



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CAPACIDAD ANTIMICROBIANA E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL VINO ARTESANAL E INDUSTRIAL DE ACACHUL (*Ardisia compressa*)

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

P.L.N Ana Pahola Oloarte Hernández

Bajo la Dirección de:
Dr. José de Jesús Manríquez Torres
Profesor investigador del Área Académica de Nutrición.

Pachuca, Hidalgo., Junio 2016





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

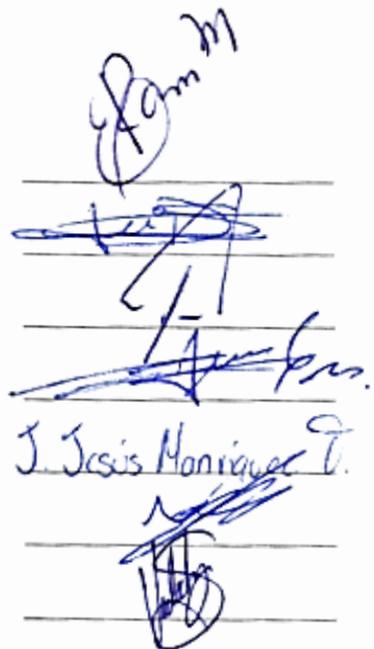
"Actividad antioxidante, capacidad antimicrobiana e identificación de compuestos bioactivos del vino artesanal e industrial de acachul (*Ardisia compressa*)".

Que para obtener el Título de Licenciada de Nutrición sustenta la Pasante

C. Ana Pahola Oloarte Hernández.

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 17 de mayo del 2016
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE:	DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO
SECRETARIO:	DR. LUIS DELGADO OLIVARES
PRIMER VOCAL:	NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO
SEGUNDO VOCAL:	DR. ERNESTO ALANÍS GARCÍA
TERCER VOCAL:	DR. JOSÉ DE JESÚS MANRIQUEZ TORRES
PRIMER SUPLENTE:	DR. JOSÉ ALBERTO ARIZA ORTEGA
SEGUNDO SUPLENTE:	L.N. CLAUDIA ELENA VALADEZ SERRANO



Handwritten signatures of the jury members, corresponding to the names listed on the left. The signatures are written in blue ink on horizontal lines.

Agradecimientos y dedicatorias

Gracias a **Dios**, mi padre celestial, por darme la oportunidad de llegar hasta aquí, por regalarme a mis hermosos padres **Anita** y **Alberto**, quienes han sido mi fuerza día con día, quienes a pesar de las adversidades no han dejado de creer en mí ni un solo instante, quienes han caminado a mi lado en los peores y mejores momentos de mi existir, los amo con mi vida.

A mis hermanitas del alma **Karen** y **Nadia**, gracias por impulsarme a ser mejor persona cada día, son las mejores amigas que la vida me pudo dar. Hermanitos **Blanca** y **Eliz** gracias por aguantarme tantos años y apoyarme en todo momento. Hermana **Karlita** gracias por siempre estar para mí de manera incondicional.

Bel, **Fri**, **Lili**, gracias por ser las amigas más divertidas de la vida, sin ustedes la universidad no hubiera sido lo que fue.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por su apoyo y amistad. Gracias a mis revisores de tesis por ayudarme a mejorar mi trabajo.

Un agradecimiento especial a mi director de tesis el **Dr. José de Jesús Manríquez Torres**, por brindarme sus enseñanzas y apoyo en todo momento, lo admiro y respeto muchísimo.

Dedico esta tesis a mi hermanito **Beto**, desde hace diez años que llegaste a nuestra pequeña familia para llenarnos de luz y alegría. Te amo.

Para ti mi hermoso **Nico**, eres mi motor y mi mayor inspiración, no imagino la vida sin ti, sin duda alguna, el mejor regalo que Dios me ha dado. Te amo con toda la fuerza de mi ser hijo mío.

En los ancianos está la ciencia,
y en la larga edad la inteligencia. **Job 12:12.**

Esta tesis se realizó en el Centro de Investigación Multidisciplinario del Instituto de Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo con beca PRODEP (DSA/103.5/14/10948).

Esta tesis generó las siguientes participaciones en congresos:

2do Congreso Estatal de Investigación en Salud, llevado a cabo en la ciudad de Pachuca de Soto, Hidalgo; los días 27 y 28 de agosto del 2015, con el título “Evaluación de la actividad antioxidante y capacidad antimicrobiana del vino artesanal e industrial de *Ardisia compressa*”

1er Congreso Nacional de Nutrición y Seguridad Alimentaria, llevado a cabo en la ciudad de Pachuca de Soto, Hidalgo; los días 4 y 5 de noviembre del 2015, con el título “Contenido de fenoles totales, actividad antioxidante y antimicrobiana del vino artesanal e industrial de *Ardisia compressa*”.

Esta tesis generó la siguiente memoria en la 12ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, llevado a cabo en la ciudad de Xalapa, Veracruz los días 18, 19 y 20 de mayo del 2016, con el título “Estudio químico biodirigido de frutos de *Ardisia compressa*”.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
Resumen	IV
Abstract	V
1. Marco teórico	1
1.1 <i>Ardisia compressa</i>	1
1.2 Acachul: fruto de <i>Ardisia compressa</i>	3
1.3 Vino tradicional de uva	4
1.3.1 Elaboración artesanal de vinos de frutas	4
1.3.2 Vino de acachul	6
1.3.3 Vino y salud	7
1.4 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo	9
1.5 Radicales libres	10
1.6 Antioxidantes	11
1.6.1 Antioxidantes primarios	11
1.6.2 Antioxidantes secundarios	12
1.7 Compuestos polifenólicos	13
1.7.1 Compuestos polifenólicos con actividad antioxidante en vinos	14
1.8 Importancia de los antimicrobianos	15
1.8.1 Actividad antimicrobiana en vinos	16
1.8.2 Características generales de microorganismos patógenos	18
2. Planteamiento del problema	21
3. Justificación	22
4. Objetivo general	23
4.1 Objetivos específicos	23
5. Metodología	24
5.1 Obtención de las muestras	25
5.2 Análisis químico proximal del fruto	25
5.3 Liofilización de los vinos	25

5.4 Pruebas de actividad antioxidante	26
5.4.1 Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH	26
5.4.2 Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS	27
5.5 Contenido de fenoles totales	28
5.6 Determinación de ácido L-ascórbico.....	29
5.7 Ensayo de actividad quelante	30
5.8 Actividad antimicrobiana	31
5.8.1 Microorganismos de ensayo	31
5.8.2 Medios de cultivo.....	31
5.8.3 Curvas de crecimiento microbiano	31
5.8.4 Siembra masiva.....	31
5.8.5 Método de difusión mediante Kirby-Bauer	32
5.9 Extracción, purificación e identificación de compuestos bioactivos	33
5.9.1 Cromatografía líquida en capa fina (TLC)	33
5.9.2 Purificación de la fase acuosa.....	33
5.9.3 Purificación de la extracción de AcOEt	34
5.9.3 Resonancia magnética nuclear (RMN).....	34
6. Análisis estadístico	34
7. Resultados y discusión	35
7.1 Análisis químico proximal del fruto acachul (<i>Ardisia compressa</i>)	35
7.2 Determinaciones en el vino artesanal e industrial de <i>Ardisia compressa</i>	36
7.2.1 Actividad antioxidante mediante el método DPPH	36
7.2.2 Actividad antioxidante mediante el método de ABTS.....	38
7.2.3 Contenido de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu	39
7.2.4 Determinación de ácido L- ascórbico	41
7.2.5 Ensayo de actividad quelante	42
7.2.6 Determinación de la capacidad antimicrobiana	44
7.2.7 Aislamiento e Identificación de compuestos bioactivos.....	47
8. Conclusiones	52
9. Bibliografía.....	54

Anexos. Curvas de calibración	60
1.1 Curva de calibración del ácido gálico para contenido de fenoles totales.	60
1.2 Curva de calibración de TROLOX para ABTS.	60
1.3 Curva de calibración de TROLOX para DPPH.	61
1.4 Curva de calibración de ácido ascórbico.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de <i>Ardisia compressa</i>	1
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Ardisia compressa</i>	1
Figura 3. Estructura química de ardisin	2
Figura 4. Fruto acachul de <i>Ardisia compressa</i>	3
Figura 5. Proceso de elaboración del vino artesanal.....	6
Figura 6. Principales grupos de compuestos polifenólicos	13
Figura 7. <i>Escherichia coli</i>	18
Figura 8. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Figura 9. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	19
Figura 10. Esquema metodológico del proyecto.....	24
Figura 11. Reducción del DPPH, convirtiéndose en una especie no radicalaria	26
Figura 12. Reacción del ABTS ^{•+} en presencia de un antioxidante	27
Figura 13. Capacidad antioxidante en base al radical libre DPPH [•]	36
Figura 14. Capacidad antioxidante en base al radical libre ABTS ^{•+}	38
Figura 15. Contenido de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu.....	39
Figura 16. Contenido de ácido L-ascórbico de acuerdo al método calorimétrico de Dürüst.....	41
Figura 17. Porcentaje de actividad quelante en presencia de Fe ²⁺	43
Figura 18. Caja de Petri con siembra masiva de <i>Staphylococcus aureus</i>	44
Figura 19. Placa cromatográfica con 6 diferentes compuestos	47
Figura 20. Espectro de ¹ H de RMN del ardisin en CDCl ₃	48
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H del α-D-glucosa y β-D-glucosa en D ₂ O.....	50
Figura 22. Espectro de RMN de ¹³ C del α-D-glucosa y β-D-glucosa en D ₂ O	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del fruto acachul (<i>Ardisia compressa</i>).....	3
Tabla 2. Principales fitoquímicos en vinos de frutas y su bioactividad.....	8
Tabla 3. Grupos químicos con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas.....	16
Tabla 4. Controles positivos y su concentración utilizada en este ensayo.....	32
Tabla 5. Análisis químico proximal del fruto acachul	35
Tabla 6. Contenido de fenoles totales en diversos vinos y licores	40
Tabla 7. Actividad antimicrobiana del vino artesanal frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ABTS^{•+}	ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection)
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CHCl₃	Cloroformo
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
D₂O	Agua deuterada
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH[•]	1,1-difenil -2-picrilhidrazilo
EAA/L	Equivalentes de Ácido Ascórbico por Litro
EAG/L	Equivalentes de Ácido Gálico por Litro
ET/L	Equivalentes de Trolox por Litro
FeCl₃	Cloruro férrico
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
nm	nanómetros
ppm	partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
¹H	Protón
¹³C	Carbono-13

Resumen

El vino de uva ha sido considerado como una bebida con excelente capacidad antioxidante, de igual forma, se ha descrito actividad antimicrobiana debido a sus polifenoles. Actualmente también se producen vinos a partir de diversas frutas, uno de ellos es el vino de acachul (*Ardisia compressa*), una planta de la familia *Myrsinaceae*, que ha tenido diversos estudios y se considera como una especie con potente actividad antioxidante; sin embargo, no existe ningún estudio que demuestre las propiedades o efectos benéficos de estos vinos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la actividad antioxidante en base a los radicales libres DPPH[•] y ABTS^{•+}, contenido de fenoles totales, ácido ascórbico, porcentaje de actividad quelante; determinar la capacidad antimicrobiana e identificar compuestos bioactivos del vino artesanal e industrial de *Ardisia compressa*. Se observó que el vino artesanal presenta mejor capacidad antioxidante que el vino industrial mediante ambos métodos, siendo ABTS, el método por el cual se muestra la mayor actividad con 2896.67 ± 6.80 $\mu\text{mol ET/L}$ respecto al vino industrial con 1696.67 ± 11.70 $\mu\text{mol ET/L}$. De igual manera, el contenido de fenoles totales fue mayor en el vino artesanal (766.7 ± 2.50 mg EAG/L), contra el vino industrial (64 ± 1.50 mg EAG/L), mostrando una diferencia estadísticamente significativa entre ambos vinos ($p < 0.001$). El contenido de ácido ascórbico no mostró ninguna diferencia significativa: artesanal (200 ± 0.00 mg EAA/L) e industrial (191.66 ± 0.14 mg EAA/L). El porcentaje de actividad quelante para el vino artesanal fue mayor con 32 ± 2.56 % contra industrial de 26 ± 3.05 %. En cuanto a la determinación de actividad antimicrobiana, el vino industrial no presentó actividad frente a ninguno de los microorganismos de ensayo; sin embargo, el vino artesanal presentó actividad selectiva frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 1654, mostrando una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 60.6 $\mu\text{g/mL}$. La identificación de compuestos bioactivos mediante Resonancia Magnética Nuclear reveló la presencia de α y β glucosa, así como de un compuesto con potente actividad antioxidante y antitumoral, el ardisin.

Palabras clave: actividad antioxidante, *Ardisia compressa*, capacidad antimicrobiana, compuestos bioactivos, vino.

Abstract

Grape wine has been considered a drink with excellent antioxidant capacity, likewise, it described antimicrobial activity due to its high content of polyphenols. Currently, wines are produced from various fruits, one of them is the acachul wine (*Ardisia compressa*), a plant of the *Myrsinaceae* family, it has had several studies and has been considered as a specie with potent antioxidant activity. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antioxidant activity based on free radicals DPPH[•] and ABTS^{•+}, total phenolic content, ascorbic acid, chelating activity; determine the antimicrobial capacity and identify bioactive compounds of artisanal and industrial *Ardisia compressa* wines. It was noted that the artisanal wine has better antioxidant capacity than industrial wine by both methods, ABTS was the method by which most activity is shown with $2896.67 \pm 6.80 \mu\text{mol ET/L}$ compared to industrial wine $1696.67 \pm 11.70 \mu\text{mol ET/L}$. Similarly, the total phenol content was higher in the artisanal wine ($766.7 \pm 2.50 \text{ mg EAG/L}$), against industrial wine ($64 \pm 1.50 \text{ mg EAG/L}$), showing a statistically significant difference between the two wines ($p < 0.001$). The content of ascorbic acid showed no significant difference: artisanal ($200 \pm 0.00 \text{ mg EAA/L}$) and industrial ($191.66 \pm 0.14 \text{ mg EAA/L}$). The percentage of chelating activity for the artisanal wine was higher with $32 \pm 2.56\%$ versus $3.05 \pm$ industrial 26% . As for the determination of antimicrobial activity, industrial wine no activity against any of the test organisms; however, the artisanal wine presented selective activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 1654, showing a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 60.6 mg/mL . The identification of bioactive compounds by Nuclear Magnetic Resonance revealed the presence of α and β glucose and a compound with potent antioxidant activity, the ardisin.

Keywords: antimicrobial activity, antioxidant activity, *Ardisia compressa*, bioactive compounds, wines

1. Marco teórico

1.1 *Ardisia compressa*

Ardisia compressa es una planta de la familia *Myrsinaceae* que se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales de América (figura 1) (González de Mejía *et al.*, 2006). En México esta planta se desarrolla de manera silvestre en los municipios de Xicotepéc, Tlaxco, Zihuateutla, Tlacuilotepec y Jalpan, en el estado de Puebla. También se puede encontrar en los estados de Oaxaca, México y Veracruz (Vázquez *et al.*, 2012). En la figura 2 se muestra la distribución geográfica completa de esta especie.



Figura 1. Imagen de *Ardisia compressa*, presenta flores de un tono blanco rosado y frutas redondeadas.

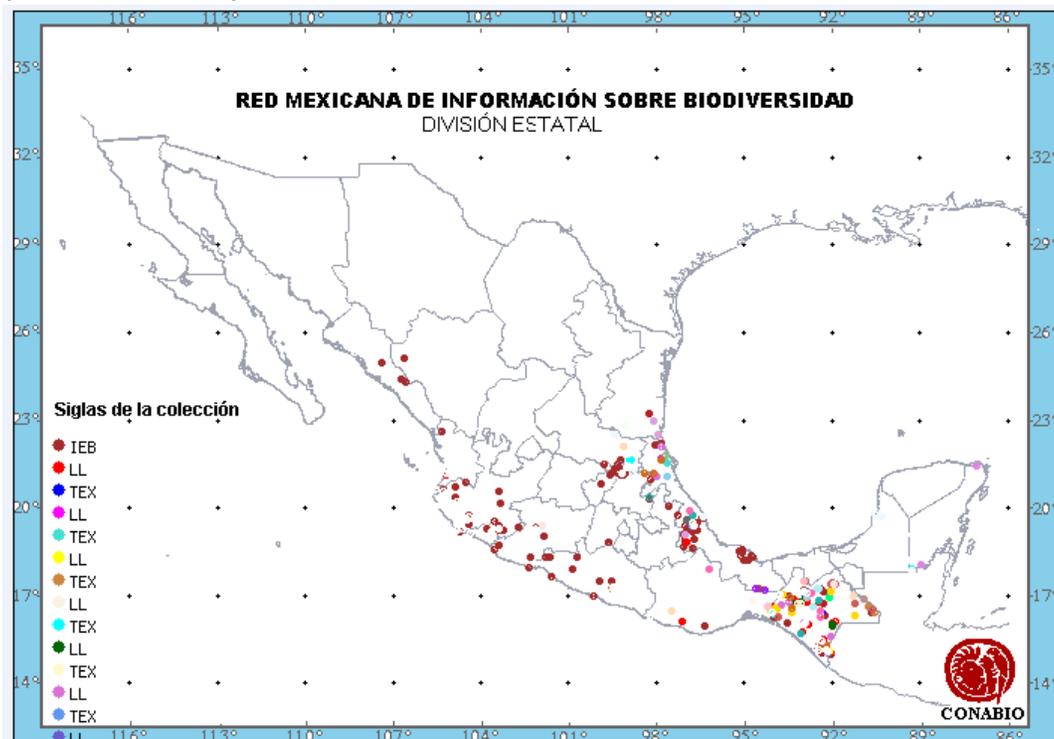


Figura 2. Distribución geográfica de *Ardisia compressa* en México.

