Mantenimiento de los cultivos celulares

Las líneas celulares adherentes se mantuvieron en botellas de cultivo (Corning, USA). Se utilizaron cultivos confluentes de cada línea celular, realizando exclusión con azul de tripano (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) antes de cada ensayo o resiembra para comprobar la viabilidad de la línea celular.

7.5.1.1 Cinéticas de Crecimiento de las líneas celulares

Se realizaron cinéticas de crecimiento para determinar la fase logarítmica de las líneas celulares, donde las células muestran su mayor actividad, durante 6 días colocando como densidad celular inicial 2,000 células/mL con el medio de cultivo respectivo según la línea celular. A partir de cultivos confluentes de las líneas celulares HeLa, SiHa y Vero, se retiró el medio de cultivo y se hicieron dos lavados con buffer de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés Phosphate buffer solution), se despegaron las células con tripsina al 0.25 % (Trypsin 1X, Cellgro Mediatech Inc, Herdon VA) y se cosecharon en tubos cónicos de 15 mL. Los tubos se centrifugaron a 1000 rpm/10 min, el sedimento celular se re-suspendió en 2 mL de medio con suero según la línea celular; se contó el número de células en un hemocitómetro y se preparó una suspensión de 2,000 cel/mL las cuales fueron colocadas en cajas Petri (Corning, New Jersey, USA) se

incubaron las cajas Petri a 37°C con 5 % de CO₂ y atmósfera húmeda. Se realizaron 3 ensayos independientes con 2 repeticiones cada uno, cada 24 h durante 6 d, se despegaron las células con tripsina a dos cajas Petri de cada línea celular y se contó el número de células, utilizando un hemocitómetro. Para cada línea celular se obtuvo su Tiempo de generación (G) que es el tiempo requerido para que una célula se divida o una población se duplique y fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tiempo de generación (G)} = \frac{t}{3.3 \log Nb/Na}$$

Donde:

G = Tiempo de generación

t = Tiempo determinado

3.3 = Constante

Nb = Número de células a un tiempo determinado

Na = Número de células iniciales

7.5.2 Ensayo de CellTiter-Blue[®]

Para evaluar la actividad antitumoral y citotóxica se utilizó el ensayo de CellTiter-Blue[®]. Se colocaron 3,000 cel/pozo en un volumen de 100 µl en microplacas de 96 pozos, posteriormente se incubaron por 24 h a 37°C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂, al pasar dicha incubación se colocaron las soluciones a probar del extracto de orujo y del extracto estandarizado de semilla de uva (50, 100, 200, 250, y 500 µg/mL) en muestras de 100 µL y se incubó una vez más bajo las condiciones antes mencionadas durante 24 h. Posteriormente se eliminaron 50 µL de los pozos control y se sustituyeron por 50 µL de Tritón X-100 (Merck, Darmstadt Alemania), se volvió a incubar durante 30 min, al

término de la incubación se colocaron 10 µL del reactivo CellTiter-Blue[®] (Promega, Madison WI,USA) a cada uno de los pozos, incubando una vez más bajo las mismas condiciones durante 30 min. Finalmente se realizó la lectura de la absorbancia en un lector de microplacas a 550 nm con un filtro diferencial de 630 nm (BIO-TEK, USA). Como control positivo, se utilizó Tritón X-100 (Merck, Darmstadt Alemania), el cual es un surfactante no-iónico usado comúnmente para permeabilizar las membranas de células eucariotas provocando lisis celular. Los resultados son expresados como porcentaje de viabilidad determinando la CI₅₀ (Concentración de muestra que causa el 50 % de inhibición del crecimiento o muerte de la densidad celular).

7.6 Identificación de las familias de metabolitos secundarios

El extracto crudo metanólico de orujo de uva fue sometido a diversas pruebas químicas para identificar la presencia de familias de metabolitos secundarios mediante pruebas coloridas que identifican los grupos funcionales de cada familia. (Domínguez, 1973)

- Prueba de Salkowski: para esteroides y metilesteroides. Se adicionó a la muestra (1-2 mg en 1 mL de cloroformo) 1 mL de ácido sulfúrico, desarrollando colores amarillo o rojo.
- Prueba de Shinoda: para compuestos de tipo flavonoide. 1.0 mg de la muestra se disolvió en etanol y se añadieron unas limaduras de magnesio, se calentó a 60 °C y después se añadieron unas gotas de HCl por las paredes. Se consideró positiva con la aparición de colores naranja-rojo, rosa, azul o violeta.

- Prueba de ácido sulfúrico: para sesquiterpenlactonas. Se utilizaron 2 soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse, la solución A), un gramo de ácido pícrico en 100 mL de etanol; solución B), 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. La prueba se consideró positiva cuando se desarrolló una coloración naranja o roja oscura.
- Prueba de Dragendorff: modificación de Munier y Machelobuf, para alcaloides.

Solución A: se disolvieron 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua.

Solución B: se disolvieron 8.0 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua.

El reactivo se preparó mezclando 5 mL de solución A), 4 mL de solución B) y 100 mL de agua. La prueba se consideró positiva para alcaloides al dar la placa coloración roja o naranja, persistente por 24 h.

- Prueba de Permanganato de potasio: para dobles enlaces. Se preparó una solución de permanganato de potasio al 2 % en agua, se disolvieron 0.2 mg de muestra en agua, acetona o metanol después se tomó un capilar y se le agregó la solución de permanganato de potasio. La prueba se consideró positiva al producirse decoloración del reactivo.
- Prueba de cloruro férrico: para oxhidrilos fenólicos. Se disolvió una pequeña cantidad de muestra en etanol y se añadió una gota de solución de cloruro férrico en agua (2.5 %), la aparición de una coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde se consideró positiva.

- Prueba de 2,4-Dinitrofenilhidracina: para grupos carbonilo. En un tubo de ensayo se disolvieron 50 mg de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1 mL de etanol caliente. Se agregaron 50 mg de la muestra y se calentó a baño de agua por 10 a 15 min; se dejó en reposo y luego se enfrió a baño de hielo, la aparición de un precipitado indicó la presencia de un grupo carbonilo.
- Prueba de Molish: para azúcares. En un tubo de ensayo se colocó la muestra, se le añadieron 3 gotas de reactivo de Molish y se agitó. Después se inclinó el tubo y se depositaron por la pared 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La prueba se consideró positiva cuando hubo formación de un anillo coloreado en la interfase. El reactivo se preparó disolviendo 1 g de α -naftol en 100 mL de etanol al 95 %

7.7 Ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*

El ensayo de letalidad sobre *A. salina* se realizó según lo descrito (Meyer *et al.*, 1982), con algunas modificaciones: en un eclosionador de vidrio de 25 x 15 cm con tapa y dividido en dos secciones por la mitad, con una sección oscura, se colocaron 0.1 g de huevecillos de *A. salina* en 300 mL de agua de mar simulada (40 g de sal de mar [Coralife Scientific Grand Marine Salt] aforando a 1 L de agua destilada) con aireación continua (bomba de acuario ELITE 799) y con luz blanca irradiada de una lámpara de 11 W a 20 cm del eclosionador, finalmente se cerró con la tapa y se incubaron por 48 h. Una vez eclosionados, se colocaron 10 nauplios de *A. salina* en el 2º estadio en una microplaca de 96 pozos en un volumen de 100 μ L de agua de mar, posteriormente se colocaron las concentraciones a probar en un volumen de 100 μ L. Las soluciones del extracto de orujo a diferentes concentraciones así como las de dicromato de potasio, utilizado como control positivo, fueron preparadas en agua de mar. Los nauplios de *A.*

salina estuvieron expuestos a las soluciones de extracto durante de 24 h bajo las mismas condiciones. Después de este tiempo se procedió a evaluar los resultados: primeramente se contabilizaron los nauplios muertos con ayuda de un estereoscopio (IROSCOPE WB2, EUA), posteriormente se colocaron 50 µl de etanol (CTR Scientific) para sacrificar el resto de los nauplios y realizar un recuento total, obteniendo por diferencia el número de nauplios vivos en cada pozo. Los resultados fueron expresados como CL₅₀ (Concentración letal que causa la muerte del 50 % de los miembros de una población). El criterio de toxicidad fue el asignado por Déciga-Campos *et al.*, 2007: El compuesto y/o extracto será no tóxico si la CL₅₀ sea una concentración mayor de 1000 µg/mL, moderadamente tóxico cuando la CL₅₀ sea una concentración menor o igual a 500 µg/mL y tóxico cuando la CL₅₀ sea una concentración menor de 500 µg/mL.

7.8 Evaluación del efecto citoprotector mediante el ensayo Rojo Neutro (RN)

El ensayo de RN se llevó a cabo según el método descrito por (Borenfreund and Puerner, 1985; Santa María *et al.*, 2001; Bayoumi *et al.*, 2002) con ligeras modificaciones, el fundamento de la técnica se basa en la conversión del colorante resazurin para medir la capacidad metabólica de la célula, es decir las células viables poseen la habilidad de reducir la resazurin (azul) a resorufin (tonalidades rosa-morado) mediante enzimas mitocondriales, citosólicas y microsomales, por lo que las células no viables no reducen el colorante. La técnica se realizó de la siguiente manera: el cultivo de la línea celular normal adherente de fibroblastos humanos (ATCC: CRL-2522) se mantuvo en medio MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Cellgro, Herndon, VA) suplementado con 10 % de Suero Bovino Fetal inactivado se utilizaron cultivos confluentes del 80 % de la línea celular, se colocaron 5,000 cel/pozo (contadas en un

hemocitómetro) en una microplaca de 96 pozos, se dejaron incubar 24 h a 37°C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂, pasado el tiempo de incubación se colocaron por triplicado las diferentes soluciones: extracto de orujo (100, 50 y 25 µg/mL), peróxido de hidrógeno [H₂O₂ Laboratorios Jaloma, Guadalajara, Mex] (como agente oxidante 20, 10 y 5 µM), mezclas de extracto de orujo-H₂O₂, Tritón X-100 al 0.2 % en PBS (control positivo) y únicamente células con medio de cultivo como control negativo en volúmenes de 100 µL, se dejaron incubar durante 24 h bajo las mismas condiciones, posteriormente se retiró el medio conteniendo las muestras y se sustituyó con 100 µL de una solución de RN (Sigma Chemical Co, USA) en medio MEM (0.5 %), se dejó incubar durante 1 h, luego se retiró la solución de RN y se hicieron 2 lavados con PBS, posteriormente se colocó la solución desteñidora (Ácido acético glacial [CTR Scientific], 1 %, agua destilada 49 % y alcohol etílico [Sigma Chemical Co, USA.] 50 %), se incubó la microplaca por 15 min y finalmente se realizó la lectura de absorbancia en un lector de microplacas a 490 nm. Los resultados son expresados como porcentaje de citoprotección. Un aumento en el porcentaje de citoprotección de las mezclas de extracto de orujo-oxidante respecto a los porcentajes de las muestras individuales, indica citoprotección.

$$Citoprotección (\%) = \left[\frac{(ABS_{ctr} - ABS_{trat})}{ABS_{ctr}} \right] \times 100$$

Donde:

ABS_{ctr} = Absorbancia de células no tratadas

ABS_{trat} = Absorbancia de células tratadas con muestras individuales y/o mezclas de extracto-oxidante

7.9 Métodos generales de análisis de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) y Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)

7.9.1 Determinación de cenizas MGH-FH-0060

La determinación de cenizas totales se siguió como se describe en FHEUM y FEUM. Cenizas totales se define como: La cantidad total de materia que queda después de la ignición. Incluye tanto a las “cenizas fisiológicas”, que proceden del tejido mismo de las plantas, como las “cenizas no fisiológicas” que son el residuo de la materia extraña adherida a la superficie de la planta. El procedimiento realizado fue el siguiente: se colocó alrededor de 1 g de extracto en un crisol previamente tarado y de peso conocido, se registró el dato como P_c , y se tomó el peso exacto del extracto en gramos como P_i , posteriormente se incineró la muestra en una mufla (Thermoline 1300, Iowa, EUA), aumentando gradualmente la temperatura de 500 a 600 °C hasta que esté blanco, lo cual indica ausencia de carbón. Posteriormente se dejó enfriar en un desecador y se tomó el peso. Si la muestra no es totalmente incinerada se le da el siguiente tratamiento: se enfría el crisol y se moja el residuo con 2 mL de agua o de una solución saturada de nitrato de amonio, se seca en baño de agua, finalmente en una plancha de calentamiento y se lleva a peso constante en la mufla. Finalmente se deja enfriar las cenizas en un desecador durante 30 min y se pesa, el peso se registra como P_f .

El porcentaje de cenizas totales del extracto se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas totales (\%)} = \left[\frac{(P_f - P_c)}{P_i} \right] \times 100$$

Donde:

P_i = peso de la muestra en gramos

P_c = peso del crisol en gramos

P_f = peso final de la muestra más el crisol

7.9.2 Agua y materia volátil mediante pérdida por secado MGH-FH-0080

Se determinó la materia volátil mediante el método gravimétrico de pérdida por secado como se describe en FHEUM y FEUM. Éste método determina tanto agua como materia volátil, un exceso de agua en materiales vegetales o extractos fomentará el crecimiento microbiano, la presencia de hongos y el deterioro seguido de hidrólisis, por lo que ésta técnica determina la materia volátil eliminada del extracto al someterla a condiciones de temperatura específicas. La metodología fue la siguiente: se colocó un pesafiltros en un horno de convección (Isotemp Oven 506 G, FISHER SCIENTIFIC, USA) a 100°C durante 1 h, con unas pinzas para crisol se retiró el pesafiltros del horno y se introdujo en un desecador durante 30 min, posteriormente se colocó el pesafiltros en una balanza analítica registrando el peso como P_v y con este se hace la tara en la balanza analítica a 0 g. Se coloca 1 g de extracto dentro del pesafiltros y se registra el peso exacto en g como P_i . Se lleva el pesafiltros conteniendo el extracto al horno de convección a 100 °C durante 1 h, después del tiempo indicado se transfiere el pesafiltros al desecador por 30 min. Finalmente se pesa, registrando el dato como P_{fv} .

La pérdida por secado se obtuvo de la diferencia de pesos con la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida por secado } (P_s) = P_i - P_f$$

Donde:

Pi = peso inicial de la muestra en gramos

Pf = Peso final de la muestra en gramos, obtenido de $Pfv - Pv$

Ps = Peso perdido durante el secado

Para calcular la pérdida por secado en porcentaje (%) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida por secado (\% Ps)} = \left[\frac{(Ps)}{Pi} \right] \times 100$$

Donde:

% Ps = Porcentaje de pérdida por secado

Ps = Peso perdido durante el secado en gramos

Pi = Peso inicial de la muestra en gramos

7.9.3 Determinación de microorganismos

El material procedente de las plantas tiene normalmente un gran número de bacterias y moho, con frecuencia provenientes del suelo, por lo que es necesario que se cumpla con métodos que aseguren la inocuidad de un extracto o planta.

La determinación de microorganismo se realizó según lo descrito en la FHEUM (MGA-FH 0170 Determinación de microorganismos) así como en las Normas Oficiales Mexicanas vigentes (NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa; NOM—111-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos; NOM—113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa) correspondiente para cada tipo de microorganismo: Bacterias anaerobias, coliformes totales, hongos y levaduras.

El procedimiento se realizó para cada microorganismo de la siguiente manera, modificando lo indicado según correspondía a cada microorganismo:

Se preparó el medio de cultivo correspondiente para cada microorganismo: Agar para métodos estándar, agar dextrosa y papa y agar de bilis y rojo violeta para bacterias anaerobias, hongos y levaduras así como coliformes totales respectivamente, según las instrucciones del fabricante (BDBIOXON, Becton Dickinson, Mex), se realizaron las diluciones decimales 1:10 para que 1 mL de extracto presentara entre 30 UFC/mL y 300 UFC/mL, se inocularon por duplicado 1 mL de cada dilución en cajas Petri estériles desechables, posteriormente se añadieron de 15 a 20 mL de medio de cultivo a cada caja, se agitaron con movimientos en forma de ocho, se incluyó una caja sin extracto por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad. Se dejó en reposo para que el medio solidificara, posteriormente se incubaron las placas en posición invertida en una incubadora (BOEKER SCIENTIFIC, 132000M, USA) a 37 °C durante 48 a 72 h para bacterias anaerobias y coliformes totales y de 20 °C a 25 °C (temperatura ambiente) para hongos y levaduras durante 5 a 7 días. Después de la incubación, según correspondía a cada microorganismo, las placas con cuentas de 30 a 300 colonias serán identificadas y se realizará el conteo indicado haciendo un promedio en caso de que dos o más diluciones estén en el intervalo apropiado.

7.10 Identificación de los compuestos presentes en el extracto

7.10.1 Análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GS-MS, por sus siglas en inglés Gas chromatography-mass spectrometry)

El estudio se realizó utilizando un equipo GC AGILENT 6890A, MSD AGILENT 5973N. El horno se determinó a una temperatura inicial de 80°C con una temperatura

final de 320° C, siendo utilizado a 270°C en proporción 20:1, y utilizando una columna capilar HP-5MS de 0.25 mm x 30 m x 0.25 µm con un flujo inicial de 1.0 mL/min. En el caso del aparato para determinación de espectrometría de masas (MSD) se operó en modo de escaneo cuyos parámetros se determinaron como 20 para los de masa baja y de 550 como los de masa alta.

Los resultados de éste análisis fueron sometidos a revisión en la base de datos Wiley7n.1, para determinar compuestos por su peso molecular.

7.11 Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media ± desviación estándar (DE) de tres ensayos independientes con 3 replicados. Las comparaciones estadísticas fueron hechas mediante la prueba de *t-Student*, para los ensayos de DPPH, poder reductor e inhibición de la peroxidación, mientras que para el ensayo de letalidad sobre *A. salina*, la CL₅₀ se obtuvo de un análisis PROBIT. Para la citotoxicidad, los resultados se analizaron como porcentajes de viabilidad comparadas con los pozos control (la media de la densidad óptica de las células no tratadas se consideraron el 100 % de viabilidad) en términos de su CI₅₀ calculada de una curva dosis-respuesta por regresión lineal. El ensayo de efecto citoprotector se analizó mediante análisis de varianza seguido de un análisis post hoc de Fisher's. Todos los análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico SPSS (17.0), considerando las diferencias estadísticamente significativas a una $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

De los diferentes métodos de extracción empleados en esta investigación, se obtuvieron cinco extractos denominados con las letras A a la E, en la **Tabla II** se presentan los rendimientos obtenidos para cada extracto, siendo el extracto D el de mayor rendimiento y el extracto B el de menor rendimiento.

Tabla II. Rendimiento de los extractos obtenidos del orujo de uva

Extracto	Rendimiento (%)
A- Metanólico por agitación	2.16
B- Metanólico por sonicación	1.06
C- Metanólico por agitación y desengrasado	3.50
D- Metanol-Etanol 1:1 con agitación	8.11
E- Metanólico desengrasado con hexano por agitación	2.23

Una vez obtenidos los rendimientos de los extractos se procedió a evaluar el contenido de polifenoles de cada uno mediante el ensayo de vainillina-HCl, para seleccionar el extracto que presentara el porcentaje similar o mayor al presentado por la catequina a una concentración de 100 µg/mL, los porcentajes obtenidos se muestran en la **Tabla III**, como podemos observar el extracto E presentó 35 % comparado con el 40

% que presentó la catequina, por lo que dicho extracto fue el seleccionado para evaluar su actividad biológica. En la **Figura 6** se muestra el extracto E en proceso de evaporación del solvente, como se puede apreciar el extracto presenta un color morado indicativo de la presencia de compuestos como antocianinas que se encargan de dar el color rojo-morado a las uvas y otras frutas.

Tabla III. Selección de un extracto de orujo mediante el ensayo de vainillina-HCl

Muestra (100 µg/mL)	Parámetro (%)
Catequina	100
Extracto de semilla de uva	40
Extracto A	7
Extracto B	3
Extracto C	13
Extracto D	17
Extracto E	35



Figura 6. Extracto metanólico desengrasado con hexano y extraído por agitación continua (E) en proceso de evaporación del solvente

En cuanto a la actividad antioxidante, mediante el método de DPPH se obtuvo una EC_{50} para el extracto de orujo de 24 µg/mL y no presenta diferencia significativa con la

vitamina E ($p < 0.05$) cuya EC_{50} fue una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$. En la **Figura 7** se muestra el porcentaje de captura del radical DPPH causado por el extracto de orujo y la vitamina E.

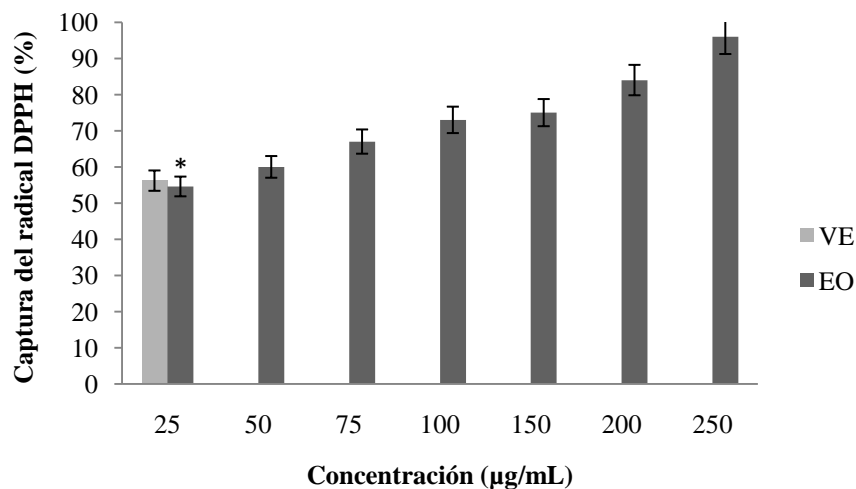


Figura 7. Captura del radical libre DPPH causado por el extracto de orujo (EO) [E] y por la vitamina E (VE).

El extracto de orujo posee poder reductor, como se puede observar en la **Figura 8**, el extracto de orujo no presenta diferencia significativa a 1000 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo para las concentraciones menores, presenta un comportamiento mucho menor al presentado por el ácido ascórbico, utilizado como control positivo.

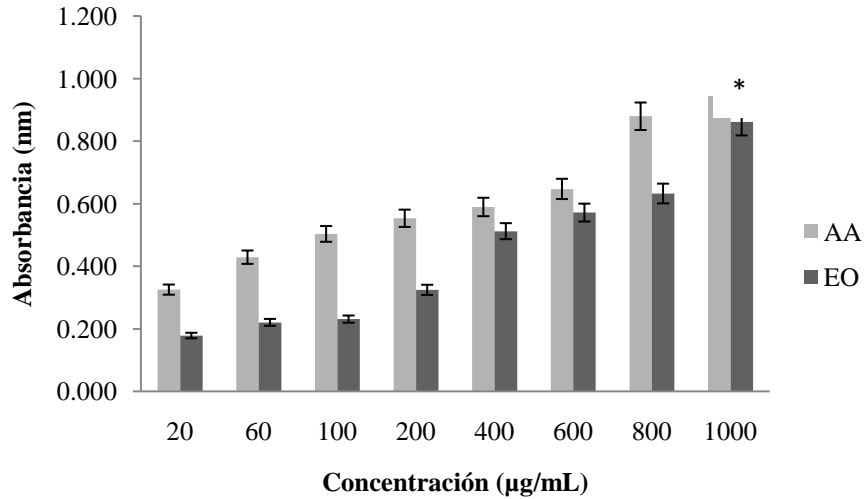
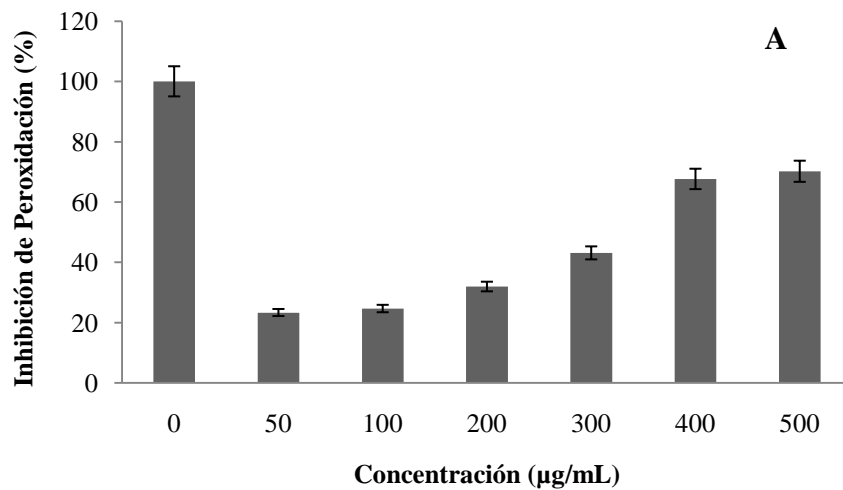


Figura 8. Poder reductor del extracto de orujo (EO) [E] y del ácido ascórbico (AA).

Del ensayo de inhibición de peroxidación lipídica se obtuvieron los siguientes resultados: el extracto de orujo de uva es capaz de inhibir la formación de hidroperóxidos a partir del ácido linoleico hasta en un 70 % a 500 µg/mL (**Figura 9A**), mientras que para el extracto de semilla de uva estandarizado (95 % de polifenoles), las concentraciones necesarias para la inhibición fueron menores, ya que a 50 µg/mL inhibe en un 60 % aproximadamente (**Figura 9B**).