Fuente: www.conabio.com.mx

Siglas de la colección: *IEB (Herbario del Instituto de ecología, México), *TEX (Herbario de la Universidad de Texas. EUA). *LL (Herbario Lundell. EUA).

Ardisia compressa crece en forma de arbustos o árboles pequeños de hasta de 7 m. Tiene hojas lanceoladas, oblongas o elípticas de 6 a 20 cm de largo, de 3 a 9 cm de ancho; pecíolos de 1 cm de largo, inflorescencia rojiza o púrpura en la base, de 5 a 15 cm de largo, generalmente con muchas flores; pétalos de 5 a 7 mm de largo, rojos. Presenta un fruto maduro algo globoso y de 6 a 8 mm de diámetro (Lascurain *et al.*, 2010).

Existen aproximadamente 500 especies de *Ardisia* en todo el mundo, y algunas especies como *A. japonica* y *A. compressa*, se han utilizado para el tratamiento del cáncer en la medicina tradicional. Mientras que *A. japonica* se utiliza en la medicina tradicional china para el tratamiento del cáncer de páncreas, *A. compressa* se utiliza en algunas regiones de América Latina, donde sus extractos de hoja se consumen en forma de té de hierbas para el tratamiento de algunas afecciones del hígado incluyendo el cáncer (González de Mejía *et al.*, 2006).

Diversos alquiflenoles han sido aislados de especies de *Ardisia*, y se sabe que algunos de ellos presentan propiedades contra el cáncer. Por ejemplo, el ardisin (figura 3), un alquifenol aislado originalmente de *A. japonica* y recientemente también encontrado en *A. compressa*, ha mostrado poseer actividad antioxidante y antitumoral en animales de experimentación con cáncer de hígado, además de ser un inhibidor potente de las topoisomerasas I y II (Kobayashi & de Mejía, 2004).

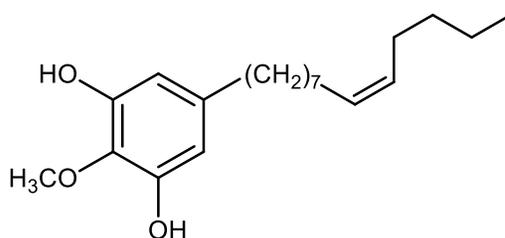


Figura 3. Estructura química de ardisin

1.2 Acachul: fruto de *Ardisia compressa*

El acachul es un fruto globoso comestible de color negro-púrpura, en México es conocido tradicionalmente también como chagalapoli, capulín de mayo, capulincillo, capulín de tejón, capulín silvestre y chico correoso (figura 4) (Vazquez *et al.*, 2012). El fruto se produce en un racimo y botánicamente se clasifica como una drupa.



Figura 4. Fruto acachul de *Ardisia compressa*

Los frutos son esféricos, con un diámetro de 0,8 a 1,5 cm, de color rojo oscuro a púrpura, tienen una semilla esférica y dura que está cubierta con una capa de textura áspera (Joaquín-Cruz *et al.*, 2015).

En la tabla 1 se muestra la composición mineral y proximal del fruto acachul. El potasio (K) y el azufre (S) son los minerales más abundantes, mientras que otros como zinc (Zn) y manganeso (Mn) se encuentran en cantidades más bajas (Joaquín-Cruz *et al.*, 2015).

Tabla 1. Composición química del fruto acachul (*Ardisia compressa*)

Composición	Porcentaje
<i>Humedad</i>	86.85 ± 0.49
<i>Ceniza*</i>	4.41 ± 0.005
<i>Extracto etéreo*</i>	4.10 ± 0.03
<i>Proteína*</i>	5.85 ± 0.01
<i>Fibra cruda*</i>	12.31 ± 0.02
<i>Hidratos de carbono*</i>	73.30 ± 0.24
Minerales	
<i>P</i>	0.3
<i>K</i>	3.28
<i>Ca</i>	0.41
<i>Mg</i>	0.35
<i>S</i>	2.01
<i>Fe</i>	0.034
<i>Zn</i>	0.0007
<i>Mn</i>	0.0024

Fuente modificada: Joaquín-Cruz *et al.*, (2015).

* Componentes expresados en base seca

Un estudio reciente ha demostrado que el fruto acachul posee mayor capacidad antioxidante ($44.88 \pm 4.47 \mu\text{mol ET/g}$) que algunos frutos como la fresa ($17.15 \pm 0.37 \mu\text{mol ET/g}$), la zarzamora ($16.01 \pm 0.51 \mu\text{mol ET/g}$) y el arándano ($12.90 \pm 3.17 \mu\text{mol ET/g}$) (Joaquín-Cruz *et al.*, 2015).

Esta frutilla es jugosa y presenta un sabor dulce con un toque ligeramente ácido. Debido a esto, en algunas zonas de cultivo, utilizan los frutos para la preparación de vinos, con un color rojo profundo, haciéndolos muy atractivos al público (Vazquez *et al.*, 2012).

1.3 Vino tradicional de uva

El vino de uva ha sido la bebida de mayor difusión en toda la historia y su consumo se ha perpetuado desde las más antiguas civilizaciones hasta nuestros días. La industria vinícola representa una de las actividades económicas más rentables e influyentes del mundo (Gonzalez, 2003).

El vino es el producto resultante de la fermentación alcohólica total o parcial del jugo de uvas maduras, con un contenido mínimo de 8.5% (v/v) de etanol. Este es por tanto, una mezcla hidroalcohólica. Los componentes más abundantes son el agua, que proviene de la uva y que se encuentra entorno al 80-85%, según el tipo de vino, y el etanol, que se encuentra normalmente en una proporción del 9 al 20% en volumen. Además del etanol, también se pueden encontrar otros alcoholes de origen fermentativo, entre los cuales el más abundante es la glicerina, que constituye el tercer compuesto en orden de importancia después del agua y el etanol (Moreno-Arribas, 2011).

1.3.1 Elaboración artesanal de vinos de frutas

Varias frutas tropicales, subtropicales y templadas, aunque difieren en forma, color, sabor y valores nutritivos, aportan numerosos beneficios para la salud. Algunos de los frutos comestibles maduran en un plazo muy corto. Muchos de los frutos se consumen frescos, pero grandes cantidades se desperdician durante los períodos de cosecha pico, debido a altas temperaturas y humedad, mal manejo de las cosechas,

deficientes instalaciones de almacenamiento e infecciones microbianas. Por lo tanto, la elaboración del vino de frutas, se considera como una alternativa para utilizar los excedentes y frutos maduros para la generación de ingresos adicionales para los productores de frutas (Umesh & Vishwas, 2015).

Como se mencionó anteriormente, el vino es definido, legal y tradicionalmente como el producto de la fermentación del jugo de uva, sin embargo, el vino de frutas se puede definir como aquel que proviene de la fermentación del jugo de una determinada fruta, principalmente de aquellas con aromas y sabores agradables e intensos (Gonzalez, 2003).

El vino de frutas, así como el vino tradicional de uvas, tiene su origen del proceso bioquímico de la fermentación alcohólica, el cual se produce por una oxidación de los azúcares contenidos en las frutas, acción que puede ser o no realizada en presencia de levaduras del género *Saccharomyces*, este proceso es anaerobio y posteriormente el vino se conserva en toneles o barriles de madera por varios meses para mejorar sus propiedades organolépticas (Barbado, 2005).

Se puede hacer vino de maracuyá, piña, guayaba, mango y en general de la mayoría de las frutas tropicales. Sin embargo, para hacer vino de fruta, deben considerarse ciertos atributos. El fruto debe ser jugoso para obtener así un buen rendimiento; debe ser lo suficientemente dulce para producir abundante alcohol; debe tener la acidez justa para asegurar el desarrollo de la levadura; y finalmente debe ser muy aromático (Gonzalez, 2003).

La fabricación artesanal emplea equipos poco tecnificados y generalmente de uso común. El componente habitual en una planta de vino artesanal, consiste en tanques de acero inoxidable para almacenamiento y fermentación, cuyos volúmenes oscilan entre 500 y 3000 litros (Barbado, 2005).

Los pequeños fabricantes sustituyen el tanque de acero inoxidable por varios botellones de vidrio, sin embargo, hacen el trabajo más laborioso, aunque cumplen la misma función y a menor costo (Gonzalez, 2003).

1.3.2 Vino de acachul

El proceso de elaboración del vino artesanal comienza con la colecta y lavado del fruto maduro, se hace una maceración, obteniendo así el jugo del fruto, se puede adicionar alcohol para acelerar el proceso de fermentación, azúcar o piloncillo, posteriormente se hace una filtración y finalmente es envasado en botellas de vidrio. El tiempo de fermentación es más lento en comparación con los vinos de preparación industrial, ya que no se utiliza ninguna levadura, este puede durar de 6 meses a 1 año. Al término de la fermentación, el vino obtiene un sabor dulce y muy agradable al paladar, es una bebida de baja graduación, ya que, puede contener solo 10 grados de alcohol (Vazquez *et al.*, 2012). En la figura 5 se muestra el proceso de elaboración del vino artesanal que utilizan los productores en Jalpan, Puebla.

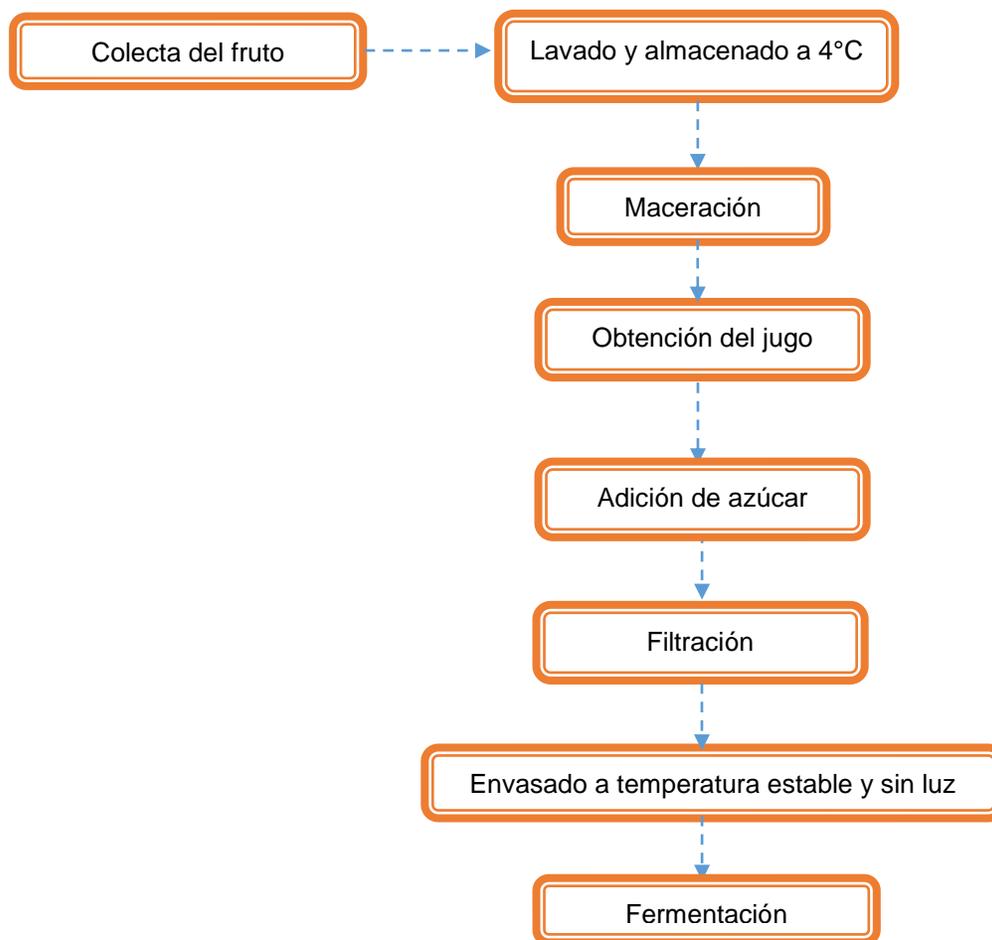


Figura 5. Proceso de elaboración del vino artesanal

El vino industrial de acachul se diferencia del vino artesanal en el proceso de fermentación. El jugo de fruta (mosto), es sometido a la acción fermentadora de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En este proceso se obtienen como productos: alcohol (etanol), dióxido de carbono y los componentes característicos del vino. La graduación alcohólica de estos vinos es de 12 grados. Al término de la fermentación, se hace una clarificación, con la finalidad de eliminar aquellas partículas que ocasionan cierta turbidez al vino como bacterias y levaduras, se utilizan clarificantes de origen orgánico, en especial la clara de huevo, en donde actúa la albumina, ésta forma complejos coloidales que floculan y arrastran las partículas suspendidas. Posteriormente el vino clarificado es sometido a una filtración para alcanzar una mejor brillantez. Finalmente el vino es embotellado, pasteurizado y etiquetado de forma manual (Vázquez *et al.*, 2012).

1.3.3 Vino y salud

El vino, además de su contenido de alcohol, también está formado por compuestos bioactivos, entre los que se encuentran los polifenoles (Moreno-Arribas, 2011).

Los franceses, a pesar de ser grandes consumidores de grasas saturadas, tienen una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares que otros países desarrollados como Finlandia, Alemania, Reino Unido o Estados Unidos. La clave de esta aparente contradicción se debe a la costumbre de beber vino tinto de forma regular. Así, se ha demostrado que el consumo de unos 200 mL de vino al día, ayuda a reducir el riesgo cardiovascular, y esto se atribuye, en parte, a la presencia de algunos compuestos polifenólicos como el resveratrol (Gimeno, 2004).

La capacidad antioxidante del vino está directamente relacionada con su contenido en polifenoles. El tipo de polifenoles determina en último término su capacidad antioxidante y su concentración cambia según su variedad, área de producción, técnicas agrarias, proceso de vinificación, vendimia, año y edad (Moreno-Arribas, 2011).

La contribución de cada compuesto en particular depende no sólo de su concentración y de su capacidad antioxidante sino que también de su interacción con otros componentes. Estudios *in vitro* demuestran el efecto protector del vino sobre la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo que podría explicar su efecto *in vivo*. Claramente el consumo moderado y regular de vino tinto previene el daño oxidativo al ADN, inducido por una dieta rica en grasas, y confiere protección adicional combinado con una dieta rica en frutas y verduras (Avello & Suwalsky, 2006).

Sin embargo, no solo al vino tradicional de uva se le confieren efectos benéficos a la salud, diversos estudios han demostrado que los vinos fabricados a partir de otros frutos también poseen propiedades antioxidantes (Umesh & Vishwas, 2015). En la tabla 2 se muestran algunos compuestos bioactivos presentes en los vinos de frutas.

Tabla 2. Principales fitoquímicos presentes en vinos de frutas y su bioactividad.

Fuente del vino	Fitoquímicos	Bioactividad
<i>arándano</i>	Kaempferol, ácido ferúlico, ácido gálico.	Inhibición de α -glucosidasa y capacidad antioxidante.
<i>frambuesa</i>	Ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, ácido elágico	Capacidad antioxidante, antiproliferativa y antitumoral
<i>granada</i>	Melatonina	Regulación del metabolismo óseo y capacidad antioxidante
<i>mango</i>	Carotenoides	Capacidad antioxidante
<i>naranja</i>	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, flavanonas	Capacidad antioxidante

Fuente: Umesh & Vishwas (2015).

Los vinos hechos a base de grosella negra, arándano, frambuesa y granada han demostrado actividad antioxidante comparable con el α -tocoferol. Estos vinos contienen compuestos fenólicos capaces de proteger la oxidación de los lípidos, así como beneficios potenciales contra la formación de especies reactivas de oxígeno, principales responsables del daño celular (Heinonen *et al.*, 1998).

1.4 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

El oxígeno molecular (O_2), que se encuentra en el aire que respiramos, al ser utilizado por los organismos aerobios da lugar a la formación de las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) (Roche & Romero, 1994). Las ERO son producidas por organismos vivos como resultado del metabolismo celular normal. De bajas a moderadas concentraciones, funcionan en procesos celulares fisiológicos, pero en altas concentraciones, producen modificaciones adversas a los componentes celulares, tales como lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN) (Birben *et al.*, 2012).

La reducción de O_2 se produce a través de los electrones que escapan de la cadena respiratoria, dando origen al súper óxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual puede dismutar fácilmente y formar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que en presencia de metales de transición como el hierro (Fe^{2+}) y el cobre (Cu^+), se produce el radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), que es considerado la especie oxidante más dañina en los sistemas biológicos y el principal responsable del daño oxidativo (Roche & Romero, 1994).

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función de cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto, se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos (Venereo-Gutiérrez, 2002).

1.5 Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicalarias, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes pro-oxidantes (Venereo-Gutiérrez, 2002).

Dentro de las especies radicalarias de mayor interés desde el punto de vista biológico están: el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que se forma a partir de una molécula de oxígeno en presencia de una cantidad de energía suficiente que le permite adquirir un electrón suplementario, su reactividad es débil, pero puede penetrar las membranas biológicas y causar daño a blancos específicos. El radical hidroxilo ($\bullet OH$), tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas y se considera la especie más reactiva. El óxido nítrico ($\bullet NO$), es un gas incoloro que puede interactuar con el $O_2^{\bullet-}$, en una reacción radical-radical para generar el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) y este puede ejercer su toxicidad directamente sobre las células. Finalmente el radical dióxido de nitrógeno ($\bullet NO_2$), es un agente nitrante con capacidad de formar nitrosaminas potencialmente carcinogénicas (Martínez., 2005).

Las especies no radicalarias de mayor interés biológico son: el ácido hipocloroso ($HOCl$), el cual se considera un potente agente oxidante formado por los neutrófilos activados en los sitios de inflamación, por la acción de la enzima mieloperoxidasa (MPO). Este agente reacciona con los grupos $-SH$ y aminos proteicos, y puede clorinar las bases purínicas del ADN. También se encuentra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es poco reactivo a bajas concentraciones, sin embargo, altas concentraciones pueden interactuar con los sistemas de generación de energía de las células e inactivarlas (Carocho & Ferreira, 2013). Frente a estas especies existe un sistema de defensa en donde actúan los antioxidantes (Venereo-Gutiérrez, 2002).

1.6 Antioxidantes

El concepto de antioxidante biológico se refiere a cualquier compuesto que, cuando está presente en una concentración inferior en comparación con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación del sustrato. Las funciones antioxidantes implican la reducción del estrés oxidativo, mutaciones de ADN, transformaciones malignas, así como otros parámetros de daño celular (Pisoschi & Pop, 2015).

Los antioxidantes son una defensa crucial contra el daño inducido por radicales libres, y son fundamentales para mantener la salud y el bienestar óptimo (Sen & Chakraborty, 2011). Los antioxidantes pueden contrarrestar la acción de los radicales libres por varios mecanismos. Estos mecanismos incluyen: (1) enzimas que degradan los radicales libres: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, (2) proteínas tales como transferrina, que se puede unir a metales que estimulan la producción de radicales libres, y (3) antioxidantes como las vitaminas C y E que actúan como captadores de radicales libres (Rahim *et al.*, 2005). Los antioxidantes se clasifican en dos principales categorías: primarios y secundarios.

1.6.1 Antioxidantes primarios

Los antioxidantes primarios son aquellos que reaccionan con las ERO, esto se consigue convirtiendo las ERO en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas. Ejemplos de ellos son enzimas como: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (Monroy-Vázquez *et al.*, 2007).

- Las SOD son un grupo de metaloenzimas que catalizan la conversión de $O_2^{\cdot-}$, a H_2O_2 y O_2 (Cemeli & Baumgartner, 2009).
- El GPx está ampliamente distribuida en los tejidos humanos y animales. Su forma reducida glutatióna (GSH) dona electrones y se encuentra a concentraciones intracelulares a menudo en el rango milimolar. Las GPx son

consideradas enzimas con la mayor capacidad de remover peróxidos encontrados en el tejido humano (Cemeli & Baumgartner, 2009).

- La catalasa es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos aerobios. Bajo condiciones de sobreproducción puede asumir el papel preponderante en la eliminación del H_2O_2 , ésta cataliza la reducción de H_2O_2 a O_2 y H_2O (Díaz, 2003)

1.6.2 Antioxidantes secundarios

Los antioxidantes secundarios actúan debido a numerosos mecanismos, reduciendo la velocidad de oxidación de lípidos por varias acciones, pero sin estabilizar a las ERO. También pueden desactivar metales pesados pro-oxidantes o ceder hidrógeno a los antioxidantes primarios provocando regeneración. Ejemplos de ellos son la vitamina C y E (Monroy-Vázquez *et al.*, 2007).

- La vitamina C, presenta muchas actividades biológicas en el cuerpo humano; se ha encontrado que esta puede reducir los niveles de proteína C-reactiva, un marcador de la inflamación que puede ser usado para determinar el riesgo de padecer un infarto agudo al miocardio (Podsdek, 2005).
- La vitamina E pertenece a los antioxidantes liposolubles, su actividad biológica incluye tocoferoles, tocotrienoles, especialmente α -tocoferol. La reacción predominante responsable de la actividad antioxidante del tocoferol es la donación de átomos de hidrógeno, donde se forma el radical tocoperoxil (Podsdek, 2005).

1.7 Compuestos polifenólicos

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos, estos compuestos se denominan polifenoles y se les confiere también un poder antioxidante. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos (Quiñones, 2012). Los principales grupos de polifenoles se muestran en la figura 6.

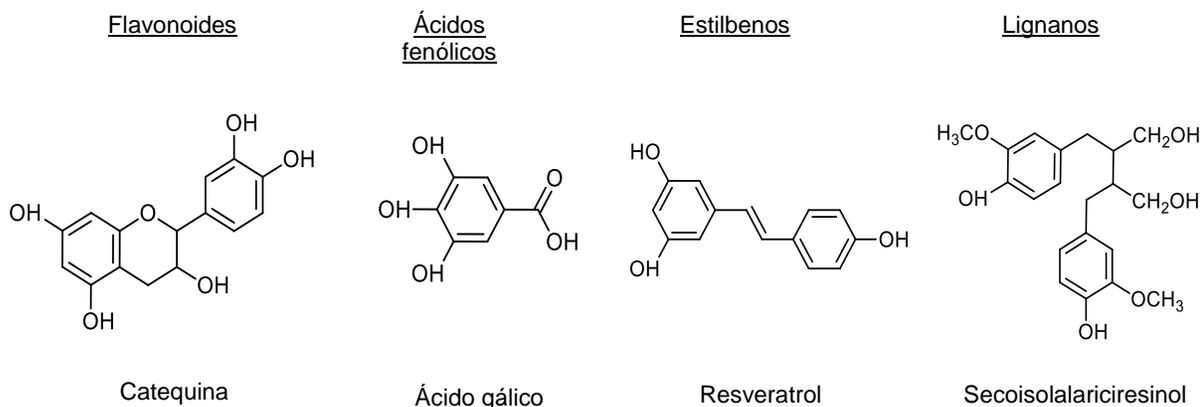


Figura 6. Principales grupos de compuestos polifenólicos.

Existen numerosas evidencias epidemiológicas, estudios *in vitro* e *in vivo*, indican que estos compuestos proporcionan un beneficio al organismo contra diversas enfermedades. Entre las propiedades benéficas de los polifenoles están la protección contra lesiones celulares y subcelulares, inhibición del crecimiento de tumores, activación de los sistemas de detoxificación hepáticos y bloqueo de las vías metabólicas que pueden ocasionar carcinogénesis (Mercado-Mercado *et al.*, 2013). Algunos polifenoles especialmente los flavonoides, muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas (Kuskoski *et al.*, 2005).

1.7.1 Compuestos polifenólicos con actividad antioxidante en vinos

La concentración de compuestos polifenólicos del vino varía entre 1.80 y 1.06 g/L, con un promedio de 2.57 g/L para el vino tinto y entre 0.16 y 0.30 g/L para el blanco. Sin embargo, la concentración y variedad de los compuestos fenólicos en el vino depende de numerosos factores: clima y terreno, una cosecha temprana o tardía, los diferentes procedimientos del procesado de la uva y del tiempo de fermentación del mosto. Los compuestos fenólicos del vino incluyen, entre otros, a los ácidos fenólicos (cumarínico, cinámico, cafeico, gentísico, ferúlico y vanílico) y flavonoides (catequinas, quercetina y resveratrol), los que son sintetizados por una vía metabólica común a partir de la fenilalanina (Gutiérrez-Maydata, 2002).

Se ha planteado que la propiedad cardioprotectora del vino tinto radica en la acción de sus polifenoles más investigados, que son el resveratrol y la quercetina, con propiedades antioxidantes más potentes que el alfa tocoferol (Palmieri & Manreli, 1999).

El resveratrol es una fitoalexina con varias propiedades biológicas y farmacológicas, y del que depende el color característico del vino. *In vitro* el resveratrol ha mostrado ser un fuerte antioxidante, un fitoestrógeno, un inhibidor de la tumorigénesis, un vasorelajador, un inhibidor de la agregación plaquetaria, un inhibidor de la ciclooxigenasa y de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. *In vivo* también se ha comprobado el efecto antioxidante del resveratrol con LDL de mujeres posmenopáusicas y un efecto como antiagregante plaquetario en conejos hipercolesterolémicos y voluntarios humanos sanos (Palmieri & Manreli, 1999).

Por otro lado, algunos estudios epidemiológicos han puntualizado la función crucial del flavonoide quercetina en la prevención de enfermedades cardiovasculares dada su capacidad antioxidante. La quercetina actúa como protector frente a las especies reactivas de oxígeno, mediante la neutralización de radicales libres como aniones superóxido, óxido nítrico y peroxinitritos entre otros. El efecto antioxidante también podría deberse a su capacidad para inhibir enzimas como la xantina oxidasa, lipooxigenasa y NADPH oxidasa, impidiendo la muerte celular (Vicente *et al.*, 2013).

A los polifenoles presentes en los vinos también se les atribuyen propiedades termogénicas, antiinflamatorias, antitrombóticas, vasodilatadoras, antialérgicas, antivirales y antimicrobianas (Kuskoski *et al.*, 2005).

1.8 Importancia de los antimicrobianos

Los antimicrobianos constituyen la base fundamental del tratamiento de las enfermedades infecciosas. La utilización de la penicilina y otros antibióticos a partir de los años cuarenta fue uno de los logros más importantes de ese siglo. Desde entonces se han obtenido, comercializado y utilizado una gran cantidad de antimicrobianos (Daza-Pérez, 1998).

Los antimicrobianos de uso clínico ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas: inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplasmática, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando las funciones de los ácidos nucleicos. Existen también otros antimicrobianos cuya función es proteger otros compuestos de las enzimas hidrolíticas bacterianas, como es el caso de los inhibidores de β -lactamasas (Calvo & Martínez-Martínez, 2008).

De igual manera la utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como alternativa. El reino vegetal ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles y aplicables en las enfermedades producidas por microorganismos. Las plantas tienen la capacidad de sintetizar compuestos, la mayoría relacionadas con el fenol y sus derivados (Domingo & López-Brea, 2003). En la tabla 3 se muestran los principales compuestos con actividad antimicrobiana generados por plantas.

Tabla 3. Grupos químicos con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas

Grupo químico	Compuesto	Planta	Actividad
<i>Fenoles simples</i>	Timol	<i>Thymus officianalis</i> (tomillo).	General
	Ácido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	<i>S. aureus</i>
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Quinonas</i>	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	VIH
<i>Taninos</i>		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Bacterias
		<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	Virus
<i>Cumarinas</i>		<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Virus
<i>Flavonas</i>	Catequina	<i>Camellia sinesis</i>	<i>Shigella</i>
	Isoflavona	<i>Millettia thonningii</i>	<i>Shistosoma</i>
	Quercetina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	
<i>Alcaloides</i>	Coca	<i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Cocos gram(+)
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, <i>Lactobacillus</i>

Fuente: Domingo & López-Brea (2003).

Los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo de los polifenoles parece estar directamente relacionado con la toxicidad frente a los microorganismos. El mecanismo puede estar relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas (Calvo & Martínez-Martínez, 2008).

1.8.1 Actividad antimicrobiana en vinos

Se han reportado propiedades bactericidas o bacteriostáticas en el vino, frente a microorganismos patógenos que producen alteraciones fisiológicas y se desarrollan ocasionalmente, en el aparato digestivo, de manera particular, en el intestino (García-Ruiz, 2009).

La catequina es un antioxidante polifenólico que procede de las plantas en las cuales aparece como un metabolito secundario. Se ha visto que la catequina entre otros compuestos fenólicos afectan en el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, aunque el mecanismo no está completamente estudiado (García-Ruiz, 2009). La catequina es el compuesto fenólico más abundante en el vino tinto (120-390 mg/L); en el vino blanco varía entre 16 y 46 mg/L (Frankel, 1995).

El ácido gálico es un ácido orgánico que se encuentra en las hojas y corteza del roble entre otras plantas. El ácido gálico tiene propiedades antivíricas y antifúngicas, además actúa como antioxidante y protector de las células contra los oxidantes (Simonetti & Santamaria, 2014). El ácido gálico es uno de los compuestos monoméricos más abundantes en el vino tinto (65-126 mg/L). Sin embargo, en el vino blanco varía entre 4-11 mg/L (Frankel, 1995; Heinonen *et al.*, 1998).

Los taninos tienen un ligero olor característico, sabor amargo y astringente, y su color va desde el amarillo hasta el castaño oscuro. Químicamente son metabolitos secundarios de las plantas, fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol ni solventes orgánicos. Los taninos se utilizan en el curtido porque reaccionan con las proteínas de colágeno presente en las pieles de los animales, uniéndolas entre sí, de esta forma aumenta la resistencia de la piel al calor, a la putrefacción por agua, y al ataque por microorganismos patógenos (Frankel, 1995).

También se ha estudiado la actividad antimicrobiana *in vitro* del resveratrol frente a diferentes microorganismos, en donde se muestra actividad frente al virus del herpes simple y frente a hongos dermatófitos como *Trichophyton mentagrophytes*, *T. tonsaurans*, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporum gypseum*. En cuanto a las bacterias su CMI es alta para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomona aeruginosa*; sin embargo es sensiblemente menor para *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*. De igual forma presenta actividad frente a *Helicobacter pylori* (Domingo & López-Brea, 2003). Algunos de estos microorganismos se describen a continuación.

1.8.2 Características generales de microorganismos patógenos

1.8.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae (figura 7). Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.

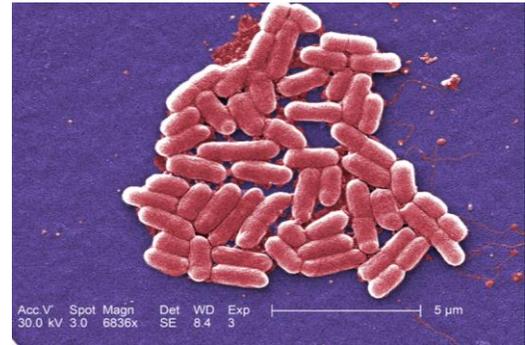


Figura 7. *Escherichia coli*

Las *E. coli* patógenas se caracterizan de acuerdo con el tipo de síntomas clínicos que producen. La patogenicidad es determinada por su genoma. Las *E. coli* fácilmente pueden intercambiar genes y generar variaciones de enfermedades (Rodríguez-Angeles, 2002).

E. coli se puede transmitir a través de la contaminación fecal por medio de los alimentos y el agua, así como también a través de la contaminación cruzada o por contacto humano directo durante la preparación de los alimentos. Mientras tanto, la principal vía de exposición pareciera ser el consumo de alimentos contaminados, como carne molida cruda o mal cocida, leche cruda y productos frescos (Calvo & Martínez-Martínez, 2008).

1.8.2.2 *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* está formado por cocos gram positivos, agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Bajo condiciones normales, *S. aureus* (figura 8), no produce infecciones, esto sólo ocurre en pacientes, inmunocomprometidos, es decir, la persistencia de la bacteria en el huésped conlleva a riesgos de enfermedad. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro como infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del

sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y el síndrome de choque tóxico, así como infecciones gastrointestinales (Cervantes-García *et al.*, 2014).



Figura 8. *Staphylococcus aureus*

Sin embargo, una higiene deficiente puede ocasionar una contaminación en los alimentos. La enfermedad transmitida por alimentos, resulta de la ingestión de enterotoxinas termoestables preformadas por una cepa toxigénica de *S. aureus* que contaminó y desarrolló en el alimento. Entre los alimentos implicados en esta contaminación se encuentran las ensaladas de papas, huevos, jamón y pollo (Dinges & Orwin, 2000).

1.8.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Es una bacteria gram negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. *P. aeruginosa* (figura 9) puede colonizar partes del cuerpo humano aunque la prevalencia de esta colonización en personas saludables es baja (Luján-Roca, 2014). Sin embargo los seres humanos estamos en contacto diariamente con *P. aeruginosa*, ya que se encuentra en bajas cantidades en nuestros alimentos. Se han obtenido aislamientos de esta bacteria de entre el 2 y el 8% de las heces de personas sanas (Hardalo, 1997).



Figura 9. *Pseudomonas aeruginosa*

En su gran mayoría, las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* están relacionadas al ambiente hospitalario, constituyendo un grave problema clínico. *P. aeruginosa* infecta pulmones y vías respiratorias, vías urinarias, tejidos (heridas), entre otras sepsis (Luján-Roca, 2014).

1.8.3 Microbiota intestinal

La microbiota intestinal constituye un complejo ecosistema integrado por más de 400 especies bacterianas. La microbiota comienza a adquirirse después del nacimiento, y tanto la velocidad de colonización como el tipo de microorganismos tienen gran repercusión en el desarrollo del sistema inmune, la regulación de la permeabilidad y el mantenimiento del equilibrio intestinal. Dicho proceso se considera determinante de la susceptibilidad a las infecciones microbianas (Sanz & Collado, 2006). El consumo de fitoquímicos y sus productos derivados ejerce efectos significativos sobre el ambiente intestinal y la modulación en la composición de la microbiota intestinal (Queipo-Ortuño & Boto-Ordoñez, 2012).

Aproximadamente un 90-95 % de los polifenoles ingeridos en la dieta no se absorben y llegan intactos al colon, lugar donde son metabolizados por las bacterias allí presentes, dando lugar a metabolitos que pueden ser más activos fisiológicamente que los propios polifenoles. Existen evidencias científicas de que estos polifenoles presentes en el vino pueden modular la microbiota intestinal. Tal es el caso de la inhibición por algunos flavonoides presentes en el vino y algunos de sus metabolitos microbianos frente a especies bacterianas patógenas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y el hongo *Candida albicans*, entre otros (Queipo-Ortuño & Boto-Ordoñez, 2012). Debido a esto se considera a *E. coli* y *S. aureus* bacterias importantes para el desarrollo de éste estudio, ya que estas bacterias colonizan la microbiota intestinal, siendo *E.coli* la más abundante, aunque *P. aeruginosa* es una bacteria relacionada principalmente en el ambiente hospitalario, también se ha encontrado en bajo porcentaje en personas sanas y esto da lugar a las distintas enfermedades ocasionadas por microorganismos, las cuales fueron descritas anteriormente.