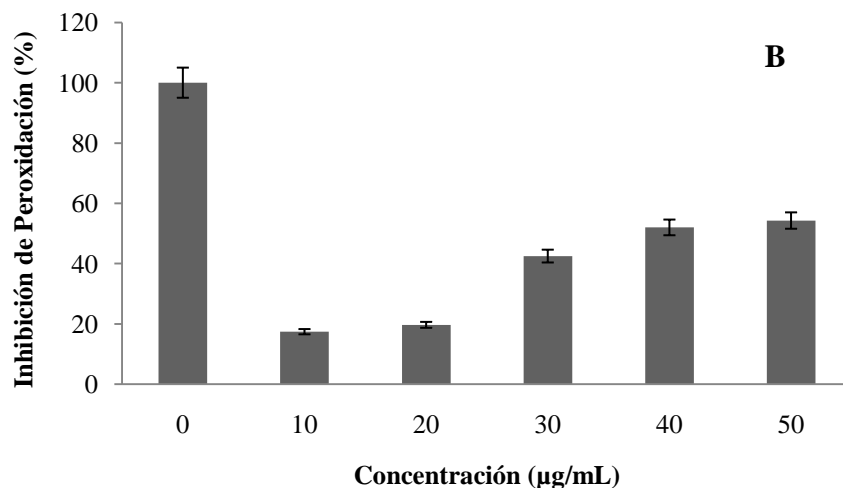


Figura 9. Inhibición de la formación de peróxidos por el extracto de orujo (A) [E] y por el extracto de semilla de uva (B)

Para las pruebas de actividad antitumoral *in vitro*, se mantuvieron cultivos confluentes de las líneas celulares adherentes HeLa, SiHa y Vero (**Figura 10**) a partir de las cuales se procedió a realizar las cinéticas de crecimiento (**Figura 11**) correspondientes a cada línea celular para obtener su tiempo de generación (G) y determinar el número de células colocadas para cada ensayo, como se puede observar en la **Figura 11**, las líneas tumorales HeLa y SiHa son las de mayor crecimiento.

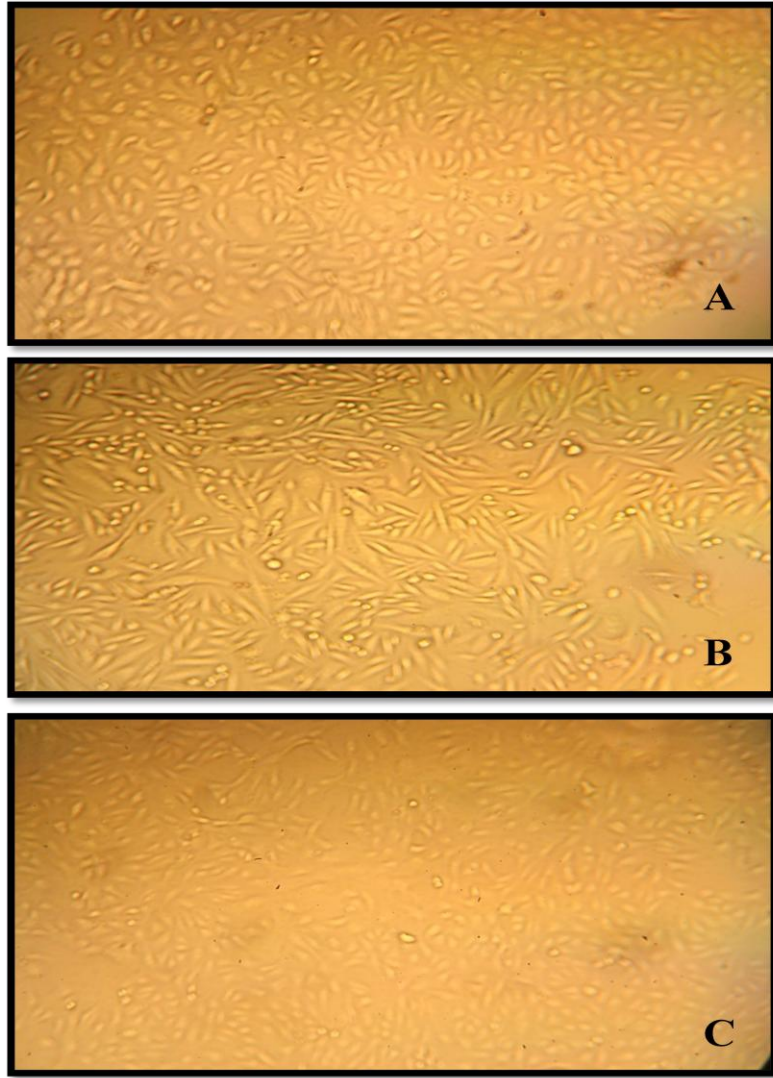
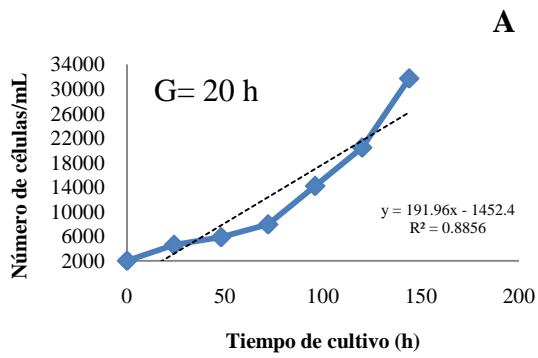
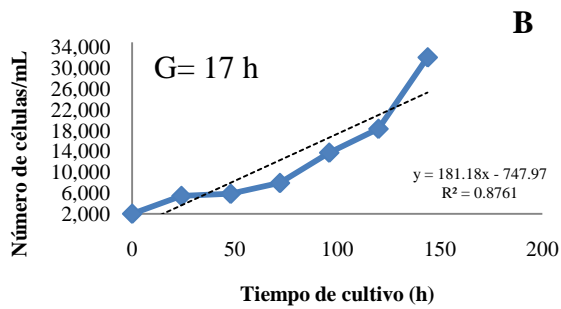


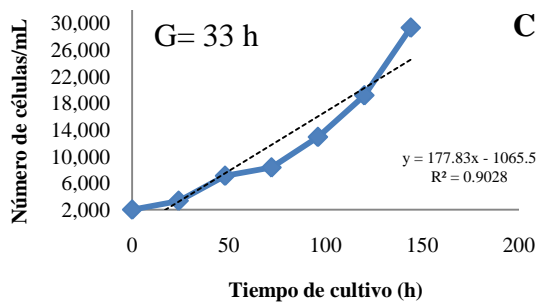
Figura 10. Cultivos confluentes de las líneas celulares HeLa (A), SiHa (B) y Vero (C)



Tiempo de cultivo (h)	No.cel
0	2,000
24	4,583
48	5,833
72	7,917
96	14,167
120	20,417



Tiempo de cultivo (h)	No.cel
0	2,000
24	5,417
48	5,833
72	7,917
96	13,750
120	18,333



Tiempo de cultivo (h)	No.cel
0	2,000
24	3,333
48	7,083
72	8,333
96	12,917
120	19,167

Figura 11. Cinéticas de crecimiento para las líneas HeLa (A), SiHa (B) y Vero (C) con el tiempo de generación (G) determinado para cada línea celular.

El extracto de orujo posee actividad antitumoral sobre las líneas HeLa (adenocarcinoma de cérvix) y SiHa (carcinoma de células escamosas de cérvix) mediante el ensayo de CellTiter Blue®, presentando una IC₅₀ de 51 y 53 µg/mL respectivamente, y un efecto citotóxico sobre células Vero con una IC₅₀ de 48 µg/mL. Para el extracto de semilla de uva se determinó una IC₅₀ de 50 µg/mL para las líneas HeLa y SiHa, mientras que para las Vero presentó una IC₅₀ de 40 µg/mL. En la **Tabla IV** se muestran las viabilidades celulares de las tres líneas cuando fueron tratadas con extracto de orujo y extracto de semilla de uva.

Tabla IV. Efecto antitumoral (HeLa y SiHa) y citotóxico (Vero) del extracto de orujo de uva [E] así como el extracto de semilla de uva mediante el ensayo de CellTiter Blue®.

Concentración (µg/mL)	Viabilidad celular (%)					
	HeLa		SiHa		Vero	
	EO	SU	EO	SU	EO	SU
50	52 ± 0.03	50 ± 0.09	55 ± 0.08	50 ± 0.01	42 ± 0.09	36 ± 0.02
100	56 ± 0.07	74 ± 0.05	52 ± 0.10	51 ± 0.04	49 ± 0.02	41 ± 0.01
200	55 ± 0.02	74 ± 0.06	53 ± 0.48	69 ± 0.21	50 ± 0.15	44 ± 0.21
250	59 ± 0.04	75 ± 0.09	56 ± 0.46	77 ± 0.17	52 ± 0.23	45 ± 0.48
500	66 ± 0.13	73 ± 0.07	60 ± 0.10	83 ± 0.11	64 ± 0.20	45 ± 0.50

EO = Extracto metanólico crudo de orujo de uva

SU = Extracto estandarizado de semilla de uva

En las **Figuras 12, 13 y 14** se pueden observar los daños ocasionados a las respectivas líneas celulares, la **Figura 12 A** presenta los daños del extracto de orujo

sobre las células HeLa, se puede observar una notable disminución celular, células apoptóticas y multinucleadas, lo mismo para la **Figura 13** que presenta a las células SiHa, y para las células Vero (**Figura 14**) se observa la ausencia de una gran parte de la monocapa, por lo que resultaron las más sensibles a ambos extractos.

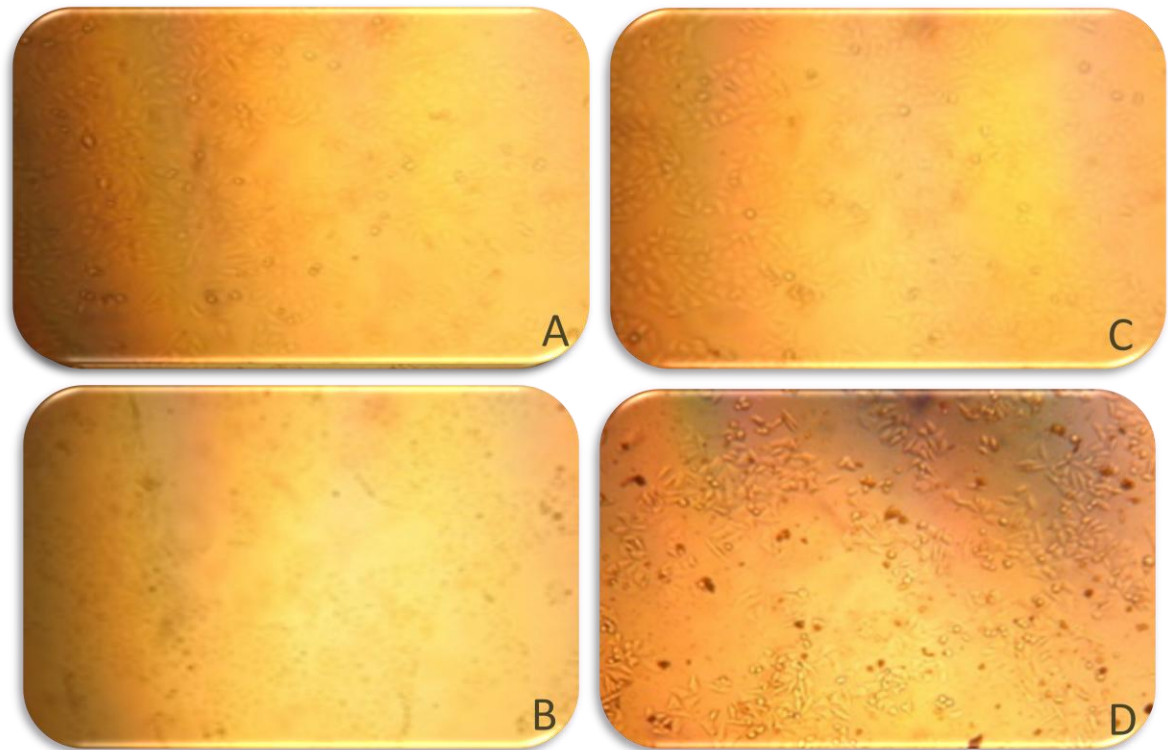


Figura 12. Actividad antitumoral del extracto de orujo de uva [E] y del extracto de semilla de uva sobre células HeLa.