2. Planteamiento del problema

Se han documentado diversos estudios de algunas de las 500 especies que comprende el género de *Ardisia*, entre ellas *Ardisia compressa*, sin embargo, las investigaciones se han concentrado en la parte aérea de la planta, describiendo algunos de sus compuestos biológicamente activos, como el ardisin, el cual posee propiedades antioxidantes y antitumorales.

Las investigaciones sobre el fruto acachul aún son muy escasas. Actualmente solo se han descrito algunos de sus compuestos bioactivos, principalmente flavonoides, así como la presencia de propiedades antioxidantes. Esta fruta posee un aroma, sabor y color atractivo que ha sido base para la producción de vinos artesanales e industriales en México.

El vino tradicional de uva posee diversos beneficios a la salud y esto se relaciona con su elevado contenido de polifenoles, que además de poseer capacidad antioxidante, también presenta un efecto antimicrobiano, sin embargo, no solo al vino de uva se le confieren tales propiedades. Existen otros vinos elaborados a partir de diversas bayas y frutos, en los cuales también se han encontrado algunos beneficios. En la actualidad no se conoce evidencia científica de las propiedades que pueda contener el vino producido a partir del fruto de *A. compressa*, debido a esto se considera como una fuente importante de estudio, ya que es la forma en la que mayormente se consume y conoce a esta fruta.

3. Justificación

El estrés oxidativo está directamente ligado con la iniciación y el desarrollo de diversas enfermedades tales como la aterosclerosis, cáncer, enfermedades del sistema nervioso central, entre otras. Vinculado a esto, se encuentra la generación de radicales libres que provocan un daño celular directo. Por otro lado, se conoce que la mortalidad por enfermedades infecciosas ha disminuido en nuestro país, sin embargo, existen microorganismos patógenos que continuamente modifican su estructura genética para generar resistencia a diversos antimicrobianos.

Por tal motivo, se busca contribuir en el estudio de productos alimenticios con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, así como de principios biológicamente activos, utilizando los vinos de *Ardisia compressa* como objeto de estudio, ya que el fruto de ésta especie recientemente ha sido investigado y se demuestra que posee mayor actividad antioxidante que algunos frutos como la fresa, la zarzamora y el arándano.

De esta forma otorgarle un valor agregado al fruto y dar a conocer los beneficios a la salud que poseen los vinos de acachul, además la elaboración de estos vinos, se considera como una alternativa en la conservación de alimentos ya que grandes cantidades del fruto se desperdician durante los períodos de cosecha pico.

4. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y capacidad antimicrobiana, así como identificar los compuestos bioactivos presentes en los vinos artesanal e industrial de *Ardisia compressa* mediante métodos químicos, físicos y espectroscópicos para la valorización de tales productos.

4.1 Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antioxidante presente en el vino artesanal e industrial en base a los radicales libres ABTS^{•+} y DPPH[•].
2. Establecer el contenido de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu, contenido de ácido ascórbico basado en el método calorimétrico de Dürüst y realizar un ensayo de actividad quelante.
3. Determinar la capacidad antimicrobiana mediante el método de difusión Kirby-Bauer.
4. Extraer y purificar los compuestos bioactivos presentes en los vinos e identificarlos por medio de Resonancia Magnética Nuclear de protón (¹H) y carbono 13 (¹³C).

5. Metodología

La metodología empleada para el desarrollo de este proyecto se muestra en la figura 10. Se comenzó con la colecta y la realización del análisis químico proximal del fruto acachul de *Ardisia compressa*, posteriormente se obtuvieron los vinos artesanal e industrial los cuales fueron liofilizados. Se hizo una evaluación de la actividad antioxidante mediante DPPH[•] y ABTS^{•+}, así como un ensayo de actividad quelante, de igual manera se determinó el contenido de fenoles totales y ácido ascórbico. También se evaluó la capacidad antimicrobiana mediante el método de difusión Kirby-Bauer. Finalmente se hizo una extracción, purificación e identificación de los compuestos bioactivos presentes mediante cromatografía y espectroscopia.

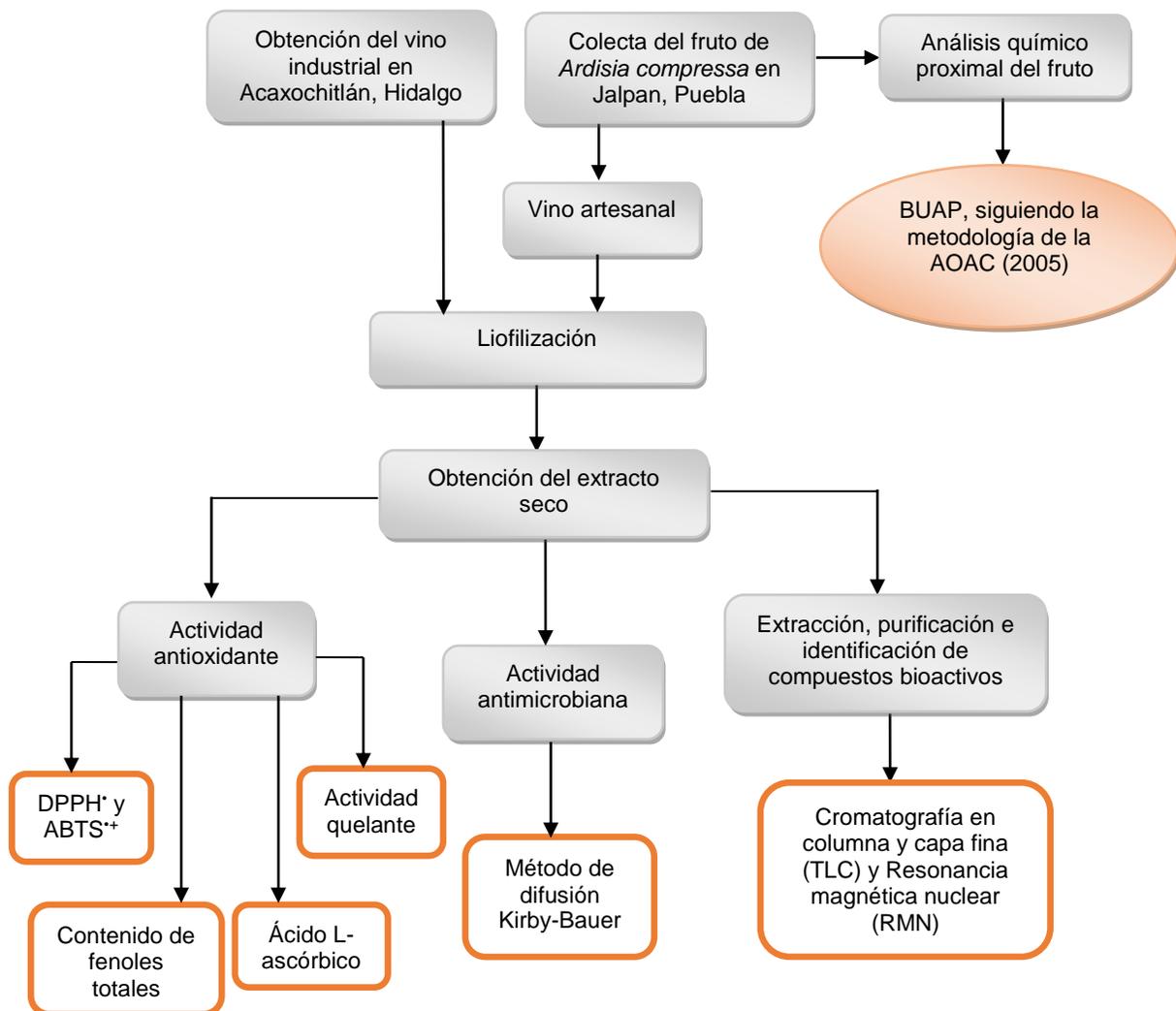


Figura 10. Esquema metodológico del proyecto.

5.1 Obtención de las muestras

El fruto acachul (*Ardisia compressa*) fue colectado en un huerto del municipio de Jalpan, estado de Puebla; después de ser cortado fue lavado y almacenado a 4° C. El vino artesanal fue donado por una familia que produce el vino sin comercializarlo en esta misma zona. El vino industrial se compró en el municipio de Acaxochitlán en el estado de Hidalgo.

5.2 Análisis químico proximal del fruto

El análisis químico proximal fue realizado en el departamento de alimentos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), por la Dra. María Elena Ramos Cassellis; se evaluaron 100 g de muestra seca, los parámetros se determinaron de acuerdo a la metodología estandarizada por la AOAC (2005), se determinó el porcentaje de humedad (método 925.09), porcentaje de proteína (método 991.20), extracto etéreo (método 930.39), cenizas (método 923.03) y fibra dietética (método 985.29). Los hidratos de carbono fueron calculados por diferencia.

5.3 Liofilización de los vinos

El vino artesanal (750 mL) y el vino industrial (1 L), se concentraron en un rotavapor (Büchi Labortechnik AG R-200, Suiza), para retirar agua y alcohol disponible, esto a una temperatura de 60 °C hasta lograr la concentración de las muestras. Posteriormente se depositaron en bolsas herméticas y se sometieron a ultracongelación a una temperatura de -76°C. Una vez congeladas las muestras se colocaron en jarras de vidrio y se conectaron al liofilizador (LABCONCO VWR26671-58) a una presión de 0.040 mBar y una temperatura de -52 °C, durante 4 días.

5.4 Pruebas de actividad antioxidante

5.4.1 Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

El ensayo de DPPH se utiliza para evaluar el potencial de captación de radicales libres de una molécula antioxidante. Este ensayo se basa en el principio de que el DPPH[•] al aceptar un átomo de hidrógeno (H) de la molécula antioxidante, resulta una reducción del DPPH[•] a DPPH² (figura 11), en el cual se presentan cambios de color púrpura a amarillo (Sharma & Bath, 2008).

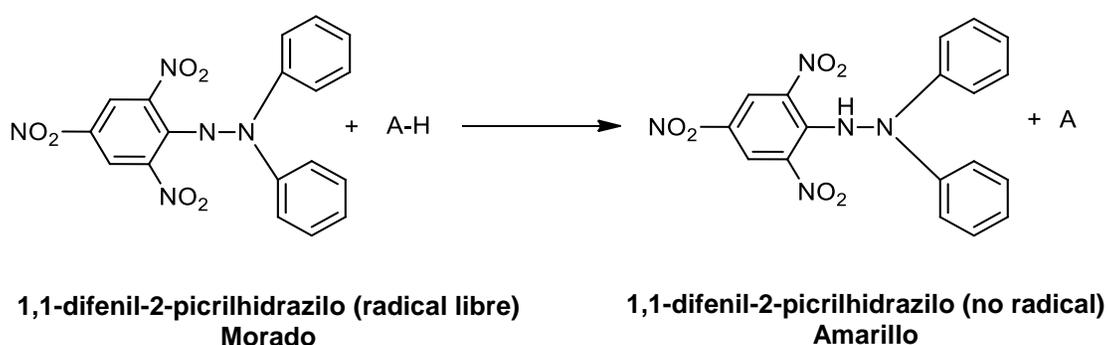


Figura 11. Reducción del DPPH[•], convirtiéndose en una especie no radicalaria.

Esta determinación se realizó de acuerdo al método descrito por Sharma & Bath, (2008) con modificaciones. Para este ensayo se prepararon en matraces aforados las siguientes soluciones diluidas en etanol absoluto: el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH[•]) a una concentración de 0.074 mg/mL, como antioxidante de referencia se utilizó Trolox a una concentración de 0.075 mg/mL, ambas soluciones se transfirieron en vasos de precipitado cubiertos con papel aluminio para evitar su rápida degradación

Se realizó una curva estándar del antioxidante de referencia (anexo 1.3) a diferentes concentraciones adicionando etanol como diluyente: 0, 50, 100 y 200 $\mu\text{mol ET/L}$, se obtuvo una ecuación de correlación con la cual se determinó su correspondiente equivalencia en Trolox.

Se realizaron las pruebas de dilución para analizar las muestras de acuerdo a la curva de calibración, una vez elegida la dilución, se colocaron las muestras en microtubos (1.5 mL) y se adicionaron 500 μL del radical DPPH $^{\bullet}$, las muestras se dejaron reposar 1 hora y se leyó la absorbancia a 520 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS [BioTek]. Software KC Junior, USA), utilizando etanol como blanco de referencia. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados fueron expresados en μmol Equivalentes de Trolox por litro (μmol ET/L).

5.4.2 Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS

La generación del radical catión ABTS $^{\bullet+}$, implica la producción directa del cromóforo ABTS $^{\bullet+}$ verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS (figura 12) (Zulueta *et al.*, 2008).

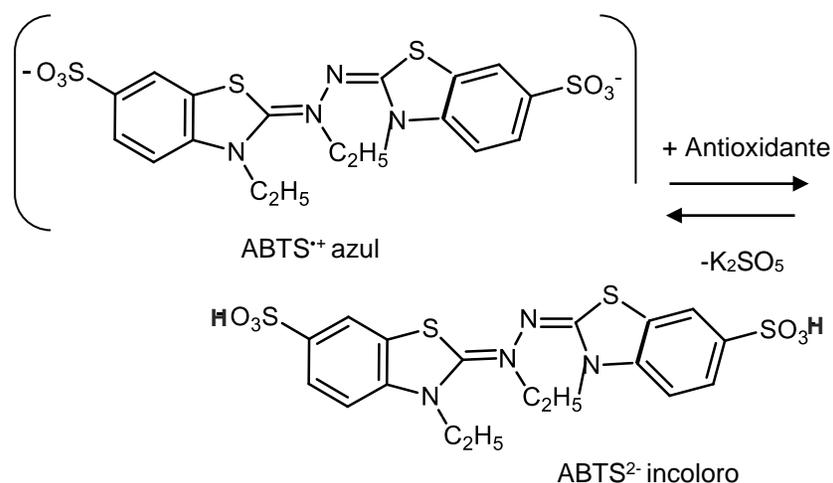


Figura 12. Reacción del ABTS $^{\bullet+}$ en presencia de un antioxidante.

Esta determinación se realizó de acuerdo al método descrito por Kuskoski *et al.*, (2005). Se prepararon las siguientes soluciones diluidas en agua desionizada: el reactivo ABTS $^{\bullet+}$ a una concentración de 3.89 mg/mL, la solución de persulfato de potasio a 0.66 mg/mL. Ambas soluciones fueron homogeneizadas y la mezcla se dejó reposar 16 horas, en un vaso de precipitado con papel aluminio y a temperatura

ambiente. Listo el concentrado del radical, se diluyó la solución de ABTS^{•+} en etanol absoluto hasta obtener una absorbancia inicial de $0.7 \pm (0.01)$ a 754 nm.

Se realizó una curva estándar utilizando Trolox como antioxidante de referencia (anexo 1.2) a diferentes concentraciones usando etanol absoluto como diluyente: 0, 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{mol ET/L}$ y se obtuvo la ecuación de correlación con la cual se determinó su correspondiente equivalencia en Trolox.

Se realizaron las pruebas de dilución para analizar las muestras de acuerdo a la curva de calibración, una vez elegida la dilución, se colocaron las muestras en microtubos (1.5 mL) y se adicionaron 980 μL del radical ABTS^{•+}, las muestras se dejaron reposar 7 minutos, se leyó la absorbancia a 754 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS [BioTek]. Software KC Junior, USA), se manejó etanol como blanco de referencia.

El ensayo se realizó por triplicado y los resultados fueron expresados en μmol Equivalentes de Trolox por litro ($\mu\text{mol ET/L}$).

5.5 Contenido de fenoles totales

El método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu, para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado debido a que la determinación es cuantitativa (Kuskoski *et al.*, 2005). El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico, la transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Este ensayo se determinó mediante el método espectrofotométrico de Gutiérrez *et al.*, (2008) con ligeras modificaciones, utilizando ácido gálico como material de referencia. Se prepararon las siguientes soluciones en matraces aforados utilizando

agua desionizada como diluyente: carbonato de sodio al 7.5% (0.075 g/mL), ácido gálico (0.3 mg/mL), finalmente el reactivo Folin-Ciocalteu 1/10 (5mL / 45 mL).

Las muestras fueron filtradas (Oasis® HLB 3cc, 0.22 µm, Waters, USA) y se realizó una curva de calibración de ácido gálico (anexo 1.1) a las siguientes concentraciones con agua desionizada como diluyente: 0, 100, 200 y 300 mg EAG/L. Se realizaron las pruebas de dilución para analizar las muestras de acuerdo a la curva de calibración, una vez elegida la dilución, se colocaron las muestras en microtubos (1.5 mL) y se adicionaron 500 µL del reactivo Folin-Ciocalteu y 400 µL de carbonato de sodio, las muestras se dejaron reposar 30 minutos, la lectura de absorbancia se llevó a cabo a 765 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS [BioTek]. Software KC Junior, USA) utilizando agua desionizada como blanco de referencia.

Los resultados se obtuvieron por triplicado y se expresaron en mg Equivalentes de Ácido Gálico por Litro (mg EAG/L).

5.6 Determinación de ácido L-ascórbico

La determinación de ácido ascórbico se realizó de acuerdo al método descrito por Dürüst *et al.*, (1997). El cual utiliza el reactivo DCPI (2,6-diclorofenolindofenol) que tiene una coloración azul-violeta y al tener contacto con ácido ascórbico cambia a rosa o incoloro.

Se prepararon las siguientes soluciones en matraces aforados: solución DCPI en agua desionizada (0.012 mg/mL), ácido oxálico en agua desionizada (0.004 g/mL), ácido ascórbico en ácido oxálico (0.05 mg/mL) y una solución amortiguadora (3 g de acetato de sodio en 10 mL de ácido acético glacial y 7 mL de agua desionizada).