- A) Control de la línea celular
- B) Control positivo, Tritón X-100
- C) Extracto de orujo, 50 $\mu\text{g/mL}$
- D) Extracto de semilla de uva, 50 $\mu\text{g/mL}$

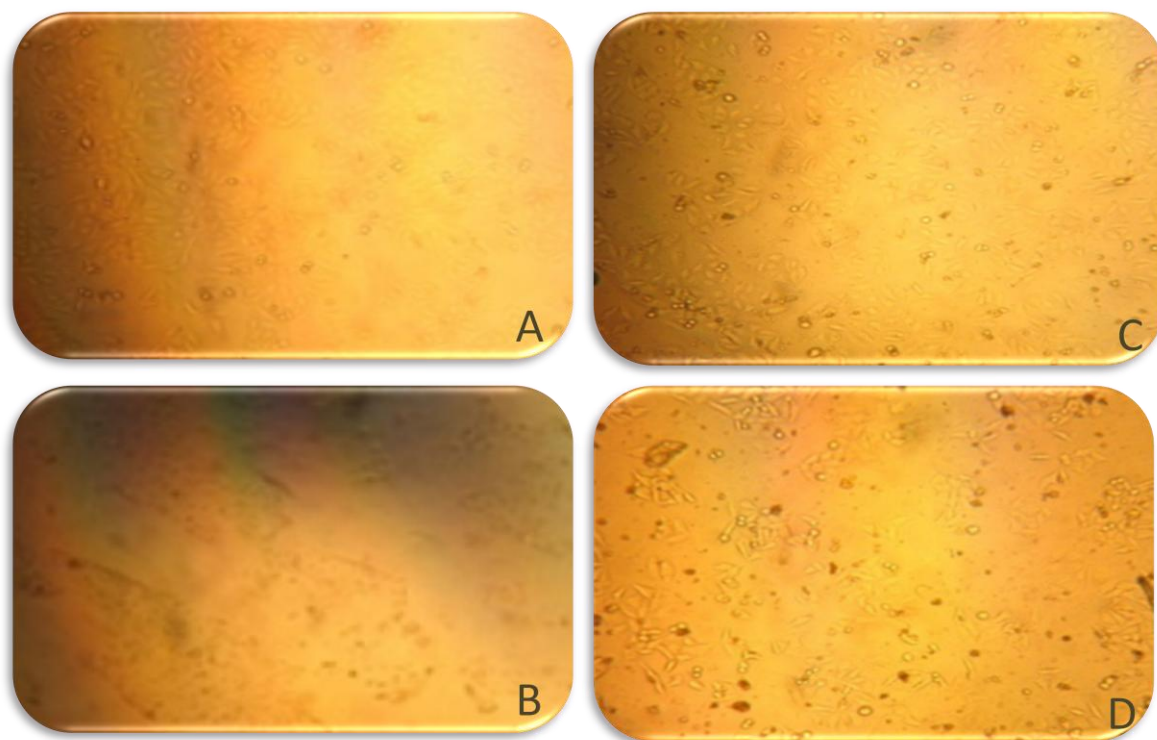


Figura 13. Actividad antitumoral del extracto de orujo de uva [E] y del extracto de semilla de uva sobre células SiHa.

- A) Control de la línea celular
- B) Control positivo, Tritón X-100
- C) Extracto de orujo, 50 µg/mL
- D) Extracto de semilla de uva, 50 µg/mL

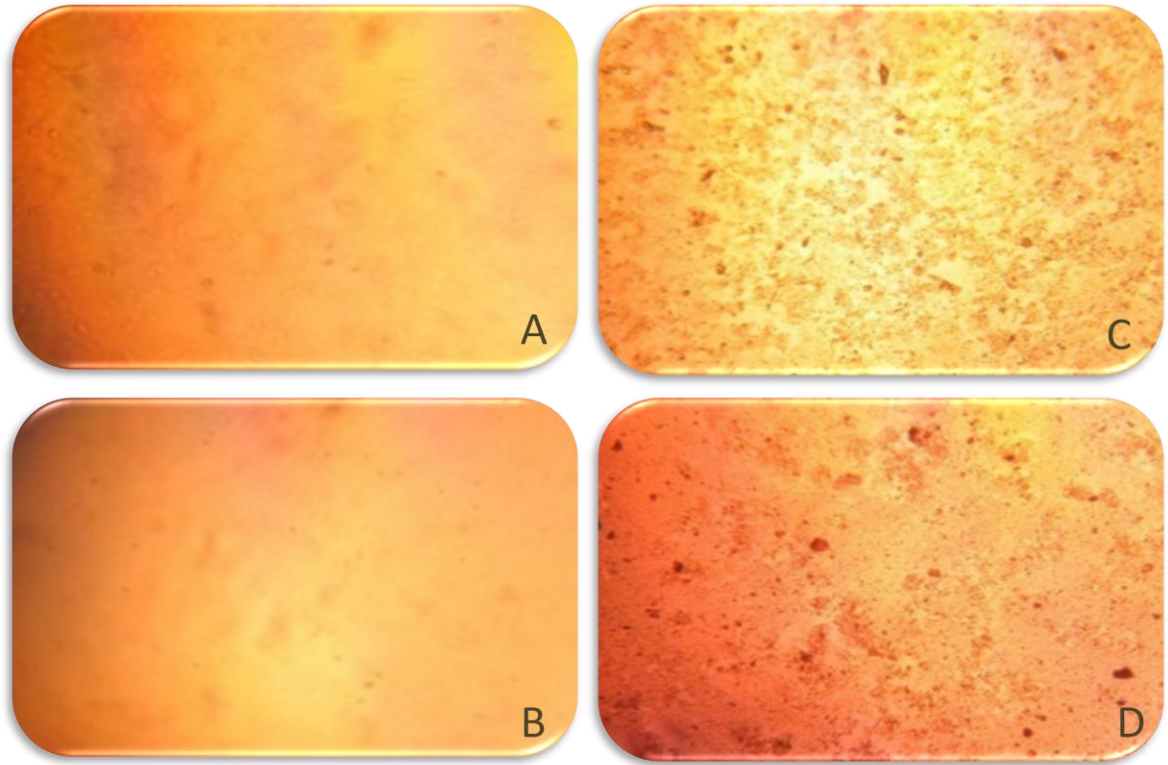


Figura 14. Actividad citotóxica del extracto de orujo de uva [E] y del extracto de semilla de uva sobre células Vero.

- A) Control de la línea celular
- B) Control positivo, Tritón X-100
- C) Extracto de orujo, 50 µg/mL
- D) Extracto de semilla de uva, 50 µg/mL

En la **Tabla V** se muestran las familias identificadas en el extracto de orujo de uva, mediante reacciones químicas específicas, se determinó la presencia de esteroides y metilesteroides, flavonoides, sesquiterpenlactonas, alcaloides, dobles enlaces, oxhidrilos fenólicos y cumarina mientras que no se detectaron azúcares y grupos carbonilo.

Tabla V. Identificación de las familias de metabolitos secundarios mediante reacciones químicas específicas en el extracto de orujo de uva [E].

Prueba química	Resultado
Esteroides y metilesteroides (Salkowski)	+
Flavonoide (Shinoda)	+
Sesquiterpenlactonas (Ácido sulfúrico)	+
Alcaloides (Dragendorff)	+
Dobles enlaces (Permanganato de Potasio)	+
Oxidrilos fenólicos (Cloruro férrico)	+
grupos carbonilo (2,4-Dinitrofenilhidracina)	-
Azúcares (Molish)	-
Cumarinas	+

Para el ensayo de citoprotección se utilizó una línea normal de fibroblastos humanos, se obtuvieron los porcentajes de viabilidad de las muestras individuales de H₂O₂ y extracto de orujo de uva, dichas viabilidades se presentan en la **TablaVI**, como se puede observar el H₂O₂ resulta muy tóxico para los fibroblastos a todas las concentraciones probadas, sin embargo, para el extracto de orujo se presentan viabilidades altas por lo que el extracto no resulta tóxico para las células.

TablaVI. Viabilidad celular presentada en el ensayo de citoprotección causada por la exposición de H₂O₂ y el extracto de orujo de uva [E].

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidad celular (%)
H ₂ O ₂ [10]	34
H ₂ O ₂ [20]	29
H ₂ O ₂ [40]	25
E [25]	85
E [50]	74
E [100]	71

Se probaron mezclas del agente oxidante (H₂O₂) y antioxidante (extracto de orujo de uva) a diferentes concentraciones para ser agregados al cultivo de fibroblastos, de éste ensayo se obtuvieron nuevamente las viabilidades celulares y se obtuvieron los siguientes resultados: el extracto de orujo ofrece citoprotección al daño ocasionado por el H₂O₂ *in vitro*, como podemos observar en la **Figura 15**, las mezclas de extracto-oxidante: 100 $\mu\text{g/mL}$ -40 μM , 100 $\mu\text{g/mL}$ -20 μM y 50 $\mu\text{g/mL}$ -20 μM favorecen la recuperación de la viabilidad celular incrementándola en un 32, 28 y 26 % respectivamente, en comparación al daño causado por el oxidante de manera individual.

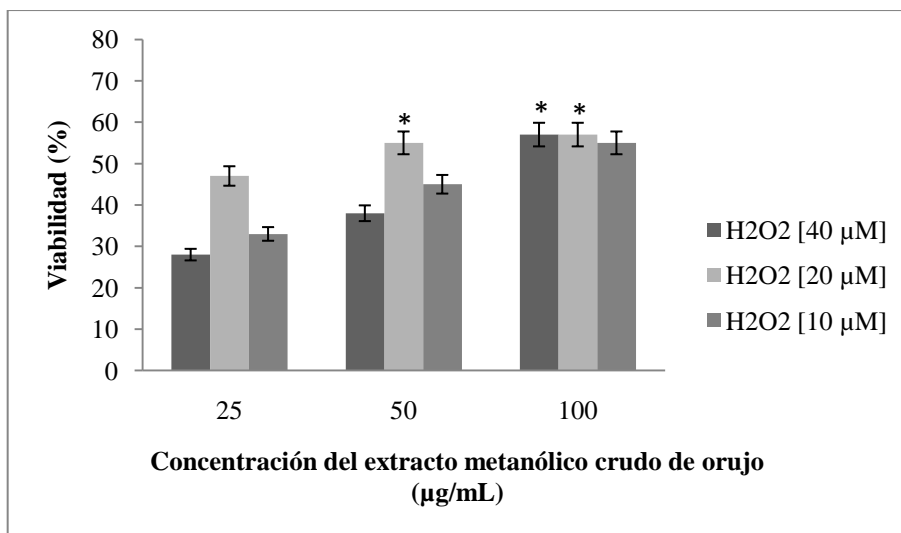


Figura 15. Efecto citoprotector de las mezclas antioxidante-oxidante del extracto de orujo de uva [E] frente al daño ocasionado por agente oxidante (H₂O₂).

Mediante el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*, se obtuvo una CL₅₀ de 1195 μg/mL mediante el método PROBIT utilizando el programa SPSS 10.0. (Tabla VII), por lo que el extracto es considerado no tóxico.

Tabla VII. Valores PROBIT obtenidos del ensayo de *A. salina* para determinar la CL₅₀.

Probability	95% Confidence Limits for conc			95% Confidence Limits for log(conc) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
.010	2.253	.468	5.868	.353	-.330	.769
.020	4.699	1.239	10.640	.672	.093	1.027
.030	7.492	2.295	15.546	.875	.361	1.192
.040	10.640	3.645	20.700	1.027	.562	1.316
.050	14.155	5.305	26.156	1.151	.725	1.418
.060	18.047	7.295	31.948	1.256	.863	1.504
.070	22.331	9.637	38.106	1.349	.984	1.581
.080	27.023	12.354	44.659	1.432	1.092	1.650
.090	32.142	15.473	51.637	1.507	1.190	1.713
.100	37.706	19.018	59.072	1.576	1.279	1.771
.150	73.028	44.074	104.516	1.863	1.644	2.019
.200	123.497	83.604	169.119	2.092	1.922	2.228
.250	193.822	139.722	264.852	2.287	2.145	2.423
.300	290.528	213.477	411.298	2.463	2.329	2.614
.350	422.747	306.890	637.151	2.626	2.487	2.804
.400	603.460	424.655	984.324	2.781	2.628	2.993
.450	851.921	574.483	1367.410	2.930	2.760	3.164
.500	1195.008	767.683	2340.942	3.077	2.885	3.369
.550	1677.352	1020.833	3028.970	3.220	3.009	3.500
.600	2366.428	1359.091	5684.891	3.374	3.133	3.755
.650	3378.015	1822.335	9063.411	3.529	3.261	3.957
.700	4915.337	2477.546	14846.183	3.692	3.394	4.172
.750	7367.822	3445.693	25328.010	3.867	3.537	4.404
.800	11563.384	4968.018	45977.271	4.063	3.696	4.663
.850	19554.675	7600.150	92248.192	4.291	3.881	4.955
.900	37873.472	12957.193	221867.613	4.578	4.113	5.346
.910	44429.838	14736.380	274302.521	4.648	4.168	5.438
.920	52844.866	16946.011	345423.693	4.723	4.229	5.538
.930	63948.454	19758.445	445116.800	4.806	4.296	5.648
.940	79128.897	23452.755	590879.280	4.898	4.370	5.771
.950	100887.960	28513.647	816301.756	5.004	4.455	5.912
.960	134211.425	35867.471	1193428.825	5.128	4.555	6.077
.970	190621.794	47548.868	1903888.542	5.280	4.677	6.280
.980	303906.011	69152.410	3543099.486	5.483	4.840	6.549
.990	633883.634	124742.084	9434257.517	5.802	5.096	6.975

a. Logarithm base = 10.

La Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos y la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM y FEUM) marcan los lineamientos a seguir para la validación de materias primas herbolarias (específicamente la FHEUM), con la finalidad de establecer parámetros que ayuden a determinar propiedades físicas y químicas que aseguren la inocuidad para el uso de materias primas herbolarias.

En este sentido, se realizaron 3 de los métodos generales de análisis que marcan dichas Farmacopeas. Los resultados obtenidos de estos métodos fueron los siguientes: se determinó un 4 % de cenizas totales y un 3 % de pérdida por secado, lo que indica, según la FHEUM, es la ausencia de materia orgánica en el extracto, así como la baja cantidad de agua presente, con lo cual se descarta la presencia de pesticidas, tierra, insectos, así como la incapacidad al desarrollo de microorganismos al carecer de agua.

En la determinación directa de la presencia de microorganismos, utilizando medios selectivos se determinó:

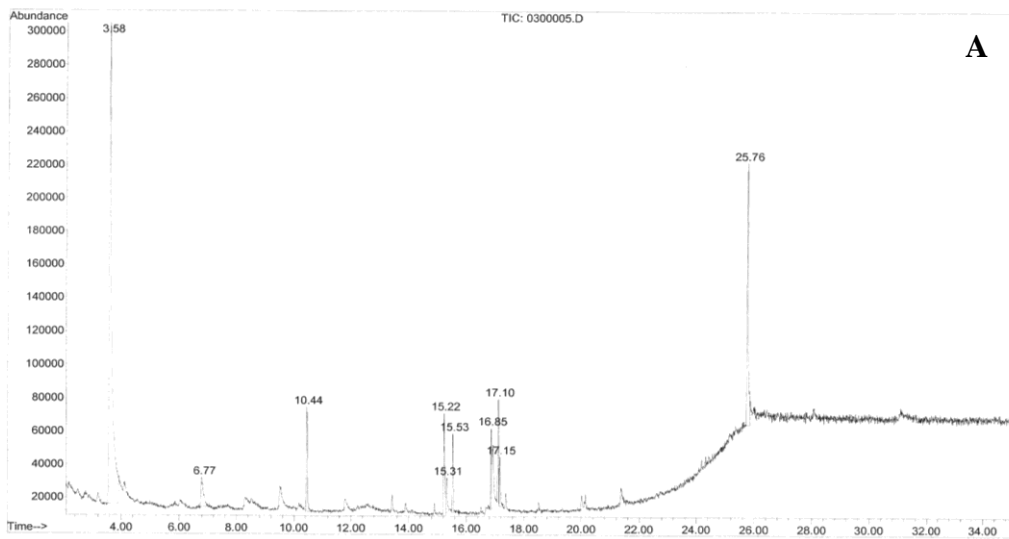
Para bacterias anaerobias: 9 UFC/mL en placa agar para cuenta estándar incubadas durante 48 h a 37°C, siendo la cuenta máxima de 300 UFC.

Para hongos y levaduras: 15 UFC/mL en placa agar dextrosa papa incubadas durante 7 días a 25°C.

Para coliformes totales: 10 UFC/mL en placa agar de bilis y rojo violeta durante 48 h a 37°C.

La identificación de compuestos se realizó mediante un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GS-MS) encontrando los siguientes resultados, en la **Figura 16 A y B**, se presentan los espectros de masas para el extracto de orujo sin tratamiento y con un tratamiento de silanizado.

File :C:\MSDCHEM\1\DATA\10\Oct\05\0300005.D
 Operator :
 Acquired : 5 Oct 2010 15:21 using AcqMethod 8270
 Instrument : Instrumen
 Sample Name : Mta-02
 Misc Info : Extracto de Orojo
 Vial Number: 3



File :C:\MSDCHEM\1\DATA\10\Oct\07\0300004.D
 Operator :
 Acquired : 7 Oct 2010 15:16 using AcqMethod 8270
 Instrument : Instrumen
 Sample Name : Mta-02
 Misc Info : Extracto de Orojo, Silanizada
 Vial Number: 3

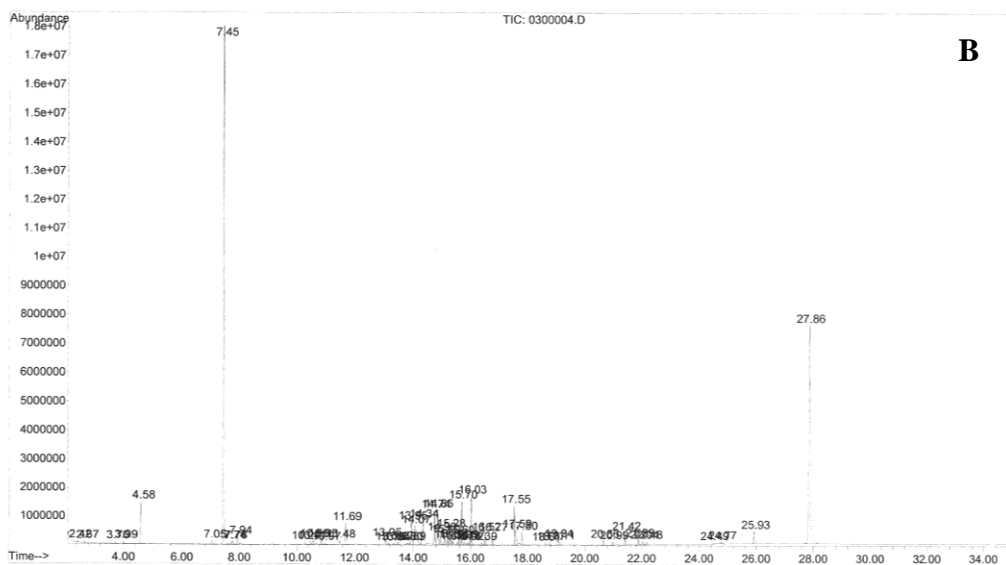
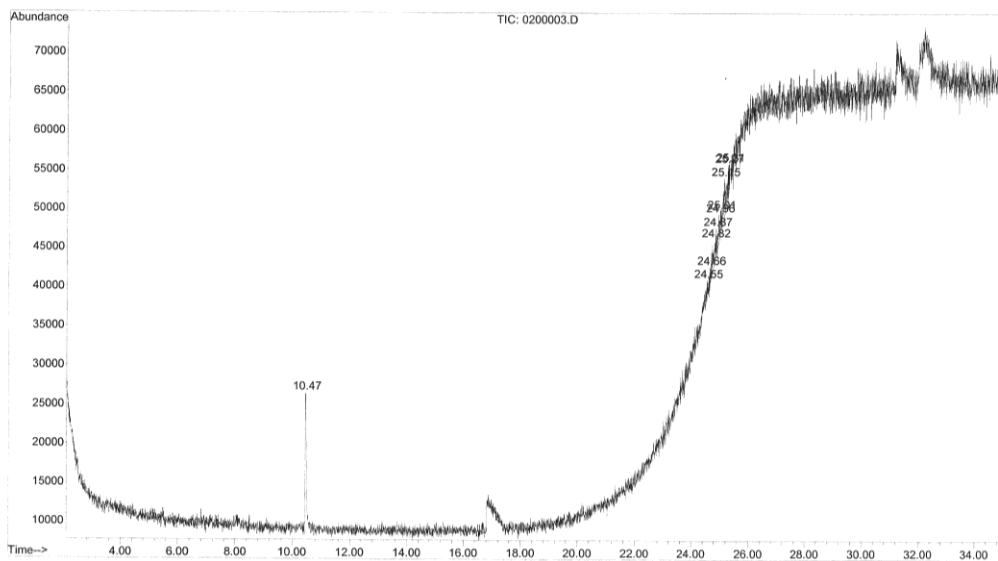


Figura 16. Espectros de masas del extracto de orujo de uva [E] sin silanizar (A) y silanizado (B).

File :C:\MSDCHEM\1\DATA\10\Oct\05\0200003.D
Operator :
Acquired : 5 Oct 2010 13:56 using AcqMethod 8270
Instrument : Instrumen
Sample Name: Mta-01
Misc Info : Extracto de Semilla
Vial Number: 2

A



File :C:\MSDCHEM\1\DATA\10\Oct\07\0200002.D
Operator :
Acquired : 7 Oct 2010 13:52 using AcqMethod 8270
Instrument : Instrumen
Sample Name: Mta-01
Misc Info : Extracto de Semilla, Silanizada
Vial Number: 2

B

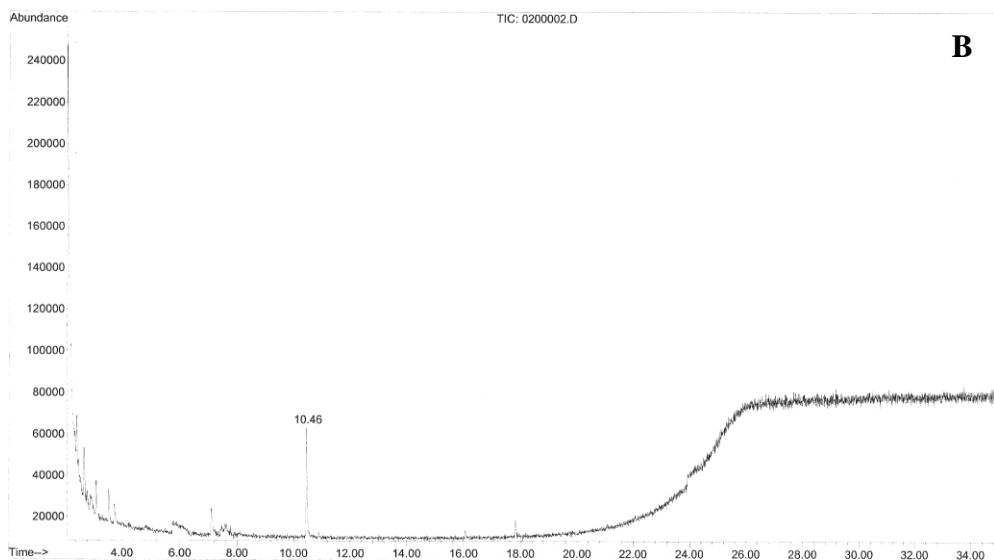


Figura 17. Espectros de masas del extracto de semilla de uva sin silanizar (A) y silanizado (B).

En la **Figura 17** se muestran los espectros de masas para el extracto de semilla de uva. Como se puede apreciar en el espectro de masas de la semilla de uva, se observa solamente una señal con tiempo de retención (TR) de 10.47 para la muestra no tratada (**Figura 17A**) y de 10.46 para la muestra silanizada (**Figura 17B**), quedando claro que se trata del mismo compuesto y que según la base de datos consultada, se trata de un fenol (2,4-bis[1,1 dimetiletil) con un 93 % de certeza, obteniendo la misma información para el extracto silanizado de semilla de uva. En cuanto al extracto de orujo, en la **Tabla VIII** se muestran las señales obtenidas del extracto sin tratar y tratado así como los datos arrojados por la base de datos consultada.

Tabla VIII. Compuestos identificados en el extracto de orujo de uva [E] mediante

GS-MS utilizando la base de datos Wiley7n.1

Muestra	Tiempo de retención (TR)	Certeza (%)	Compuesto
Extracto sin tratar	10.44	96	2,4-bis[1,1 dimetiletil
	15.22	93	Ácido hexadecanoico
	15.53	96	Ácido hexadecanoico
	16.85	96	Ácido octadecanoico
	17.10	90	Ácido linoleico
Extracto tratado	7.05	97	Ácido benzoico
	7.74	94	1,2,3-butantriol, tris-o
	7.94	94	Ácido succinico
	13.05	93	Xilitol
	13.34	96	Ácido benzoico
	14.85	94	Glucosa
	15.10	99	Ácido cinámico
	15.38	95	Ácido gálico
	15.70	94	Glucopiranososa
	16.77	94	Myo-inositol
	17.55	93	Ácido linoleico
	17.59	93	Ácido oleico
	17.80	98	Ácido octadecanoico
25.93	99	β -sitosterol	

9. DISCUSIÓN

Debido a la diversidad de reportes acerca de los tipos de extractos y extracciones, se decidió realizar los más representativos y que fueran lo más sencillo posible, con la visión de la posible aplicación de tal manera que no ocasionara un costo elevado para la obtención del extracto. De esta manera se diseñaron las cinco formas de extracción descritas en la sección 6.2 de los materiales y métodos (**Tabla II**), para luego descartar y seleccionar el que diera más activo en el ensayo de Vainillina-HCl. Como podemos observar en la **Tabla III** el extracto D fue el que obtuvo el mayor rendimiento, seguido por el extracto C, E, A y B respectivamente, el extracto B sometido a sonicación fue el que obtuvo el menor rendimiento, es importante mencionar que los reportes de Yilmaz and Toledo, 2004; Monagas *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2003; González-Paramás *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2002; Köhler *et al.*, 2008; Aquino *et al.*, 2001 utilizan el MeOH como solvente, lo que varía es el método de extracción, sin embargo tanto el solvente como el método afectan la obtención de los compuestos activos, proantocianidinas. El rendimiento obtenido del extracto E fue de 2.23 %, se tiene la referencia de un estudio similar pero con un extracto metanólico de orujo de uva de la variedad Bangalore Blue cultivada en India, reportaron un rendimiento de 5.6 % con un paso previo de desengrasado con hexano y con extracción Soxhlet (Chidambara *et al.*, 2002), nuestro rendimiento fue menor, aproximadamente en un 50 % comparado con este reporte, pero cabe mencionar que el método de extracción Soxhlet es un método que

generalmente reporta mayores rendimientos comparado con métodos de extracción como la agitación constante, especialmente para compuestos fenólicos (Lock, 1994; Tsantila *et al.*, 2007), por lo que el rendimiento es adecuado para el método de extracción utilizado.