Se realizó una curva patrón de ácido ascórbico (anexo 1.4) utilizando ácido oxálico como diluyente a las siguientes concentraciones: 0, 10, 20, 30 40 y 50 mg EAA/L. Se realizaron las pruebas de dilución para analizar las muestras de acuerdo a la curva de calibración, una vez elegida la dilución, se colocaron las muestras en microtubos (1.5 mL) adicionando 100 µL de solución amortiguadora y 800 µL de la solución DCPI. Se determinó la absorbancia a 520 nm en un lector de microplacas (Power

Wave XS [BioTek]. Software KC Junior, USA), utilizando ácido oxálico como blanco de referencia.

El ensayo se realizó por triplicado y los resultados fueron expresados en mg Equivalentes de Ácido Ascórbico por Litro (mg EAA/L).

5.7 Ensayo de actividad quelante

Se utilizó el método reportado por Guicin *et al.*, (2003), el cual se basa en la reacción de la molécula quelante de referencia con el ion ferroso (Fe^{2+}), posteriormente el ion ferroso que no fue quelado o secuestrado reacciona con la Ferrozina generando color, el cual es medido espectrofotométricamente.

Se prepararon las siguientes soluciones en agua desionizada: cloruro férrico II tetrahidratado 2mM (0.397 mg/mL), Ferrozina 5mM (2.46 mg/mL) y ácido etilendiaminotetracético 0.1 M (EDTA) a 0.0372 g/mL.

Se colocaron 20, 50 y 100 μL de las muestras en microtubos (1.5 mL), posteriormente se agregaron 50 μL de una solución de cloruro férrico II tetrahidratado y 450 μL de metanol anhidro, se agitaron en un vortex, dejándose en reposo por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 400 μL de Ferrozina, se agitaron en un vortex y se dejaron en reposo por 10 min a temperatura ambiente; se realizó la lectura de absorbancia a 562 nm. Como agente quelante de referencia se empleó EDTA y como blanco de referencia se utilizó agua desionizada.

Los resultados se obtuvieron por triplicado y se expresaron en % de actividad quelante de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Actividad quelante} = ((A_0 - A_1) / A_0) * 100$$

Dónde:

A_0 = Absorbancia de la muestra control

A_1 = Absorbancia de la muestra problema

5.8 Actividad antimicrobiana

5.8.1 Microorganismos de ensayo

Los microorganismos se obtuvieron del cepario del laboratorio de Nutrigenómica del Instituto de Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo: *Staphylococcus aureus* ATCC 1654 (gram positiva), *Escherichia coli* ATCC 25922 (gram negativa) y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 (gram negativa).

5.8.2 Medios de cultivo

La preparación de los medios de cultivo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del agar extracto de malta comercial y se esterilizaron en autoclave, a 121°C durante 15 minutos, posteriormente se colocaron en una incubadora estática FELISA FE-133D a 37°C durante 24 horas con la finalidad comprobar su esterilidad.

5.8.3 Curvas de crecimiento microbiano

Los microorganismos de prueba se sembraron en placas de agar extracto de malta por estría cruzada para obtener colonias aisladas a partir de un cultivo puro en cada microorganismo, los cuales se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se tomó una colonia aislada y se inoculó en un tubo con 5 mL de caldo soya tripticasa, incubándose a 37 °C durante 8 a 12 horas, con el fin de obtener un crecimiento en fase logarítmica. Una vez observado el crecimiento de microorganismos se realizaron curvas de crecimiento microbiano, en las cuales se hizo un ajuste por densidad óptica a una absorbancia de 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6, con un posterior conteo de colonias con el propósito de determinar a cuál de estas absorbancias se obtenía un crecimiento bacteriano de 1×10^8 UFC/mL.

5.8.4 Siembra masiva

Una vez ajustada la concentración de microorganismos, se colocaron 250 µL de la suspensión de *Escherichia coli*, 350 µL de *Staphylococcus aureus* y 400 µL de *Pseudomona aeruginosa*, se distribuyeron uniformemente en el medio de cultivo con

un asa de vidrio estéril, posteriormente se dejaron reposar las placas 10 minutos para permitir que el inóculo se absorbiera sobre la superficie del agar.

5.8.5 Método de difusión mediante Kirby-Bauer

El método de Kirby-Bauer consiste en la colocación de discos de papel impregnados con sustancias que puedan tener o no algún efecto antimicrobiano, se colocan sobre la superficie de agar, que previamente ha sido sembrado con las bacterias de prueba. El agente a ensayar se difunde posteriormente en el agar en las que puede inhibir el crecimiento bacteriano en una zona que rodea el disco (Biemer, 1973).

Se pesó 1 g de cada concentrado liofilizado de los vinos y se diluyeron en 1 mL de MeOH-Agua (1:1) cada uno. Se utilizaron sensidiscos para colocar las muestras sobre la siembra masiva, se colocó cada muestra a concentración descendente comenzando con 100, 80, 60, 40 y 20 mg/mL; se utilizaron pinzas de metal estériles para colocar cada sensidisco sobre la placa de agar. Como control negativo se utilizó MeOH-H₂O (1:1). Los testigos positivos fueron seleccionados de acuerdo a la actividad biológica conocida de los antibióticos. Este ensayo se realizó por triplicado y se midieron halos de inhibición (mm) a las 24 hrs de incubación a 37 °C.

En la tabla 4 se observa la concentración de los controles positivos contra los microorganismos utilizados en este ensayo.

Tabla 4. Controles positivos y su concentración utilizada en este ensayo.

Microorganismos	Control positivo	Concentración (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1654	Ampicilina	0.1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ampicilina	0.1
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	Estreptomicina	0.1

5.9 Extracción, purificación e identificación de compuestos bioactivos

Previamente a la identificación de compuestos se hizo una extracción MeOH:H₂O, para ello se colocaron 30 g de cada concentrado de los vinos artesanal e industrial en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 250 mL de MeOH, se obtuvo una fase metanólica y otra acuosa, las fases fueron separadas con un embudo de separación. La fase metanólica se concentró en un rotavapor (Büchi Labortechnik R-200, Suiza) y se pesó.

De la extracción metanólica, se hizo una re-extracción con AcOEt, utilizando un embudo de separación con 150 mL de AcOEt, este procedimiento se realizó por triplicado para lograr extraer la mayor cantidad de compuestos, finalmente la extracción se concentró en rotavapor.

5.9.1 Cromatografía líquida en capa fina (TLC)

Se tomaron 5 mg aproximadamente de la extracción con AcOEt y se diluyeron en 2 mL de MeOH, se depositaron de una a dos gotas de las muestras sobre una placa de sílica gel a una distancia de 0.5 cm del extremo de la placa. Se introdujo la placa en una cámara cromatográfica, previamente acondicionada con el eluyente CHCl₃-MeOH (8:2). Se mantuvo la placa en la cámara el tiempo necesario para que se produjera la elución de la muestra. Se extrajo la placa de la cámara y se dejó secar al aire. Las diferentes sustancias separadas que eran incoloras, fueron observadas con diferentes métodos de revelado, luz ultra violeta y FeCl₃, posteriormente se determinó el R_f (factor de retención) de las sustancias separadas (Gutiérrez, 2002).

5.9.2 Purificación de la fase acuosa

Se utilizó cromatografía en columna en donde se colocó una columna de vidrio (1 cm de diámetro interno) se preparó con 5 pulgadas de sílica gel 60 (Sigma-Aldrich) y posteriormente se colocó la muestra impregnada, se utilizaron 15 mL de cada uno de los siguientes disolventes: Hexano, AcOEt, MeOH:AcOEt (1:1), MeOH:DMSO (9:1) y MeOH. Las fracciones fueron plaqueadas con MeOH:DMSO (9:1).

5.9.3 Purificación de la extracción de AcOEt

Una vez identificado el número de compuestos mediante TLC, estos se sometieron a cromatografía en columna con 100 mL de cada uno de los siguientes disolventes: hexano, CHCl_3 , CHCl_3 :MeOH (9:1) y CHCl_3 :MeOH (8:2).

5.9.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La RMN es una técnica instrumental no destructiva que permite el análisis de compuestos orgánicos y algunos inorgánicos. Por medio de ella se puede deducir la identidad de la gran mayoría de compuestos orgánicos conocidos y desconocidos. Por su versatilidad y la riqueza de la información que produce, es la técnica más usada en la identificación de nuevos compuestos orgánicos (Elguero & Alkorta, 2008).

Los compuestos colectados en este estudio fueron llevados al Centro de Investigaciones Químicas del Instituto de Ciencias Básicas e Ingenierías, para elucidar los compuestos (Jeol Eclipse 400, USA) a 400 MHz, se realizaron experimentos de una dimensión: protón (^1H) y carbono-13 (^{13}C).

6. Análisis estadístico

Todos los valores fueron obtenidos por triplicado, se analizaron mediante la prueba T de Student para dos muestras independientes, un valor $p < 0.05$, fue considerado estadísticamente significativo, se utilizó el programa SPSS® para WinTM versión 15.0.

7. Resultados y discusión

7.1 Análisis químico proximal del fruto acachul (*Ardisia compressa*)

En la tabla 5 se muestra el análisis químico proximal del fruto acachul. El contenido de agua del fruto es alto (83 %) y presentó valores similares a los reportados para las bayas como fresas y arándanos (Cordenunsi *et al.*, 2002). Comparado con el estudio de Joaquín-Cruz *et al.*, (2015), los frutos de ésta investigación contienen un porcentaje de agua muy similar, así como de fibra y extracto etéreo, sin embargo, presentan mayor contenido de proteína y menor contenido de cenizas.

Tabla 5. Análisis químico proximal del fruto acachul (*Ardisia compressa*)

Composición	Porcentaje (%)
<i>Humedad</i>	83.16
<i>Hidratos de carbono</i> **	67.5
<i>Fibra dietética</i> *	12.12
<i>Extracto etéreo</i> *	4.78
<i>Cenizas</i> *	0.18
<i>Proteína</i> *	15.4

* Componentes expresados en base seca

**Hidratos de carbono libres de fibra

Como es común en las frutas, el valor más alto corresponde a hidratos de carbono (67%), con un contenido de fibra de 12 %, valores comparables a los reportados en las uvas o fresas (Marlett & Vollendorf, 1994).

El fruto acachul presentó mayor contenido de proteínas e hidratos de carbono que el fruto acai (fruto del amazonas) y menor contenido de cenizas y fibra (Sanabria & Sangronis, 2007). Comparado con la zarzamora, el fruto acachul demostró mayor contenido de proteína y extracto etéreo, menor contenido de cenizas e hidratos de carbono y valores muy similares en cuanto a fibra (Valencia & Guevara, 2013).

Todos los valores son comparables con otras bayas y frutos similares, las diferencias presentes se deben a las características propias de cada especie.

El tipo y la concentración de compuestos fenólicos, así como la actividad antioxidante en vinos, es influenciado por la composición química de la materia prima, el cual depende de la variedad, estado de maduración, condiciones atmosféricas durante la maduración y tipo de suelo (Muñoz *et al.*, 2007). Debido a esto se consideró importante hacer una evaluación previa del fruto acahul.

7.2 Determinaciones en el vino artesanal e industrial de *Ardisia compressa*

7.2.1 Actividad antioxidante mediante el método DPPH

El radical DPPH• tiene una limitación importante al interpretar la función de aquellos antioxidantes de naturaleza polar, ya que no puede disolverse en medios acuosos (Sharma & Bath, 2008).

Los resultados de ésta determinación se muestran en la figura 13. El vino artesanal mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) con una mayor capacidad antioxidante ($1,760 \pm 5.18 \mu\text{mol ET/L}$) que el vino industrial ($195 \pm 0.12 \mu\text{mol ET/L}$).

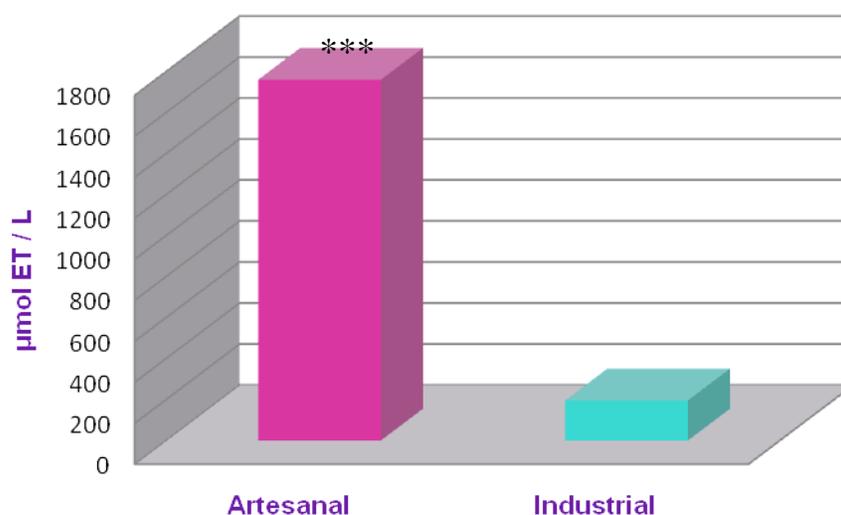


Figura 13. Capacidad antioxidante en base al radical libre DPPH*
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ contra industrial)

En la infusión de las hojas de *Ardisia compressa*, Newell *et al.*, (2010), obtuvieron valores de 36,800 $\mu\text{mol ET/L}$, lo que indica un resultado mucho mayor a lo obtenido en ambos vinos evaluados en ésta investigación.

En evaluaciones de vinos de uva, Muñoz *et al.*, (2007), evaluaron 13 vinos producidos en Perú y obtuvieron valores de 32-873 $\mu\text{mol ET/L}$. En base a esto, el vino artesanal de acachul representó una mejor capacidad antioxidante que los vinos peruanos. A pesar de que el vino industrial posee muy baja actividad mediante éste método ($195 \pm 0.12 \mu\text{mol ET/L}$), también mostró una mejor capacidad antioxidante que tres de los vinos peruanos, siendo el vino Oporto (32 $\mu\text{mol ET/L}$), vino Cepa de Viñedo Mendoza Argentina (59 $\mu\text{mol ET/L}$) y vino Borgoña (166 $\mu\text{mol ET/L}$).

En otro estudio en dónde se evaluó un vino de melocotón (durazno), obtuvieron valores de 1,550 $\mu\text{mol ET/L}$ (Umesh & Vishwas, 2015); comparado con el vino de melocotón, el vino artesanal de acachul presentó una mayor actividad antioxidante.

Estos resultados indican que el vino artesanal de *Ardisia compressa* posee mejor capacidad antioxidante que otros vinos evaluados, incluso aquellos que son hechos a base de uva, sin embargo, disminuye considerablemente la actividad comparada con la infusión de esta misma especie. Esto puede deberse a la concentración de metabolitos secundarios que existe en la parte aérea de la planta y de esto depende el contenido de compuestos antioxidantes el cual varía de acuerdo con la especie, la variedad, el tipo de cultivo, el estado de maduración, la estacionalidad y la región geográfica (Sotelo *et al.*, 2010). Estos compuestos también varían en función del año de cosecha, si bien no se conoce el año exacto de cosecha del fruto para la elaboración de cada vino, se sabe que las cosechas no fueron en el mismo año, los cambios climáticos año con año han mostrado diferencias en la concentración de compuestos con actividad antioxidante, se han encontrado contenidos fenólicos diez veces mayores en vinos producidos en zonas cálidas que en vinos producidos en zonas frías (Martinez, 2001). El vino artesanal de acachul es elaborado con frutos cosechados en clima subtropical mientras que el vino industrial se produce en una zona con clima templado-húmedo.

7.2.2 Actividad antioxidante mediante el método de ABTS

El radical $ABTS^{•+}$ puede disolverse en solución acuosa y en medios orgánicos, por lo que se puede medir la actividad antioxidante de aquellos compuestos polares y no polares (Zulueta *et al.*, 2008).

Mediante este método ambos vinos mostraron una buena capacidad antioxidante, sin embargo, el vino artesanal muestra mayor actividad con $2,896.67 \pm 6.80 \mu\text{mol ET/L}$ ($p < 0.001$), respecto al vino industrial con $1,696.67 \pm 11.70 \mu\text{mol ET/L}$ (figura 14).

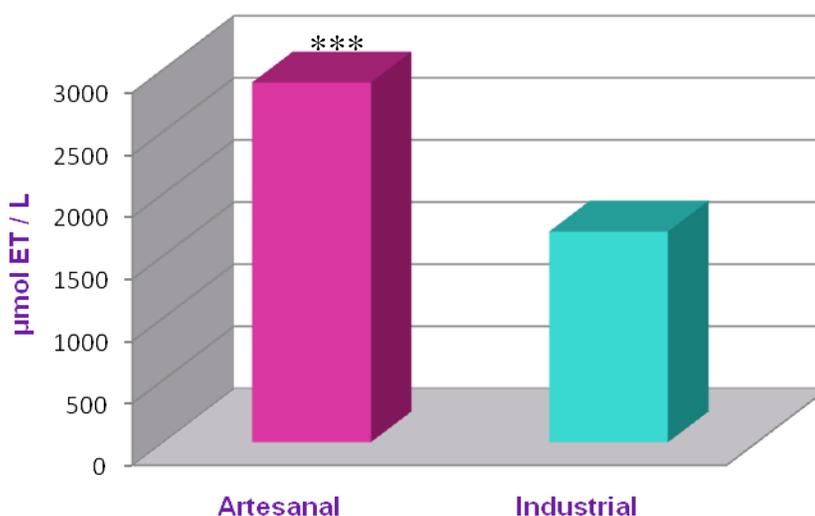


Figura 14. Capacidad antioxidante en base al radical libre $ABTS^{•+}$
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ contra industrial)

El fruto fresco de *Ardisia Compressa* fue evaluado en base a éste método obteniendo valores de $45,014.64 \mu\text{mol ET/L}$ (Joaquín-Cruz *et al.*, 2015). Comparado con este estudio, se muestra que ambos vinos disminuyen en gran medida su capacidad antioxidante, esto puede deberse principalmente al procesamiento del fruto al momento de la elaboración del vino, por ejemplo, la maceración, es una etapa fundamental en la que se extraen sustancias contenidas en la piel de la fruta y semillas. Esta demostrado que una maceración hecha en un tiempo corto a alta temperatura, impide la rápida fermentación y se obtiene un producto rico en antioxidantes (Herrera *et al.*, 2010).