El ensayo de vainillina-HCl, es un ensayo colorimétrico específico para detectar flavan-3-ol estructura básica de las proantocianidinas de la uva (Nakamura *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 1998). Los extractos obtenidos fueron sometidos a dicho ensayo con la finalidad de seleccionar el que presentara la mayor concentración de polifenoles totales, y asegurar con ello, la presencia de proantocianidinas, para proceder a evaluar la actividad biológica. Los resultados del ensayo de vainillina-HCl se muestran en la **Tabla III** como referencia se tomó la actividad mostrada por la catequina (Fuleki *et al.*, 1997), se evaluaron los cinco extractos además de un extracto de semilla de uva estandarizado al 95 % en polifenoles, utilizado como materia prima para la elaboración de suplementos alimenticios, como se puede observar en la **Tabla III**, el extracto de semilla de uva mostró la mayor actividad con 40 %, seguido del extracto E con 35 %, éstos resultados nos indican que el extracto presenta proantocianidinas en una proporción similar al del extracto estandarizado, ya que la variación entre uno y otro es de solamente 5 %. El resultado obtenido del resto de los extractos fue de 7, 3, 13 y 17 para los extractos A, B, C y D respectivamente. En base a éstos resultados se seleccionó el extracto E para proceder a evaluar su actividad biológica: antioxidante (mediante 3 métodos), antitumoral, citotóxica, toxicidad y citoprotección, además de someter al extracto a técnicas como la identificación de familias de metabolitos secundarios, métodos generales de análisis de la FHEUM, FEUM y la identificación de los compuestos presentes en el extracto, además como se puede apreciar en la **Figura 6** el extracto

obtenido posee un color morado y característico de las antocianinas detectadas en la piel de las uvas rojas (del Valle *et al.*, 2005):

En base a los reportes existentes acerca de la actividad antioxidante de los polifenoles (Martínez-Flores *et al.*, 2002) presentes en los extractos obtenidos de uva y su semilla, vino tinto, así como compuestos aislados de estos, se determinaron varios parámetros tales como la actividad antioxidante y citotóxica así como su toxicidad que nos permitieran evaluar su uso y efectividad como posible fuente de compuestos para la industria farmacéutica y/o justificar el posible uso del extracto como materia prima para la elaboración de fitofármacos y/o aditivo en alimentos. Ya que no existen estudios de propiedades o aplicaciones de orujos de uva cultivada en México, se evaluó su actividad antioxidante y antitumoral, así como su toxicidad para confirmar su efectividad y seguridad como extracto bioactivo.

En cuanto a la actividad antioxidante se emplearon varias técnicas, ya que cada una de ellas proporciona diferente información. La técnica de DPPH es considerada como uno de los ensayos más frecuentes para la evaluación de la capacidad antioxidante mediante la captura de radicales libres (Prior *et al.*, 2005; Gutiérrez-Maydata, 2002; Villaño *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2005). Cuando el radical libre acepta un electrón se observa un decremento en su coloración de morado a amarillo, lo cual se interpreta como la capacidad de captura de radicales libres del material ensayado. La variación de la capacidad de captura del radical DPPH se da en función de la concentración del extracto de orujo, se determinó una EC_{50} de 24 $\mu\text{g/mL}$, observándose la capacidad de captura del extracto sobre el radical DPPH (**Figura 7**). Este resultado coincide con lo reportado por Chidambara *et al.*, 2002, en donde se evaluó un extracto metanólico de

orujo de uva de la variedad Bangalore Blue cultivada en la India y encontraron un 67 % de inhibición del radical DPPH a 50 ppm.

Nuestros resultados son de gran interés ya que haciendo una comparación entre el control positivo utilizado, Vitamina E, a la misma concentración que el extracto ($25 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$) no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$), sin embargo existe variación a las concentraciones restantes, por lo que la actividad mostrada por el extracto de orujo es similar a la actividad mostrada por la vitamina E, antioxidante puro y reconocido por su gran capacidad antioxidante en sistemas lipídicos, cuando ambos se encuentran a una concentración de $25 \mu\text{g/mL}$.

La capacidad reductora está íntimamente relacionada con la capacidad antioxidante, debido a que el daño oxidativo causado por los radicales libres en las biomoléculas y los componentes celulares puede ser revertido por las moléculas que tienen alta capacidad de donar electrones en reacciones de óxido-reducción (Chung *et al.*, 2010; Kelm *et al.*, 2005). Para dicha prueba, se utilizó como control positivo ácido ascórbico, ya que es la molécula de interés biológico antioxidante con mayor poder reductor. El ensayo de poder reductor se realizó mediante la evaluación de la conversión de Fe^{3+} a Fe^{2+} . En los resultados obtenidos (**Figura 8**), se puede observar que la absorbancia debida al complejo formado por Fe^{2+} aumenta cuando se incrementa la concentración del extracto de orujo de uva y del ácido ascórbico. El poder reductor del extracto no presenta diferencia significativa al ser comparado con el poder reductor del ácido ascórbico a la concentración de $1000 \mu\text{g/mL}$, para el resto de las concentraciones se observa diferencia en la actividad, por lo que únicamente a $1000 \mu\text{g/mL}$ concentración el extracto presenta el mismo poder reductor que el ácido, dichos datos son relevantes ya que al igual que la vitamina E, el ácido ascórbico es ampliamente reconocido por su capacidad antioxidante

en sistemas lipofílicos y mediante los resultados se comprobó que el extracto presenta la misma actividad antioxidante que ambas sustancias a las concentraciones comparadas de 25 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ para la vitamina E y el ácido ascórbico, respectivamente. Durante el metabolismo aerobio se generan pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species), incluyendo radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), aniones superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como respuesta a estímulos externos e internos. Sin embargo, altas concentraciones o una eliminación inadecuada de estas sustancias, causan estrés oxidativo, lo que provoca disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas causando enfermedades crónico-degenerativas (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004; Gutiérrez-Maydata, 2002). La técnica de inhibición de la peroxidación permite evaluar la actividad antioxidante del extracto de orujo sobre una ROS, que es formada normalmente a nivel biológico, a partir del proceso de peroxidación de ácidos grasos insaturados (Zou *et al.*, 2004). Para ésta prueba se estableció un período de incubación de 84 h, ya que fue el punto en donde se observaron los niveles mayores de peroxidación del control sin tratar, es decir, de la emulsión de ácido linoleico. En la **Figura 9** se pueden observar los porcentajes de inhibición del extracto de orujo (**Figura 9A**) así como del extracto de semilla de uva (**Figura 9B**), utilizado en este ensayo como referencia. Como se puede observar, el extracto de orujo presenta 23, 47 y 70 % de inhibición de formación de los hidroperóxidos a 50, 100 y 500 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de orujo respectivamente. Aunque el extracto de uva estandarizado presenta porcentajes de inhibición mayores, los resultados obtenidos para el extracto de orujo son prometedores ya que se está comparando un extracto estandarizado de semilla de uva al 95 % en polifenoles, con el extracto de orujo crudo y sin ningún tipo de purificación, lo que deja abierta la posibilidad que, para ésta

técnica, se pudiera mejorar la actividad al purificarlo, sin embargo es importante tener presente que la inhibición del 70 % a 500 µg/mL en la formación de hidroperóxidos un sistema lipídico resulta muy atractiva.

En resumen, la actividad antioxidante del extracto metanólico crudo de orujo de uva mostró actividades similares a sus controles positivos, tanto en sistemas lipofílicos como hidrofílicos. Los resultados obtenidos de estas tres técnicas permiten afirmar que el extracto metanólico desengrasado con hexano por agitación continua de orujo de uva [E] posee actividad antioxidante y que trabaja a diferentes niveles: puede capturar radicales libres, es capaz de donar electrones y puede inhibir la formación de hidroperóxidos a partir del ácido linoleico, proceso que se puede comparar con la oxidación de las membranas celulares.

En un estudio realizado por Rubilar *et al.*, 2007, evaluaron la actividad antioxidante de dos orujos de uva provenientes de España (Uva Garnatxa) y Chile (Cabernet Sauvignon) a partir de extractos etanólicos, e identificaron sus compuestos, ellos obtuvieron por el método de captura del radical libre DPPH una EC₅₀ de 200 000 µg/mL y 1 000 000 µg/mL de la variedad Cabernet y Garnatxa, respectivamente, además identificaron los compuestos presentes en los extractos crudos encontrando las siguientes compuestos: flavan-3-ol (epicatequina o epigallocatequina), quercetina, vitexina/kaempferol galactosido y luteolina/kaempferol glucósido en el extracto crudo de la variedad Garnatxa, así como miricetina, quercetina, kaempferol glucósido, quercetina glucósido, metoxi (iso) rhamnetina e (iso) rhamnetina es sus formas glicosiladas en el extracto crudo de la variedad Cabernet Sauvignon. Estos datos son interesantes ya que nos permiten generar hipótesis acerca de los compuestos responsables de la actividad biológica evaluadas en esta investigación, aunque no

necesariamente sean los mismos compuestos debido al solvente utilizado en la extracción, la región donde se cultivó la planta y la variedad de la uva utilizada.

En la búsqueda de las actividades biológicas trascendentes y con un gran futuro en la investigación, la implementación del uso de las líneas celulares constituye una herramienta básica que define un sinnúmero de propiedades de un extracto o compuesto vegetal, pudiéndose determinar mecanismos de inhibición de proliferación celular, citotoxicidad, apoptosis, rompimiento de señales celulares o arresto celular (Sagar *et al.*, 2006). Se utilizaron cultivos confluentes de las líneas tumorales HeLa y SiHa, así como la línea normal de mamífero Vero (**Figura 10**). Se realizaron las cinéticas de crecimiento para determinar la fase exponencial donde las células muestran su mayor actividad metabólica y se determinaron sus tiempos de generación (G) (**Figura 11A, B y C**).

Es conocido que los radicales libres pueden llegar a producir enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004; Gutiérrez-Maydata, 2002), actualmente el cáncer cérvico-uterino es un problema de salud pública en México y representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, por lo que se decidió evaluar el efecto citotóxico sobre dos líneas celulares de cáncer cérvico-uterino HeLa y SiHa, y la línea Vero, normal de mamífero, utilizando el reactivo CellTiter Blue que mide la capacidad metabólica de la célula como indicativo de daño citotóxico, encontrándose una CI_{50} del extracto de orujo de 51, 53 y 48 $\mu\text{g/mL}$ para la línea HeLa, SiHa y Vero respectivamente, mientras que para el extracto estandarizado de semilla de uva evaluado, se encontró una CI_{50} de 50 $\mu\text{g/mL}$ para las líneas tumorales y una CI_{50} de 45 $\mu\text{g/mL}$ para la línea normal Vero. En la **Tabla IV** se observa la viabilidad celular de las tres líneas probadas a las diferentes concentraciones, se puede ver que el extracto de

semilla de uva posee los porcentajes de inhibición mayores a todas las concentraciones probadas, sin embargo, una vez más es importante mencionar la pureza del extracto de semilla de uva y la poca diferencia en la actividad mostrada entre ambos extractos, por lo que los resultados con el extracto de orujo son relevantes y deben ser tomados en cuenta para futuras investigaciones que buscan en las plantas compuestos con actividad antitumoral. En las **Figuras 12, 13 y 14** se pueden observar los daños causados por el extracto de orujo así como el extracto de semilla de uva, causado a 50 µg/mL, células con morfología anormal comparadas con el control, y una notable disminución en la densidad celular.

Actualmente, no existen estudios acerca de la actividad citotóxica de los orujos de uva sobre las células de origen cérvico-uterino, por lo que estos resultados son un aporte importante en el área clínico-farmacológica, se ha reportado un efecto citotóxico de las fracciones o los compuestos derivados de las uvas con buenos resultados (Faria *et al.*, 2006; Hakimuddin *et al.*, 2006) por ejemplo, se han probado oligómeros de procianidinas, compuestos presentes en las uvas y vinos tintos sobre la línea celular U-87 de glioblastoma humano inhibiendo su crecimiento y presentando poca citotoxicidad sobre una línea normal (Zhang *et al.*, 2009). En otra investigación se comparó el efecto antioxidante con el efecto citotóxico de las fracciones de procianidinas, sobre la línea de queratinocitos HaCaT y la 3T3 de ratón, encontrando que las fracciones que poseen alta capacidad antioxidante presentan poca citotoxicidad sobre las células normales (Zhang *et al.*, 2005). De la misma manera, Joshi *et al.*, 2001, probaron el efecto del vino tinto de uva sobre células MCF-7 de cáncer de mama encontrando que presenta citotoxicidad selectiva mediante el arresto celular.

En cuanto a los metabolitos secundarios identificados en el extracto mediante las pruebas coloridas descritas por Domínguez, 1973, se determinó la presencia de esteroides y metilesteroides, sesquiterpenlactonas, dobles enlaces, coumarinas, alcaloides, flavonoides y oxhidrilos fenólicos, además de determinar la ausencia de grupos carbonilo y azúcares. Es importante mencionar que las pruebas para dobles enlaces, flavonoides y oxhidrilos fenólicos se esperaba que dieran positivas, debido a la naturaleza de los compuestos encontrados en la uva, sin embargo, la presencia de alcaloides no se esperaba ya que no han sido reportados en extractos provenientes de la uva (**Tabla V**).

El ensayo de RN fue descrito por primera vez por Borenfreund and Puerner, 1984, describiendo este ensayo como un procedimiento simple y sensible para la búsqueda de agentes citotóxicos en monocapas de líneas celulares adherentes, basado en la incorporación del colorante supravital rojo neutro en los lisosomas de las células viables, por lo que los cambios en la acumulación y retención de dicho colorante implica un daño en las membranas celulares, es un ensayo ampliamente utilizado (Fickova *et al.*, 2008; Soud-Mensi *et al.*, 2008; Weyermann *et al.*, 2005; Ugartondo *et al.*, 2007).

El ensayo se planificó siguiendo la estructura de Sugisawa *et al.*, 2004, utilizando la línea normal adherente de fibroblastos humanos, como se puede observar en la **Tabla VI** las viabilidades obtenidas para el extracto de orujo y el H₂O₂ de manera individual, se observa claramente el daño ocasionado por el H₂O₂ y las viabilidades presentadas por el extracto de orujo indican que no es citotóxico, dichos datos se pueden corroborar con el estudio realizado por Sugisawa *et al.*, 2004, quienes reportaron una baja viabilidad celular por el H₂O₂ y escasa citotoxicidad de un extracto de semilla de uva sobre células linfoblastoides humanas. Puiggròs *et al.*, 2005, evaluaron la pre-incubación de un

extracto de procianidinas de semilla de uva en células HepG2 utilizando H_2O_2 determinando que para esta línea celular el extracto altera la expresión de genes y causa apoptosis, sin necesidad de exponerlas al H_2O_2 concluyendo que el mecanismo citotóxico de las procianidinas de la uva sobre las células de hepatocarcinoma es muerte celular programada. En un estudio similar Llopiz *et al.*, 2004, evaluaron el efecto antígenotóxico de un extracto de procianidinas de semilla de uva sobre células Fao mediante el ensayo cometa (para evaluar daños directos a ADN) utilizando como agente oxidante al H_2O_2 encontrando que dicho extracto no es genotóxico de manera individual, caso contrario del H_2O_2 que presentó daños severos al ADN, y el dato más importante es que determinaron que la catequina, epicatequina, quercetina y procianidinas protegen a las células Fao del daño oxidativo del H_2O_2 600 μ M, dichos datos refrendan los resultados obtenidos en nuestra investigación, ya que como se puede observar en la **Figura 15** el efecto tóxico del H_2O_2 se reduce cuando está presente el extracto de orujo, pero principalmente se observa una recuperación en la viabilidad celular en los tratamientos del extracto de orujo a 50 μ g/mL con H_2O_2 a 20 μ M y 100 μ g/mL del extracto de orujo con H_2O_2 a 40 y 20 μ M. Dichos resultados corroboran el efecto citoprotector del extracto de orujo sobre células normales humanas expuestas al agente oxidante H_2O_2 .

Debido a que el objetivo del trabajo fue evaluar la actividad biológica del extracto de orujo para ser considerado como fuente de fito-fármacos o ingrediente funcional, se realizó la determinación de la CL_{50} con el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*, ensayo considerado como de selección o descarte de extractos tóxicos para sistemas biológicos (Meyer *et al.*, 1982; Bastos *et al.*, 2009; Almeida-Alves *et al.*, 2000; Masseur and Nshimo, 1995; Solis *et al.*, 1993; Nieto *et al.*, 2008) asegurando con ello su

efectividad y nula toxicidad. En este trabajo, se encontró una CL_{50} de 1195 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de orujo mediante un análisis PROBIT, (**Tabla VII**) dicho resultado indica que el extracto no es tóxico, según la escala reportada por Déciga-Campos *et al.*, 2007, quien indica que una concentración mayor de 1000 $\mu\text{g/mL}$ se considera que el compuesto es no tóxico.

Es importante mencionar que no se encontraron reportes de la toxicidad de extractos de orujo de uva mediante este ensayo, por lo que nuestros datos son una aportación a la actividad biológica de este extracto.

En base a los resultados encontrados sobre la línea celular Vero, la cual mostró los porcentajes de viabilidad más bajos cuando se expusieron al extracto de orujo y de semilla de uva, y la determinación de la CL_{50} sobre *Artemia salina*, la evaluación del efecto citoprotector mediante el ensayo de rojo neutro (RN) nos permitió evaluar la citotoxicidad sobre una línea normal de fibroblastos humana y no sobre una línea normal de mamífero (en este caso la línea Vero proviene de riñón de mono verde), además de evaluar la citoprotección proporcionada por el extracto de orujo cuando las células son tratadas con H_2O_2 , un radical libre formado biológicamente, por lo que los resultados de este ensayo resultan más representativos.

Los resultados obtenidos de los métodos generales de análisis indican que el extracto de orujo no posee materia orgánica extraña, que no posee humedad y se corrobora el hecho de que el extracto haya presentado 3 % en pérdida por secado, ya que las condiciones no son favorables para el desarrollo de microorganismos, lo que se avala con las bajas UFC reportadas. Con estos resultados validamos el hecho de que el extracto es seguro e inocuo a concentraciones inferiores a 1.1 mg/mL . No se encontró referencia alguna acerca de la utilización de alguno de estos métodos para evaluar

extractos vegetales, por lo que dichos resultados son una aportación al ámbito de los productos naturales para asegurar el uso e inocuidad de los mismos.

Los espectros de masas obtenidos del extracto de orujo y semilla de uva silanizado y sin silanizar se observan en las **Figuras 16 y 17** respectivamente, en el caso del extracto de orujo de uva, el silanizado produjo más señales que el análisis del extracto sin silanizar.

En cuanto a la identificación de compuestos se obtuvieron varios datos que no habían sido reportados en la literatura para compuestos presentes en uva, se determinó la presencia de ácido gálico al igual que los compuestos reportados por Yilmaz and Toledo, 2004 Hollecker *et al.*, 2009, en extractos de semilla de uva de las variedades Merlot, Chardonnay, Muscadine y Sauvignon. Éstos resultados son de gran interés ya que no se tienen reportes de compuestos presentes en los orujos de uva mexicana, especialmente en la variedad Ruby Cabernet cultivada en el estado de Aguascalientes, Méx, por lo que los resultados de la identificación son una aportación al conocimiento de la caracterización parcial del extracto, como se puede observar en la **Tabla VIII**, además de presentar β -sitosterol y ácido cinámico (99 % de certeza), presenta ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, y ácido benzoico (con alrededor de 98 % de certeza), dichos compuestos no se habían reportado en un extracto derivado de uva, por lo que resulta de gran interés seguir caracterizando más a fondo el extracto, con otro tipo de técnicas, como HPLC, HPLC-MS, MS/MS etc.

10. CONCLUSIONES

El extracto metanólico crudo de orujo de uva (*Vitis vinifera* Var. Ruby Cabernet), posee actividad biológica.

- ✓ De los cinco extractos obtenidos del orujo de uva el de mayor rendimiento fue el extracto D- Metanol-Etanol 1:1 con agitación con un 8.11 %
- ✓ De los cinco extractos evaluados mediante el ensayo de vainillina-HCl el más activo fue el extracto E- metanólico desengrasado con hexano y extraído mediante agitación continua, con un 35 % y una diferencia de 5 % menos al estándar de catequina que presentó 40 %, por lo que el extracto E fue el seleccionado para determinar la actividad biológica.
- ✓ La captura del radical libre mediante el ensayo DPPH causado por el extracto de orujo se obtuvo una EC_{50} de 24 $\mu\text{g/mL}$ similar al de la vitamina E de 25 $\mu\text{g/mL}$ -
- ✓ El extracto de orujo posee poder reductor a 1000 $\mu\text{g/mL}$, similar al ácido ascórbico la misma concentración.
- ✓ El extracto de orujo es capaz de inhibir la formación de hidroperóxidos hasta en un 70 % a 500 $\mu\text{g/mL}$ en una emulsión de ácido linoleico.
- ✓ El extracto no presenta toxicidad sobre *A. salina* con una CL_{50} de 1195 $\mu\text{g/mL}$.
- ✓ El extracto de orujo posee actividad antitumoral sobre las líneas HeLa (adenocarcinoma de cérvix) y SiHa (carcinoma de células escamosas de cérvix) mediante el ensayo de CellTiter Blue®, con una IC_{50} de 51 y 53 $\mu\text{g/mL}$

respectivamente, comparado con el extracto de semilla de uva con una IC_{50} de 50 $\mu\text{g/mL}$ para ambas líneas celulares.

- ✓ El extracto de orujo presentó una IC_{50} de 48 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea normal Vero de riñón de mono verde, comparado con el extracto de semilla de uva con una IC_{50} de 40 $\mu\text{g/mL}$.
- ✓ El extracto de orujo de uva posee esteroides y metilesteroides, flavonoides, sesquiterpenlactonas, alcaloides, dobles enlaces, oxhidrilos fenólicos y coumarinas.
- ✓ El extracto de orujo de uva posee efecto citoprotector sobre la línea normal de fibroblastos humanos ATCC: CRL-2522 con las mezclas de extracto-oxidante: 100 $\mu\text{g/mL}$ -40n μM , 100 $\mu\text{g/mL}$ -20 μM y 50 $\mu\text{g/mL}$ -20 μM favorecen la recuperación de la viabilidad celular incrementándola en un 32, 28 y 26 % respectivamente, en comparación al daño causado por el oxidante de manera individual.
- ✓ El extracto de orujo de uva cumple con las especificaciones físicas y químicas de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) y Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) para el uso seguro e inocuo como materia prima herbolaria.
- ✓ Los compuestos identificados en el extracto de orujo son: β -sitosterol y ácido cinámico (99 % de certeza), ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, y ácido benzoico (con alrededor de 98 % de certeza), ácido gálico.

En base a los resultados obtenidos de esta investigación, el extracto crudo metanólico de orujo de uva posee actividad biológica relevante, además de cumplir con parámetros establecidos para ser propuesto como ingrediente funcional o en la formulación de fitofármacos, ya que resulta un recurso de bajo costo y producción constante de compuestos activos.

11. LITERATURA CITADA

1. Akar T, Tosun I, Kaynak Z, Ozkara E, Yeni O, Sahin EN, Akar ST. 2008. An attractive agro-industrial by-product in environmental cleanup: Dye biosorption potential of untreated olive pomace. *Journal of Hazardous Materials* 162:1217-1225.
2. Almeida-Alves TM, Fonseca-Silva A, Brandão M, Mesquita-Grandi TS, Smânia EF, Júnior AS, Zani CL. 2000. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95:367-373.
3. Altan A, McCarthy KL, Maskan M. 2009. Effect of extrusion cooking on functional properties and in vitro starch digestibility of barley-based extrudates from Fruit and Vegetable By-Products. *Journal of Food Science* 74:E77-86.
4. Andrade PB, Mendes G, Falco V, Valentão P, Seabra RM. 2001. Preliminary study of flavonols in port wine grape varieties. *Food Chemistry* 73:397-399.
5. Aquino R, Morelli S, Lauro R, Abdo S, Saija A, Tomaino A. 2001. Phenolic constituents and antioxidant activity of an extract of *Anthurium versicolor* leaves. *Journal of Natural Products* 64:1019-1023.
6. Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. 2002. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape sedes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957:260-70

7. Bastos ML, Lima MR, Conserva LM, Andrade V, Rocha E, Lemos R. 2009. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 8:1-6.
8. Bayoumi AE, Ordóñez C, Pérez-Pertejo Y, Balaña-Fouce R, Ordóñez D. 2002. Citotoxicidad del fungicida mancozeb en cultivos de CHO-K1. *Revista de Toxicología* 19:29-34.
9. Benito S, Lopez D, Sáiz MP, Buxaderas S, Sánchez J, Puig-Parellada P, Mitjavila MT. 2002. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *British Journal of Pharmacology* 135(4):910-6.
10. Borenfreund E and Puerner L. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* 9:1 PROCEDURE No. 75101.
11. Bozan B, Tosun G, Özcan. 2008. Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. *Food Chemistry* 109:426-430.
12. Brand-Williams W, Cuvelier M.E, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 28:25-30.
13. Breksa A, Takeoka G, Hidalgo M, Vilches A, Vasse J, Ramming D. 2010. Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. *Food Chemistry* 121:740-745.

14. Caillet S, Salmiéri S, Lacroix M. 2006. Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. *Food Chemistry* 95:1-8.
15. Cardenas E. 2001. The phenolic wine antioxidant (chapter 20). In: *Handbook of antioxidants*. Second Edition. Marcel Dekker Incorporated: New York, pp.401-421
16. Chidambara KN, Singh RP, Jayaprakasha GK. 2002. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:5909-5914.
17. Chung H, Ji X, Canning C, Sun S, Zhou K. 2010. Comparison of different strategies for soybean antioxidant extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:4508-12.
18. Cortell JM, Halbleib M, Gallagher AV, Righetti TL, Kennedy JA. 2007. Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) anthocyanins. Anthocyanins and pigmented polymers in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:6585-95.
19. Cragg GM and Newman DJ. 2001. Natural product drug discovery in the next millennium. *Pharmaceutical Biology* 39:8–17.
20. Cragg GM and Newman DJ. 2007. Medicinals for the millennia: the historical record. *Annals of the New York Academy of Sciences* 953:3–25.
21. Cragg GM, Newmann DJ, Snader KM. 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* 60:52–60.
22. Cui Y, Kim DS, Park KC. 2005. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *Journal of Ethnopharmacology* 96:79-85.