Los vinos peruanos de uva expresan un resultado de 2,400-17,600 $\mu\text{mol ET/L}$, de acuerdo a lo obtenido en esta investigación, el vino artesanal se encuentra colocado entre los parámetros más bajos con un resultado de $2,896.67 \pm 6.80 \mu\text{mol ET/L}$ y es comparado con un vino Oporto (vino fortificado), que obtuvo valores de 2,440 $\mu\text{mol ET/L}$.

Mediante ambos métodos de evaluación, los vinos de acachul muestran una diferencia significativa, es importante destacar las discrepancias que existen en el proceso de elaboración de ambos vinos. La clarificación en el vino industrial, es una etapa fundamental para eliminar partículas en suspensión, en donde la floculación resulta de la reacción de la proteína del clarificante con los taninos del vino, de tal modo que se encuentran afectados algunos compuestos antioxidantes (Martinez, 2001).

7.2.3 Contenido de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu

En la figura 15 se muestra el contenido de fenoles totales, el vino artesanal presentó mayor contenido de estos compuestos ($766.7 \pm 2.50 \text{ mg EAG/L}$) en relación al vino industrial ($64 \pm 1.50 \text{ mg EAG/L}$) y se observa una diferencia significativa ($p < 0.001$).

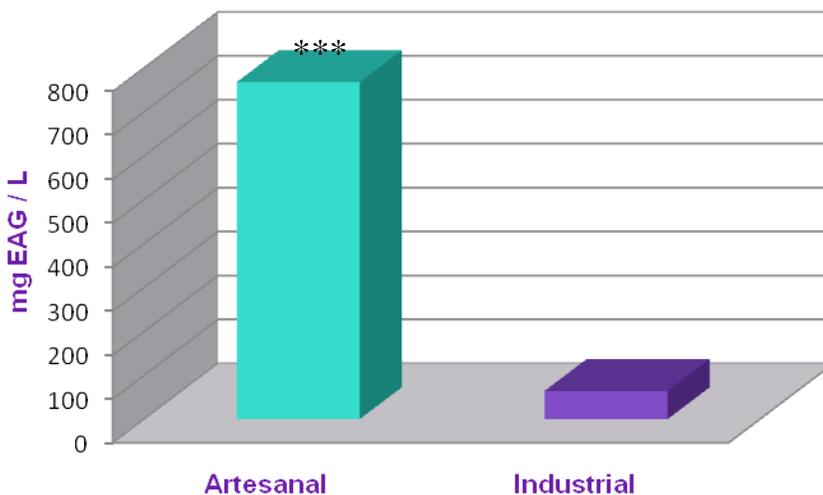


Figura 15. Contenido de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ contra industrial)

Leyva (2009), determinó el contenido de estos compuestos en 9 licores de moras elaborados artesanalmente y presentaron valores comprendidos entre 477.12 a 884.98 mg EAG/L; estos resultados son consistentes con el vino artesanal de acachul con un contenido fenólico de 766.7 ± 2.50 mg EAG/L. Sin embargo en el fruto fresco de acachul se reporta un resultado de 1,051 mg EAG/ 100g (Joaquín-Cruz *et al.*, 2015), esta disminución puede deberse al proceso térmico al que fueron expuestos estos compuestos durante la maceración en el proceso de elaboración del vino, de igual forma al estado de madurez del fruto y características propias de la especie (Martínez, 2001).

En la tabla 6 se encuentran diversos vinos y licores evaluados por Heinonen *et al.*, (1998), de acuerdo a estos resultados el vino artesanal de acachul presentó mayor contenido de fenoles totales que el vino de grosella roja, manzana y los licores de fresa y arándano. Es evidente que los vinos de bayas y frutas en general contienen cantidades más bajas de compuestos fenólicos que los vinos tintos de uva. Los informes destacan que uvas rojas, vinos y subproductos de uvas contienen altas cantidades de compuestos fenólicos (500-4,059 mg EAG/L) (Heinonen *et al.*, 1998).

Tabla 6. Contenido de fenoles totales en diversos vinos y licores

Vinos	mg EAG / L
<i>Grosella negra</i> *	520-1820
<i>Grosella roja</i> *	440-475
<i>Manzana</i> *	160-470
<i>Acachul artesanal</i>	767
<i>Acachul industrial</i>	64
Licores	
<i>Cereza</i> *	1080
<i>Fresa</i> *	410-525
<i>Arándano</i> *	500

*Fuente: Heinonen *et al.*, (1998).

El vino industrial presentó muy bajo contenido de fenoles totales (164 ± 1.50 mg EAG/L) y no es comparable con ninguno de los valores descritos anteriormente, son varios los factores que influyen en estos resultados, por ejemplo, un fruto en inadecuado estado de maduración, afecta al contenido de metabolitos secundarios

responsables de la actividad biológica atribuida a esta especie (Martínez, 2001). También es importante destacar que los compuestos fenólicos se modifican en el envejecimiento de los vinos, a mayor edad pueden verse más concentrados y viceversa (Herrera *et al.*, 2010). Finalmente se ha descrito que la mayoría de los compuestos fenólicos se encuentran en la piel y en las semillas del fruto, por lo tanto los diversos procesos aplicados a la producción de mosto y vino, influyen de diferente manera en la concentración de compuestos fenólicos que contiene el producto final (Aguilar *et al.*, 2003).

7.2.4 Determinación de ácido L-ascórbico

El ácido ascórbico preserva el bouquet, el aroma y frescor de los vinos, este desaparece durante la fermentación, ya que es consumido por levaduras y bacterias; por tanto, el vino fermentado con levaduras no contiene este compuesto, es por ello que los vinos necesitan del ácido ascórbico como aditivo alimentario (Viader, 2010). En este estudio solo el vino industrial fue fermentado con levaduras, sin embargo, se desconoce si este fue adicionado con ácido ascórbico.

Los resultados de esta determinación se muestran en la figura 16. El contenido de ácido ascórbico en el vino artesanal resultó mayor (200 ± 0.00 mg EAA/L), respecto al vino industrial (191.66 ± 0.14 mg EAA/L), sin embargo no se presentaron diferencias entre las muestras.

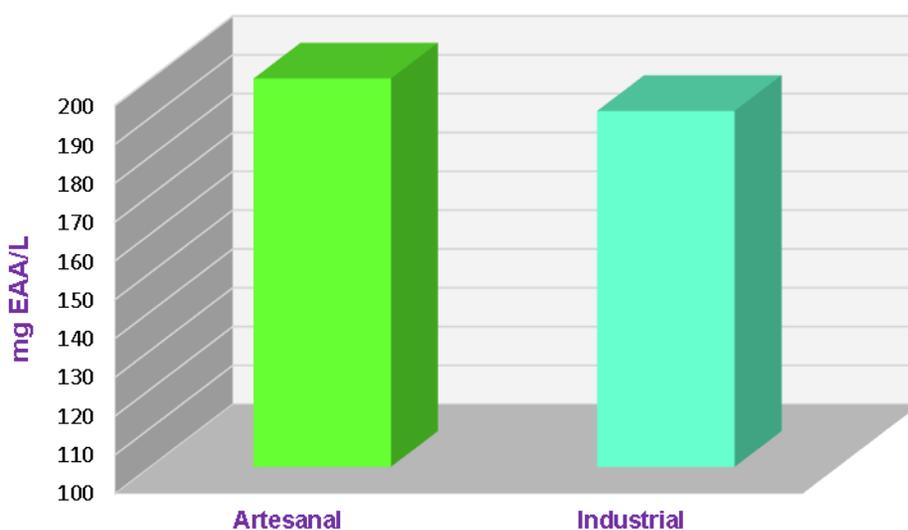


Figura 16. Contenido de ácido L-ascórbico de acuerdo al método calorimétrico de Dürüst ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ contra industrial)

Aunque la diferencia en ambos vinos es mínima, esta puede deberse a los diferentes estados de maduración en los que se encontraba el fruto al momento de ser recolectado ya que durante la maduración se produce un descenso en el contenido de vitamina C, así los frutos verdes son más ricos en vitamina C que los maduros. Este descenso se atribuye a la enzima ascorbato oxidasa, cuya actividad es mayor en los frutos maduros (Herrera *et al.*, 2010). Así mismo, pueden influir factores como el tipo de suelo y región geográfica en la cosecha del fruto, así como las técnicas de procesado y almacenamiento en el vino (Martínez, 2001).

Herrera *et al.*, (2010), evaluaron dos vinos artesanales producidos en Venezuela del fruto semeruco, también conocido como acerola o manzanita, en donde encontraron valores de 237 y 452 mg EAA/L. Comparado con esta investigación, los vinos artesanal e industrial de acachul presentan valores inferiores de ácido ascórbico, sin embargo, de acuerdo al Código Internacional de Prácticas Enológicas de la Organización Internacional de la viña y el Vino (OIV), el ácido ascórbico debe estar presente en valores máximos de 250-300 mg/L (Viader, 2010). Los vinos evaluados en ésta investigación no sobrepasan estos valores y estarían cumpliendo un parámetro de calidad.

7.2.5 Ensayo de actividad quelante

Los polifenoles son capaces de actuar a todos los niveles de la cadena radical y de esta manera impiden la oxidación de las células, eliminan formación de quelatos de los iones metálicos. El vino tinto previene el daño oxidativo del ADN, causado por los radicales libres y la formación de quelatos de hierro, agrupando a los mismos y eliminándolos (Antolovich *et al.*, 2000).

El porcentaje de actividad quelante para el vino artesanal fue de 32 ± 2.56 % e industrial de 26 ± 3.05 %, no se muestra alguna diferencia estadísticamente significativa (figura 17).

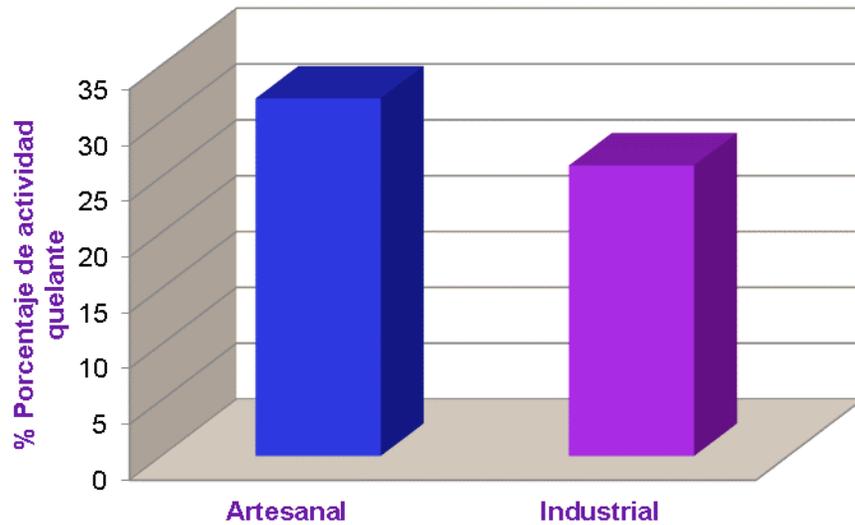


Figura 17. Porcentaje de actividad quelante en presencia de Fe^{2+}
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ contra industrial)

En una investigación realizada en 37 vinos, incluidos tintos, blancos y rosados, obtenidos de diferentes zonas geográficas de China, determinaron un porcentaje de quelación que varía de 51% a 74%, con un promedio de 66% para vinos tintos, 56%, para los vinos blancos y 64% para los vinos rosados (Li *et al.*, 2009). Los vinos artesanal e industrial de acachul presentan un porcentaje menor de quelación, inclusive que los vinos blancos y rosados. Tal diferencia se debe al mayor contenido de fenoles totales que presentaron los vinos chinos en este estudio, ya que estos son los principales compuestos que desempeñan un papel protector contra el daño oxidativo siendo capaces de secuestrar el Hierro (Antolovich *et al.*, 2000).

7.2.6 Determinación de la capacidad antimicrobiana

Los halos de inhibición de cada placa fueron observados y medidos para obtener el diámetro del halo en mm, posteriormente se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual se define como la mínima concentración del antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$), que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C (Quintana *et al.*, 2005).

El vino industrial no presentó actividad frente a ninguna de las bacterias de ensayo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 1654), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853). Esto puede deberse al poco contenido de fenoles totales que presentó este vino (64 ± 1.50 mg EAG/L), ya que se conoce que los polifenoles presentes en los vinos poseen actividad antimicrobiana y antifúngica, en especial el ácido gálico que es uno de los compuestos monoméricos más abundantes en el vino (65-126 mg/L) (Frankel, 1995).

Por otro lado, el vino artesanal presentó actividad selectiva frente a *Staphylococcus aureus*, mostrando halos de inhibición bien definidos en tres concentraciones (100, 80 y 60 mg/mL) con una CMI de $60,600 \mu\text{g/mL}$ (60.6 mg/mL). Los resultados de esta actividad se muestran en la figura 18 y tabla 7.



Figura 18. Caja de Petri con siembra masiva de *Staphylococcus aureus*, control positivo (ampicilina), control negativo (MeOH:H₂O) y sensibiliscos impregnados con la muestra a concentración descendente.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana del vino artesanal frente a *Staphylococcus aureus*.

Concentración (mg/mL)	Díámetro del halo de inhibición (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 1654	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
100	–	10.6 ± 0.28	–
80	–	8.5 ± 0.43	–
60	–	7.7 ± 0.76	–
40	–	–	–
20	–	–	–
Control positivo	19.5 ± 0.3 ^a	18.3 ± 0.28 ^a	20.1 ± 0.15 ^b
Control negativo ^c	–	–	–

–: No mostró inhibición

^a Ampicilina y ^b Estreptomina (0.1 mg/mL)

^c MeOH:H₂O (1:1)

Las bacterias gram positivas tienen una capa externa de peptidoglicano, ésta no funciona como una barrera de permeabilidad efectiva, por lo que estas bacterias son más susceptibles a compuestos antibacterianos (Nikaido & Vaara, 1985), es por ello que se considera a *Staphylococcus aureus* una bacteria más sensible a los antimicrobianos siendo una bacteria gram positiva.

Ramírez-Mares & Sánchez-Burgos (2010), evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos y hexánicos de la planta *Ardisia compressa* frente a las bacterias gram negativas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 35218), bacteria gram positiva: *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) y el hongo *Candida albicans* (ATCC 14053), en donde se mostró que los extractos de ésta planta tenían actividad selectiva contra la bacteria gram negativa *Klebsiella pneumoniae*, en donde obtuvieron una CMI de 1,870 µg/mL para el extracto metanólico con halos de inhibición de 12 mm, y de 937 µg/mL para el extracto hexánico con halos de inhibición de 13 mm. Comparado con esta investigación, se muestra que el vino artesanal de *Ardisia compressa*, inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* a una mayor concentración (60,600 µg/mL), es importante

destacar que cada extracto presenta diferentes tipos de compuestos, ya que los disolventes extraen sustancias dependiendo de su polaridad, en ésta investigación no se utiliza ningún extracto purificado, sino una mezcla de diferentes compuestos que se encuentran en total en el vino, sin embargo, estos resultados indican que puede existir una diferencia de compuestos bioactivos en la planta y el vino, que inhiben el crecimiento de bacterias distintas y que además, presentan actividad selectiva frente a un microorganismo específico.

En una investigación realizada por Papadopoulou *et al.*, (2005), evaluaron diferentes extractos de vinos libres de alcohol provenientes de viñedos griegos, frente a las cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Extractos de un vino Agiorgitiko, conocido como un vino tinto seco, inhibió a la bacteria *Staphylococcus aureus* con halos desde 25 mm de diámetro, este vino presentó un contenido de fenoles totales muy elevado (21,200 mg EAG/L), por otro lado, una muestra de vino también Agiorgitiko, proveniente de distinta zona geográfica, inhibió a esta misma bacteria, presentando un halo de 8 mm de diámetro, este mismo vino contenía 2,505 mg EAG/L, lo que significa, que el contenido de fenoles totales puede estar sumamente ligado a la presencia de esta actividad, de igual forma los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo de los polifenoles también parece estar relacionado con la toxicidad frente a los microorganismos (Calvo & Martínez-Martínez, 2008).

Sin embargo, el vino artesanal, posee menor contenido de fenoles totales que ambos vinos griegos (766.7 ± 2.50 mg EAG/L) y mostró un halo de inhibición en su máxima concentración de 10.6 ± 0.28 mm de diámetro, esto demuestra que podrían existir otros compuestos bioactivos provenientes de la propia especie *Ardisia compressa*, que poseen tal actividad.