23. de Campos LM, Leimann FV, Pedrosa RC, Ferreira SR. 2008. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource technology* 99:8413-8420.
24. Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castañeda-Corral G, Angeles-López GE, Navarrete A, Mata R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 110:334-342.
25. del Valle G, González A, Báez R. 2005. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28:359-368.
26. Devi A, Jolitha AB, Ishii N. 2006. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats. 12:124-9.
27. Domínguez X. 1973. Métodos de investigación fitoquímicos, primera edición, Editorial Limusa, México, pp. 84-97.
28. Faria A, Calhau C, Freitas V, Mateus N. 2006. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2392-2397.
29. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, (FEUM) Octava Edición, Primer Suplemento, 2006, Secretaría de Salud, ISBN: 970-721-371-X. Publicaciones e Impresiones de Calidad, S.A de C.V
30. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaría de Salud, México 2001, ISBN: 968-811-982-2
31. Fernández K, Kennedy J, Agosin E. 2007. Characterization of *Vitis vinifera* L. Cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. 55:3675-3680.

32. Fernández-Pachón MS, Villaño D, Troncoso AM, García-Parrilla MC. 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 56:110-122.
33. Fickova M, Pravdova E, Rondhal L, Uher M, Brtko J. 2008. In vitro antiproliferative and cytotoxic activities of novel kojic acid derivatives: 5-benzyloxy-2-selenocyanatomethyl- and 5-methoxy-2-selenocyanatomethyl-4-pyranone. Journal of Applied Toxicology 28:554-9.
34. Fuleki T and da Silva R. 1997. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45:1156-1160.
35. Gabetta B, Fuzzati N, Griffini A, Lolla E, Pace R, Ruffilli T, Peterlongo F. 2000. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. Fitoterapia 71:162-175.
36. Gerogiannaki-Christopoulou M, Athanasopoulos P, Kyriakidis N, Gerogiannaki I, Spanos M. 2006. *trans*-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. Food Control 17:700-706.
37. González-Paramás AM, Esteban-Ruano S, Santos-Buelga C, Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo JC. 2004. Flavonol content and antioxidant activity in winery byproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:234-238.
38. Guendez R, Kallithraka S, Makris D, Kefalas P. 2005. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. Food Chemistry 89:1-9.
39. Gutiérrez-Maydata A. 2002. Vino, polifenoles y protección a la salud. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición 16:134-145.

40. Hakimuddin F, Paliyath G, Meckling K. 2006. Treatment of mcf-7 breast cancer cells with a red grape wine polyphenol fraction results in disruption of calcium homeostasis and cell cycle arrest causing selective cytotoxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:7912-7923.
41. Herber D. 2007. *PDR for Herbal Medicines*. 3a. ed. Thomson PDR, NJ, USA, pp. 400-404
42. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K. 2001. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 47(5):357-62.
43. Hollecker L, Pinna M, Filippino G, Scrugli S, Pinna B, Argiolas F, Marru M. 2009. Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography-electron spray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216:3402-3408.
44. Huang Z, Wang B, Williams P, Pace R. 2009. Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *LWT-Food Science and Technology* 42:819-824.
45. Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L. 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin, and resveratrol in red grape: content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis* 21:589-598.
46. Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi D. 2001. The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2:187-200.

47. Kallithraka S, Mohdaly A, Makris D, Kefalas P. 2005. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 18:375-386.
48. Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A. 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4360-4367.
49. Kelm M, Hammerstone J, Schmitz H. 2005. Identification and quantitation of flavonols and proanthocyanidins in foods: How good are the datas?. *Clinical and Developmental Immunology* 12:35-41.
50. Kelm M, Hammerstone J, Schmitz H. 2005. Identification and quantitation of flavanols and proanthocyanidins in foods: How good are the datas?. *Clinical & Developmental Immunology* 12:35:41.
51. Khanal RC, Howard LR, Brownmiller CR, Prior RL. 2009. Influence of extrusion processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. *Journal of Food Science* 72:H52-8.
52. Kimura Y and Okuda H. 2001. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in lewis lung carcinoma-bearing mice. *Journal of Nutrition* 131:1844-49.
53. Köhler N, Wray V, Winterhalter P. 2008. Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1177:114-125.

54. Llópiz N, Puiggrós F, Céspedes E, Arola L, Ardévol A, Blandé C, Salvadó J. 2004. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:1083-1087.
55. Lock O. 1994. *Investigación Fitoquímica Métodos en el estudio de productos naturales*. 2da ed. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Perú, pp. 120-127.
56. Martínez-Flores S, González-Gallego J. M, Culebras J. M, Tunón M. J. 2002. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 6:271-278.
57. Masseur AY and Nshimo CM. 1995. Brine shrimp bioassay for biological activity of medicinal plants used in traditional medicines in Tanzania. *East African Medical Journal* 72:661-663.
58. Merck, S. A. Industrias Químicas. 2000. *Bioflavonoides: Quercetina y Rutina*. Informe a Profesionales.
59. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen L B, Nichols D E, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45:31-34.
60. Mitsuda H, Yasumodo K, Iwami F. 1966. Antioxidant action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo* 19:210-214
61. Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B, Laureano O, Da Silva J. 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, tempranillo, and cabernert sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:6475-6481.

62. Monagas M, Hernández-Ledesma B, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. 2006. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:319-327.
63. Muñoz S, Mestres M, Busto O, Guasch J. 2008. Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: validation study and response comparison of different standards. *Analytica Chimica Acta* 628:104-110.
64. Nakamura Y, Tsuji S, Tonogai Y. 2003. Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *Journal of Health Science* 49:45-54.
65. Nieto I, Salama A, Cataño J, Chegwin C. 2008. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología* 25:186-187.
66. NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
67. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
68. Norma Oficial Mexicana NOM—111-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
69. Norma Oficial Mexicana NOM—113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

70. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44:307-315.
71. Pascual-Martí MC, Salvador A, Chafer A, Berna A. 2001. Supercritical fluid extraction of resveratrol from grape skin of *Vitis vinifera* and determination by HPLC. *Talanta* 54:735-740.
72. Prior R, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4290-4302.
73. Puiggròs F, Llopiz N, Ardévol A, Bladé C, Arola L, Salvadó MJ. 2005. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:6080-6.
74. Puiggròs F, Llopiz N, Ardévol A, Blandé C, Arola L, Salvadó J. 2005. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:6080-6086.
75. Renaud S and Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Epidemiology* 339:1523-1526.
76. Revilla E and Ryan JM. 2000. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography* 881:461-469.
77. Rodríguez-Rodríguez R, Perona J, Herrera D, Ruiz-Gutierrez V. 2006. Triterpenic compounds from “Orujo” olive oil elicit vasorelaxation in aorta from

- spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:2096-2102.
78. Rubilar M, Pinelo M, Shene C, Sineiro J, Núñez MJ. 2007. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:10101-10109.
79. Ruiz D, Egea J, Gil M, Tomás-Barberán F. 2005. Characterization and quantitation of phenolic compounds in new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:9544-9552.
80. Sagar SM, Yance D, Wong RK. 2006. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part 1 and 2. *Current Oncology* 13 (1), 14-26 Parte 1 y 13 (3): 99-107 Parte 2.
81. Santa-María A, López A, Díaz MM, Ortiz AI. 2001. Comparación de la citotoxicidad del amaranto en dos líneas celulares de mamífero utilizando bioensayos colorimétricos rápidos. *Revista de Toxicología* 18:79-81.
82. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. 2006. *Natural products Isolation*. Second edition. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, pp. 1-5
83. Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, Roy S. 2002. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957:239-49
84. Shaid SA, Anwar F, Manzoor M, Bajwa J. 2006. Evaluation of the antioxidant activity of rice bran extracts using different antioxidant assays. *Grasas y Aceites* 57:328-335.

85. Solis PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica* 59:250-252.
86. Souid-Mensi G, Moukha S, Mobio TA, Maaroufi K, Creppy EE. 2008. The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicology* 15:1338-44.
87. Sugisawa A, Inoue S, Umegaki K. 2004. Grape seed extract prevents H₂O₂-induced chromosomal damage in human lymphoblastoid cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27:1459-1461.
88. Sun B, Ribes A, Leandro C, Belchior P, Spranger I. 2006. Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variations during wine maturation. *Analytica Chimica Acta* 563:382-390.
89. Sun B, Ricardo-da-Silva J, Spranger I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4267-4274.
90. Terao J, Yamaguchi S, Shirai M, Miyoshi M, Moon JH, Oshima S, Inakuma T, Tsushida T, Kato Y. 2001. Protection by quercetin and quercetin 3-O-beta-D-glucuronide of peroxynitrite-induced antioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein. *Free Radical Research* 35(6):925-31.
91. Thimothe J, Bonsi IA, Padilla-Zakour OI, Koo H. 2004. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis* interspecific hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:10200-10207.

92. Torres JL, Varela B, García MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ, Cascante M, Sort X, Bobet E. 2002. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:7548-7555.
93. Tsantila N, Karantonis HC, Perrea DN, Theocharis SE, Iliopoulos DG, Antonopoulou S, Demopoulos CA. 2007. Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits. *Mediators of Inflammation* 2007:36204.
94. Ugartondo V, Mitjans M, Touriño S, Torres JL, Vinardell MP. 2007. Comparative antioxidant and cytotoxic effect of procyanidin fractions from grape and pine. *Chemical Research of Toxicology* 20:1543-1548.
95. Valenzuela A. 2004. El consumo del té y la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. *Revista Chilena de Nutrición* 31(2). Disponible en el sitio de red: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182004000200001&script=sci_arttext
96. Velázquez-Paniagua M, Prieto-Gómez B, Contreras-Pérez R. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* 75:37-43.
97. Veluri R, Singh RP, Liu Z, Thompson JA, Agarwal R, Agarwal C. 2006. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis* 27:1445-1453.

98. Vendruscolo F, da Silva Ribeiro C, Esposito E, Ninow JL. 2009. Protein enrichment of apple pomace and use in feed for Nile tilapia. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 152: 74-87.
99. Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71:230-235.
100. Wang J and Mazza G. 2002. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50:4183–4189.
101. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics* 20:369-76.
102. Yilmaz Y and Toledo R. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:255-260.
103. Youdim KA, McDonald J, Kalt W, Joseph JA. 2002. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *Journal of Nutrition Biochemistry* 13:282-288
104. Zhang FJ, Yang JY, Mou YH, Sun BS, Ping YF, Wang JM, Bian XW, Wu CF. 2009. Inhibition of U-87 human glioblastoma cell proliferation and formyl peptide receptor function by oligomer procyanidins (F2) isolated from grape seeds. *Chemico-Biological Interactions* 179:419-29. Epub 2009 Jan 10.
105. Zhang XY, Li WG, Wu YJ, Zheng TZ, Li W, Qu SY, Liu NF. 2005. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin

via immunomodulatory mechanism. *International Immunopharmacology* 5:1247-57.

106. Zou Y, Lu Y, Wei D. 2004. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5032-5039.

12 PERSPECTIVAS

- Evaluar el extracto de orujo de uva con otras técnicas de actividad antioxidante, así como sobre otras líneas celulares de origen tumoral.
- Investigar el comportamiento del orujo de uva bajo diferentes condiciones de almacenaje así como verificar la presencia de los compuestos bajo dichas condiciones.
- Someter el extracto a análisis más detallados de identificación de compuestos tales como: HPLC-MS, MS-MS, IR, NMR etc.
- Realizar ensayos para observar el posible efecto coadyuvante del extracto de orujo con compuestos quimioterapéuticos para el tratamiento de cáncer de cérvix.
- Identificar los mecanismos moleculares de la actividad antioxidante del extracto de orujo *in vivo*.

RESÚMEN BIOGRÁFICO

Ledy Elizabeth García Becerra

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: ACTIVIDAD BIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DEL EXTRACTO DE ORUJO DE UVA (*Vitis vinifera*. Var. Ruby Cabernet).

Campo de estudio: Química biológica

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 22 de Enero de 1984, hija de María Angelina García Becerra.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo

Experiencia Profesional: Investigación y Desarrollo en el Departamento de Servicios Técnicos de Malabar Productos Naturales desde Enero de 2007.

Publicaciones: 2



Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
Nicolás San Juan No. 1511 Colonia del Valle
Delegación Benito Juárez C.P. 03100
México, D.F.
Tel: 9183-2080 Fax: 9183-2071
www.afmac.org.mx

Expediente: 324

México, D.F. a 26 de octubre de 2010

QBP Ledy García Becerra
Laboratorio de Química Analítica
Facultad de Ciencias Biológicas
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Presente

Estimada química García:

Tengo el agrado de comunicarle que el artículo perteneciente a la sección Trabajo Científico intitulado:

"Actividad biológica de un extracto de orujo de uva mexicana "

de los autores *Ledy García B., Julia Verde S., Rocío Castro R., Abelardo Chávez M., Azucena Oranday C., Adriana Núñez G., Catalina Rivas M.* ha sido aceptado para su publicación en la *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* en el Vol. 41, No. 4 Oct – Dic 2010.

La Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas está indizada a: Internacional Pharmaceutical Abstracts, Chemical Abstracts, EMBASE de Excerpta Medica, Latindex, Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnología del CONACyT (expediente No. 88888) y a la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (Redalyc).

Esperando contar nuevamente con material de su autoría, quedo de usted.

Atentamente

Por la superación Técnica y Científica

Dra. Dea Herrera Ruiz
Editora

c.c.p. Dra. Dea Herrera Ruiz Editora RMCF
c.c.p. Archivo AFMAC