7.2.7 Aislamiento e Identificación de compuestos bioactivos

7.2.7.1.1 Ardisin

Se observaron 6 compuestos obtenidos de la extracción de AcOEt mediante TLC (figura 19), se aislaron y sometieron a RMN de ^1H (400 MHz CDCl_3) (figura 20), la segunda fracción fue de gran interés ya que mostró señales de protones aromáticos entre 6.79 y 6.81 ppm, las siguientes señales de alquenos a 5.12 ppm. Finalmente una larga cadena alquílica mostrando señales de metilenos entre 1.0 y 1.2 ppm y aproximadamente a 0.8 ppm la señal del metilo 19 presente en la molécula. Comparado con la literatura, se indica la presencia del compuesto denominado ardisin, aislado originalmente de *Ardisia japónica* (Liang & Yang, 1979) y recientemente también encontrado en *Ardisia compressa* (Gonzalez de Mejía *et al.*, 2002). En el espectro también se muestran otras señales entre 3.65 y 4.21 ppm que no se encuentran en el espectro original del ardisin, lo que indica que el compuesto aún no se encuentra completamente puro. Sin embargo este hallazgo es de gran interés, ya que el ardisin ha mostrado diversas propiedades, entre ellas se encuentra la potente actividad antioxidante y antitumoral en animales de experimentación con cáncer de hígado, además de ser un inhibidor potente de las topoisomerasas I y II (Kobayashi & de Mejía, 2004).

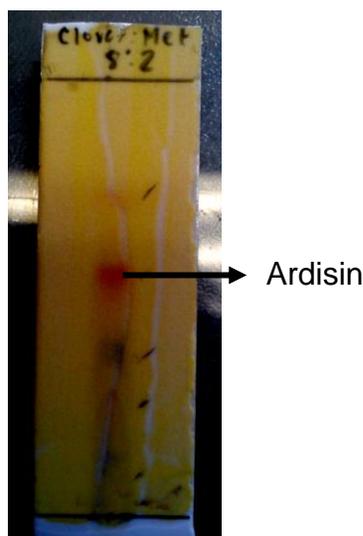


Figura 19. Placa cromatográfica con 6 diferentes compuestos utilizando la polaridad $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (8:2) revelada con FeCl_3 .

400 MHz
CDCl₃

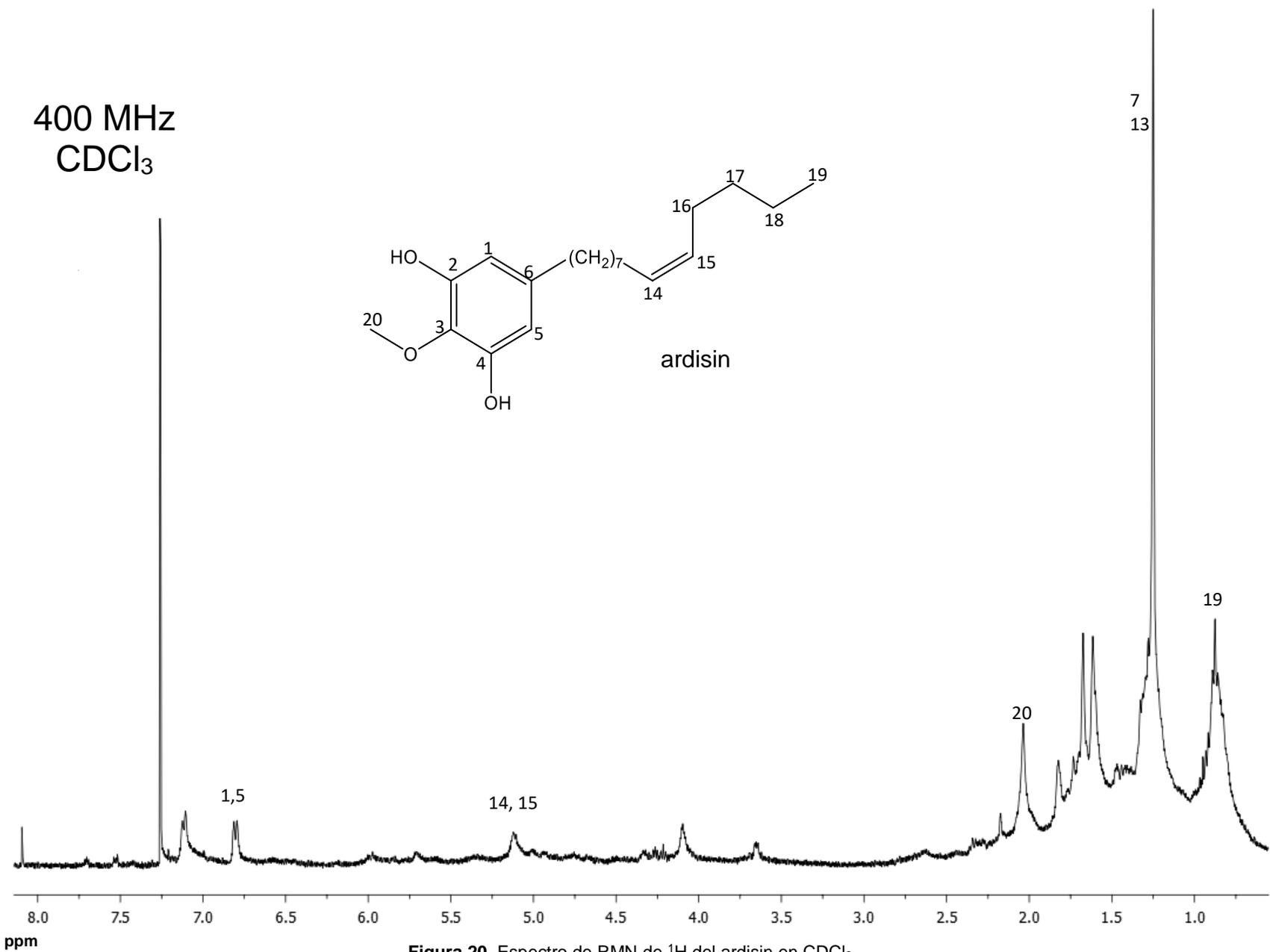
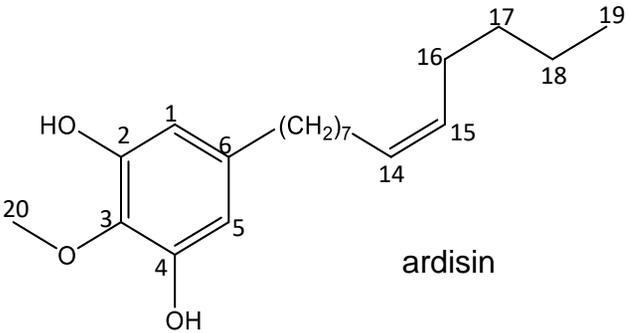


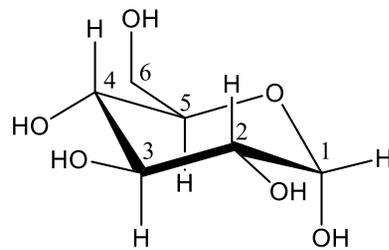
Figura 20. Espectro de RMN de ¹H del ardisin en CDCl₃

7.2.7.1.2 α -glucosa y β -glucosa

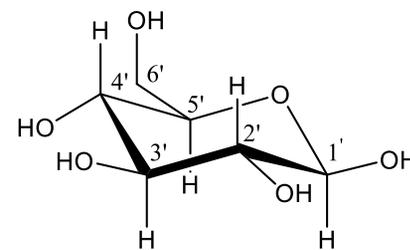
En la extracción acuosa se observó un precipitado en forma de cristales bien definidos de un tono rosado muy claro, el cual se sometió a cromatografía en columna para ser purificado.

El compuesto obtenido de la fase acuosa fue sometido a RMN de ^1H (400 MHz D_2O) (figura 21). Muestra señales típicas de una doble para el protón anomérico de la α -glucosa entre 5.0 y 5.1 ppm, la señal doble del protón anomérico de la β -glucosa se localiza a frecuencias más bajas encontrándose entre 4.4 y 4.5 ppm aproximadamente. El resto de las señales presentes en la molécula se encuentran localizadas entre 3 y 3.8 ppm. El espectro de ^{13}C (100 MHz D_2O) (figura 22), muestra dos regiones típicas, la primera representa el carbono anomérico de la α -glucosa entre 92 y 93 ppm y el carbono anomérico de la β -glucosa entre 96 y 97 ppm. La segunda región típica a 61 ppm donde se muestra un metileno base de OH que diferencia fácilmente a los carbonos de azúcar. El resto de las señales se localizan entre 70 y 77 ppm. De acuerdo a estos datos espectroscópicos se indica la presencia de α y β -glucosa (Duddeck *et al.*, 2000) Es común la presencia de diversos azúcares en distintos frutos, en ésta ocasión se aisló e identificó la presencia de glucosa, en estudios anteriores del fruto de *Ardisia compressa* no se reportan compuestos aislados mediante RMN, esto puede ser una base para lograr aislar distintos azúcares que puedan poseer diversos beneficios para la salud.

400 MHz
D₂O



α -glucosa



β -glucosa

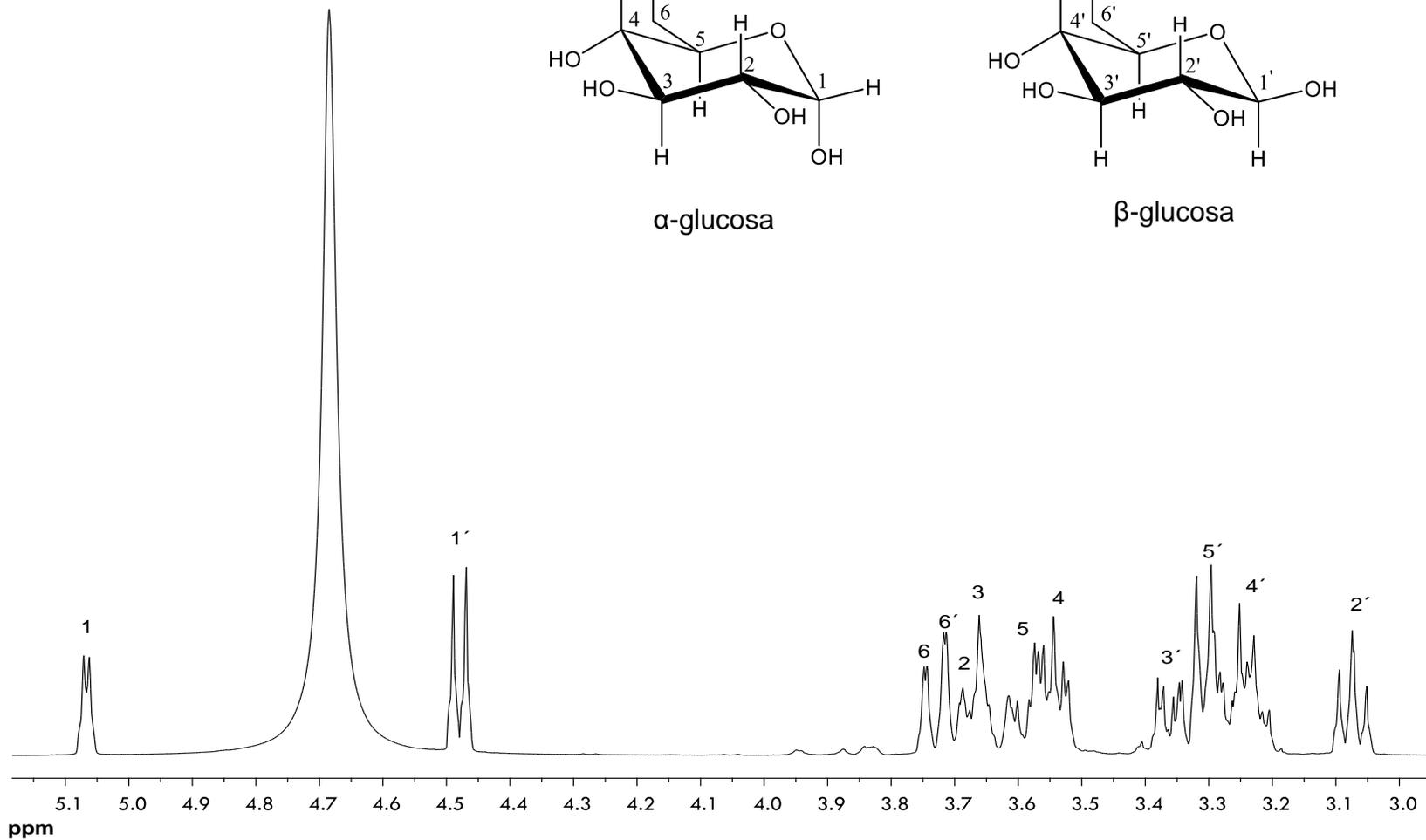


Figura 21. Espectro de RMN de ¹H del α -D-glucosa y β -D-glucosa en D₂O

100 MHz
D₂O

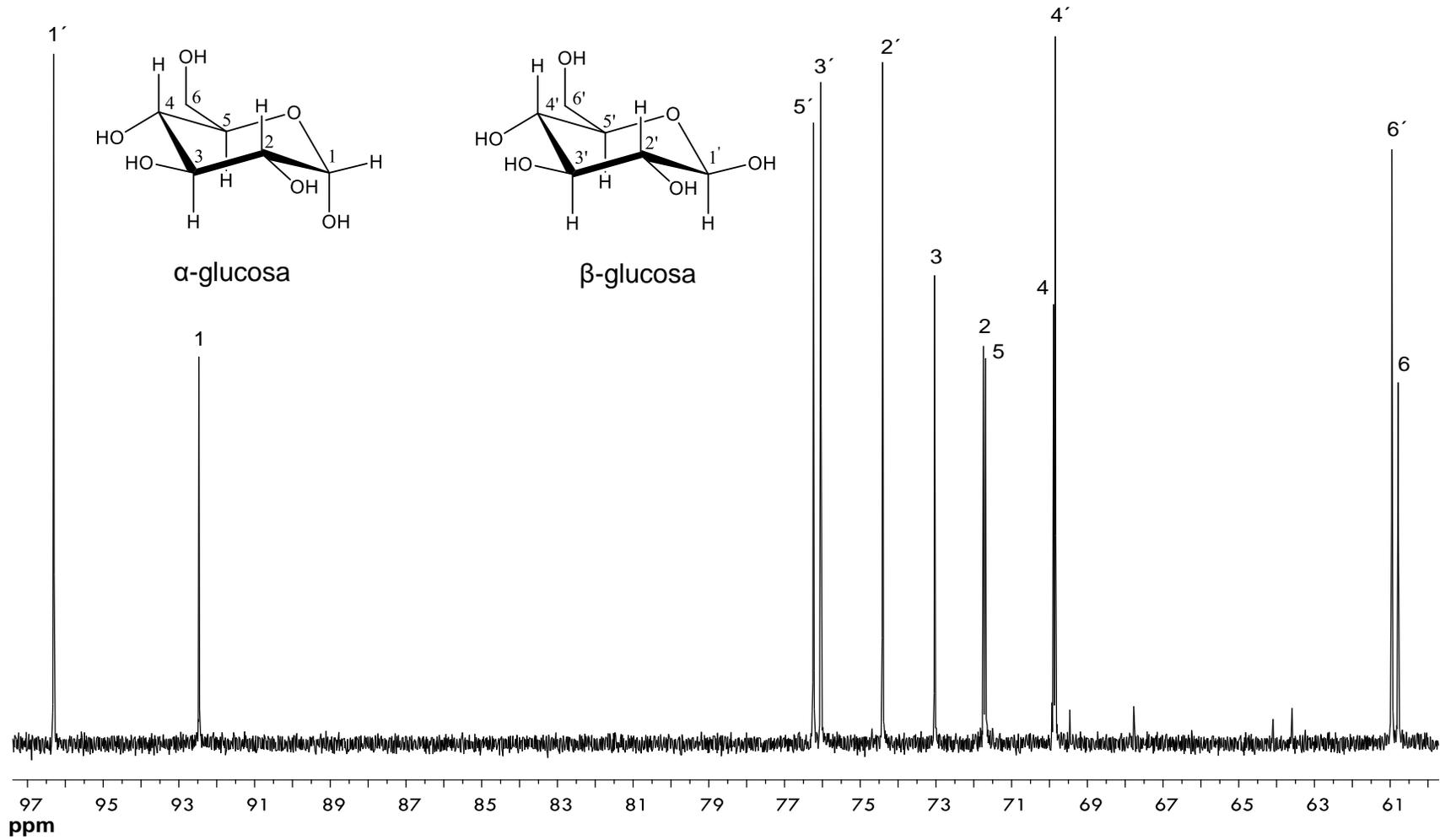


Figura 22. Espectro de RMN de ¹³C del α-D-glucosa y β-D-glucosa en D₂O.

8. Conclusiones

- El vino artesanal de *Ardisia compressa* mostró mayor capacidad antioxidante que el vino industrial mediante ambos métodos de evaluación, siendo ABTS, el método por el cual se presentó la mejor actividad: artesanal (2896.67 ± 6.80 $\mu\text{mol ET/L}$) e industrial (1696.67 ± 11.70 $\mu\text{mol ET/L}$). Sin embargo, ambos vinos poseen actividad comparable con algunos vinos tintos de uva.
- El contenido de fenoles totales resultó mayor en el vino artesanal (766.7 ± 2.50 mg EAG/L), contra el vino industrial (64 ± 1.50 mg EAG/L), mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).
- El contenido de ácido ascórbico estuvo presente en ambos vinos en parámetros similares: artesanal (200 ± 0.00 mg EAA/L) e industrial (191.66 ± 0.14 mg EAA/L).
- El vino artesanal presentó un mayor porcentaje de actividad quelante, obteniendo un resultado de 32 ± 2.56 % contra vino industrial de 26 ± 3.05 %.
- El ensayo de actividad antimicrobiana reveló que el vino industrial no presenta actividad frente a los microorganismos de ensayo: *Staphylococcus aureus* ATCC 1654, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853; sin embargo, el vino artesanal presentó actividad selectiva frente a *Staphylococcus aureus*, mostrando halos de inhibición bien definidos en tres concentraciones (60, 80 y 100 mg/mL) y con una CMI de 60.6 mg/mL, actividad relevante dada la selectividad del vino frente a solo una bacteria gram positiva y a la resistencia que presenta este microorganismo frente a múltiples antibióticos.
- Los datos espectroscópicos de los compuestos aislados e identificados mediante RMN de ^1H y ^{13}C , indicaron la presencia del ardisin, hallazgo importante ya que anteriormente solo se había logrado identificar este compuesto en la planta más no en el fruto, este compuesto es de suma

importancia dadas las propiedades antioxidantes y antitumorales que presenta y al cual se le puede atribuir la actividad biológica presente en el vino artesanal. De igual forma se logró aislar e identificar glucosa, este acontecimiento puede servir de base para continuar con la búsqueda de otros azúcares que no se hallan descrito anteriormente en esta especie.

9. Bibliografía

Aguilar, G., Brujin, J., & Loyola, C. (2003). Comparación de la capacidad antioxidante de mostos y vinos tintos del valle de Itata. *Revista de la Sociedad Química de Perú*, 58(3), 18-24.

Antolovich, M., Prenzler, P., Roboards, K., & Ryan, D. (2000). Sample separation in the determination of phenolic compounds in fruit. *The Analyst*, 7(125), 989-1009.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists (2005). *Official methods of analysis*. (Maryland, USA).

Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 3(14), 161-172.

Barbado, J. (2005). *Vinos de elaboración casera*. Buenos Aires: Albatros. (pp. 52-54).

Biemer, J. (1973). Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of clinical Laboratory Science*, 3(2), 135-141.

Birben, E., Murat, U., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 5(3), 9-19.

Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2008). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 45-59.

Cemeli, E., & Baumgartner A., A. D. (2009). Antioxidants and the comet assay. *Mutation Research*, 2(6), 51-67.

Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. (2014). Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 61(2), 28-40.

Carocho, M., & Ferreira, I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 8(51), 15-25.

Cordenunsi, B., Nascimento, J., Genovese, M., & Lajolo, F. (2002). Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 2581-2586.

Daza-Pérez, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 123-157.

Delgado-Olivares, L., Betanzos-Cabrera, G., & Sumaya-Martínez, M. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la dismunución del estrés oxidativo. *Investigación y ciencia*, 50(8), 10-15.

Díaz, A. (2003). La estructura de las catalasas. *Revista de Educación Bioquímica*, 2(22), 76-84.

Dinges, M., & Orwin, P. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(6), 16-34.

Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 385-393.

Duddeck, H., Dietrich, W., & Toth, G. (2000). *Elucidación estructural mediante RMN* Barcelona: Springer. (pp. 66-68).

Dupont, D. (2007). *Química orgánica experimental*. Barcelona: Reverté. (pp. 25-34).

Dürüst, N., Sümengen, D., & Dürüst, Y. (1997). Ascorbic acid and element contents of foods of trabzon (Turkey). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(2), 2085-2087.

Elguero, J., & Alkorta, I. (2008). Resonancia magnética nuclear de protón: aplicaciones en Química Orgánica. Madrid, España. (pp 69-76).

Frankel, E. W. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Agriculture Food and Chemistry*, 43(16), 890-894.

Formica, J., & Regelson, A. (1995). A review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33(12), 1061-1080.

García-Ruiz, A. (2009). Inactivation of enological lactic acid bacteria (*Lactobacillus*). *Journal Applications in Microbiology*, 12(3), 1042-1053.

Gimeno, E. (2004). Compuestos polifenólicos: un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm: Farmacia y Nutrición*, 3(12), 80-84.

González de Mejía, E., Chandra, S., Ramírez-Mares, M. V., & Wang, W. (2006). Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *Ardisia compressa* extracts and their effect on human colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44(2), 1191-1203.

Gonzalez de Mejía, E., Ramírez-Mares, V., & Nair, M. (2002). Topoisomerase I and II enzyme inhibitory aqueous extract of *Ardisia compressa* and ardisin protect against benomyl oxidation of hepatocytes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36(50), 7714-7719.

Gonzalez, M. (2003). *Elaboración artesanal de vinos de frutas*. Barcelona: Acribia. (pp. 25-54).

Guicin, I., Buyukokorogiu, M., & Kufrioglu, I. (2003). Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7(5), 1370-1373.

Gutiérrez, D., Ortíz, C., & Mendoza, A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Simposio de Metrología*, 108-112.

Gutiérrez, M. (2002). La cromatografía líquida: aplicación de la TLC a la separación de colorantes. *Boletín Intexter U.P.C*, 29-34.

Gutiérrez-Maydata, A. (2002). Vino, polifenoles y protección a la salud. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 2(16), 134-141.

Hardalo, C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: Assesment of risk from drinking water. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(14), 47-75.

Heinonen, M., Lehtonen, J., & Hopia, A. (1998). Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(2), 125-134.

Herrera, A., Padín, C., Rivas, B., Barrera, W., Hernández, R., & Leal, I. (2010). Evaluación química del vino de semeruco (*Malpighia spp.*) producido en el estado de Falcón Venezuela. *Multiciencias*, 10(3), 234-240.

Joaquín-Cruz, E., Dueñas, M., García-Cruz, L., & Salinas-Moreno, Y. (2015). Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa K.*) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, 70, 151-157.

Kobayashi, H., & de Mejía, E., (2004). The genus *Ardisia*: a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 347-354.

Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancino-Filho, J., & Feet, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia e Tecnología de alimentos*, 25(4), 723-732.

Lascurain, M., Avendaño, S., & del Amo, S. (2010). *Guía de frutos silvestres comestibles en Veracruz*. México: Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, Conafor-Conacyt.

Leyva, D. E. (2009). *Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y frutos de mora* (Tesis de pregrado). Oaxaca, México: Universidad Tecnológica de la Mixteca. (pp 58-63).

- Li, H., Wang, X., Li, Y., & Wang, H. (2009). Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112(3), 454-460.
- Liang, B. L., & Yang, Z. X. (1979). Structural studies on ardisin of *Ardisia japonica*. *K'o Hsueh T'ung Pao (Chin Ed)*, 24(19), 910-912.
- Luján Roca, D. (2014). *Pseudomona aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Lationamerica*, 48(4), 465-474.
- Martínez, F. (2001). Viticultura de calidad: factores que afectan al contenido de compuestos fenólicos. *Revista de Enología*, 2(24), 112-116.
- Martínez S., G. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista Cubana de Farmacología*, 39(3), 41-50.
- Mercado-Mercado, G., Carrillo, L. D., & Wall-Medrano, A. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición hospitalaria*, 8(2), 36-46.
- Monroy-Vázquez, A., Totosaus, A., González, L., De la Fuente, K., & García, I. (2007). Antioxidantes I. Chile ancho (*Capsicum annum L. grossum sendt.*) y romero (*Rosmarinus officinalis L.*) como fuentes naturales de antioxidantes. *Ciencia y Tecnología*, 6(8), 111-116.
- Moreno-Arribas, M. (2011). *¿Que sabemos del vino?*. Madrid: Catarata. (pp 37-45).
- Muñoz, A. M., Fernández, A., Ramos, F., & Alvarado, C. (2007). Evaluación de la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en vinos producidos en Perú. *Revista de la Sociedad Química de Perú*, 73(1), 30-40.
- Newell, A., Yousef, G., Lila, Mary An, R.-M., Vinicio, M., & González de Mejía, E. (2010). Comparative in vitro bioactivities of tea extracts from six species of *Ardisia* and their effect on growth inhibition of HepG2 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 34(130), 536-544.
- Nikaido, H., & Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*, 3(12), 13-32.
- Palmieri, L., & Manreli, M. (1999). Effect of resveratrol and some other natural compounds. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 3(25), 79-85.
- Papadopoulou, C., Soulti, K., & Roussis, I. (2005). Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 41-46.

Pisoschi, A., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry* , 11(3), 55-74.

Podsedeck, A. (2005). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica. *Food Science and Technology*, 27(12), 6-11.

Prat, M. (2004). *Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar*. Chile: Instituto de Salud Pública de Chile.

Queipo-Ortuño, M., & Boto-Ordoñez, M. (2012). Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 56(12), 27-36.

Quintana, H., Díaz, S., Taboada, V., & Ortiz, T. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana*, 16(1), 39-45.

Quiñones, M. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 2(27), 76-89.

Rahim, R., Nikfar, S., Larijani, B., & Abdollah, M. (2005). A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomedicine & Pharmacotherapy* , 59(7), 365-373.

Ramírez-Mares, M., Fatell, S., Villa-Treviño, S., & Gonzalez de Mejía, E. (1999). Protection of Extract from Leaves of *Ardisia compressa* against Benomyl-induced Cytotoxicity and Genotoxicity in Cultured. *Toxicology in Vitro*, 12(3), 889-896.

Ramírez-Mares, M. V., & Sánchez-Burgos, J. A. (2010). Antioxidant, antimicrobial and antitopoisomerase screening of the stem bark extracts of *Ardisia compressa*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(4), 307-313.

Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México* , 22(14), 464-475.

Rojas, J. J., García, A. M., & López, A. J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 28-32.

Rojo-Callejas, F. (2002). *Manual de Química Analítica Instrumental II*. México: Facultad de Química. (pp.15-23).

Sanabria, N., & Sangronis, E. (2007). Caracterización del fruto acai (*Euterpe olerácea Mart.*): un fruto del amazonas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(2), 94-98.

Sanz, Y., & Collado, M. (2006). Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos intestinales. *Acta Pediátrica Española*, 4(64), 74-78.

Sen, S. & Chakraborty, R. (2011). The role of antioxidants in human health. *American Chemical Society*, 29(3), 12-37.

Serrano-Maldonado, M., Guerrero-Legarreta, I., De la Paz, C., & Soriano-Santos, J. (2011). Actividad antioxidante y efecto citotóxico de *Cladocela loniceroides* (*van Tieghem*) Kujit (*Loranthaceae*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3(12), 161-170.

Sharma, O. P., & Bath, K. T. (2008). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(14), 202-205.

Sotelo, I., Casas, N., & Camelo, G. (2010). Borojó (*Borojoa patinoi*): Fuente de polifenoles con actividad antimicrobiana. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 17 (3), 329-336.

Umesh, J., & Vishwas, B. (2015). Wines from fruits other than grapes: Current status and future prospectus. *Food Bioscience* 6(9), 80-96.

Valencia, C., & Guevara, A. (2013). Variación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos durante el procesamiento del néctar de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.). *Revista de la Sociedad Química de Perú*, 79(2), 116-125.

Vazquez G, J., Gutierrez T, J., Mena N, G., & Martínez D, M. (2012). Caracterización Poscosecha de Acachul. *Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 387-392.

Venereo-Gutiérrez, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Médica Militar*, 31(2), 126-133.

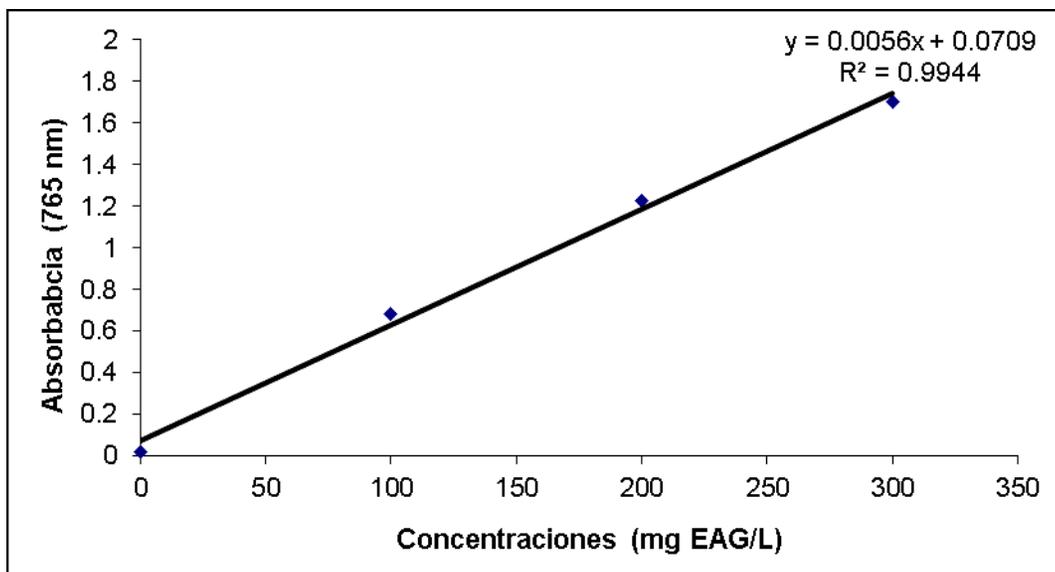
Viader, R. (2010). *Código internacional de prácticas enológicas*. Recuperado el 4 de Enero de 2016, de <http://www.oiv.int/oiv/info/espratiquesoenologiques>.

Vicente, M., Prieto, M., & Morales, A. (2013). Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Revista de Toxicología*, 30(2), 171-181.

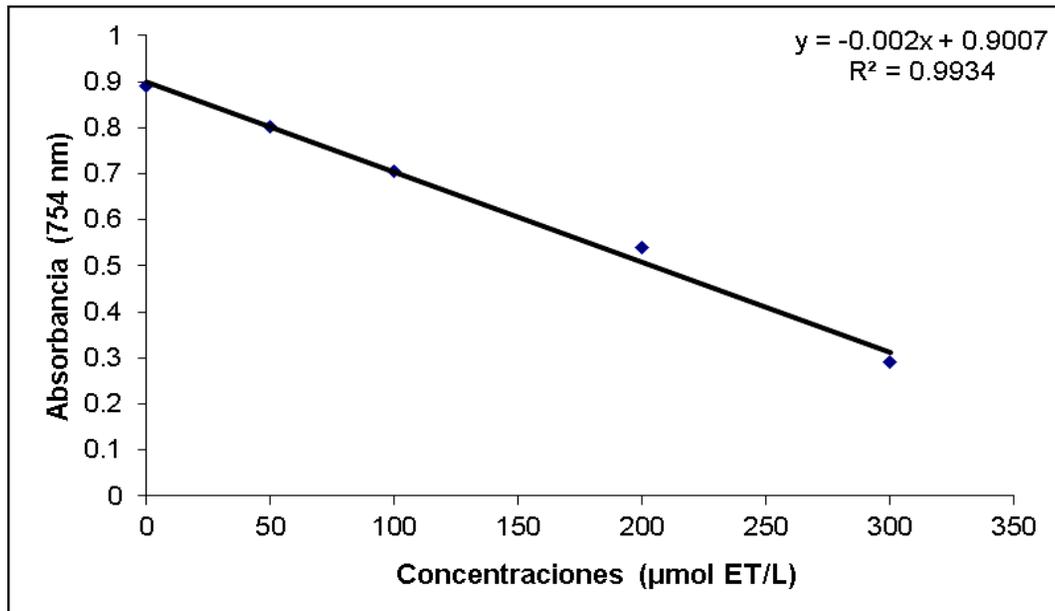
Zulueta, A., Esteve, M., & Frígola, A. (2008). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(9), 310-316.

Anexos. Curvas de calibración

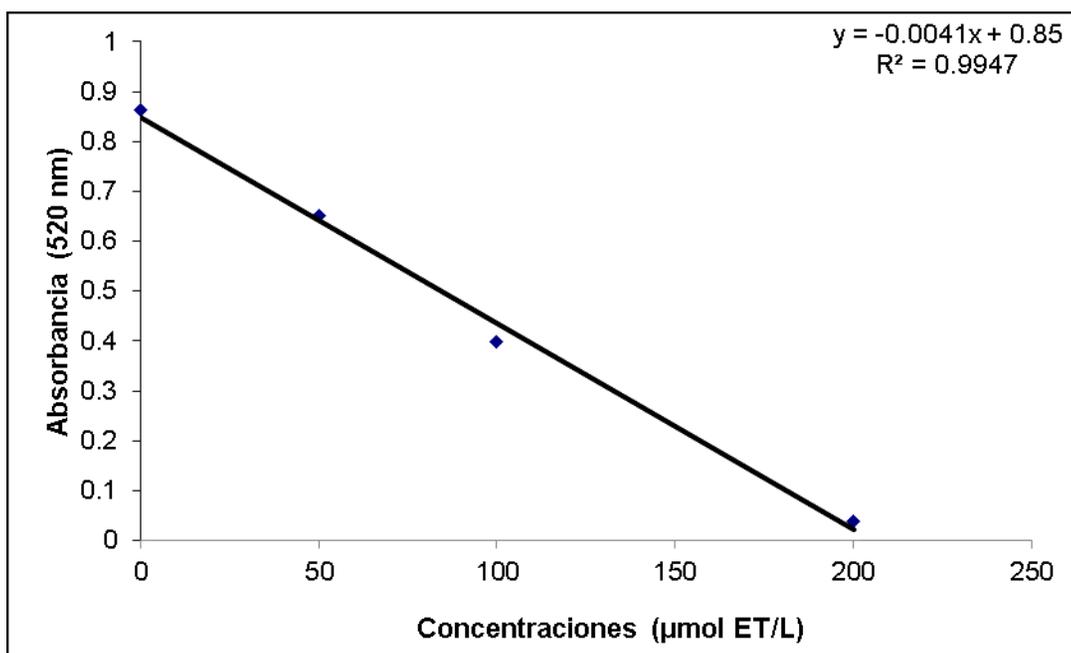
1.1 Curva de calibración del ácido gálico para contenido de fenoles totales.



1.2 Curva de calibración de TROLOX para ABTS.



1.3 Curva de calibración de TROLOX para DPPH.



1.4 Curva de calibración de ácido ascórbico.

